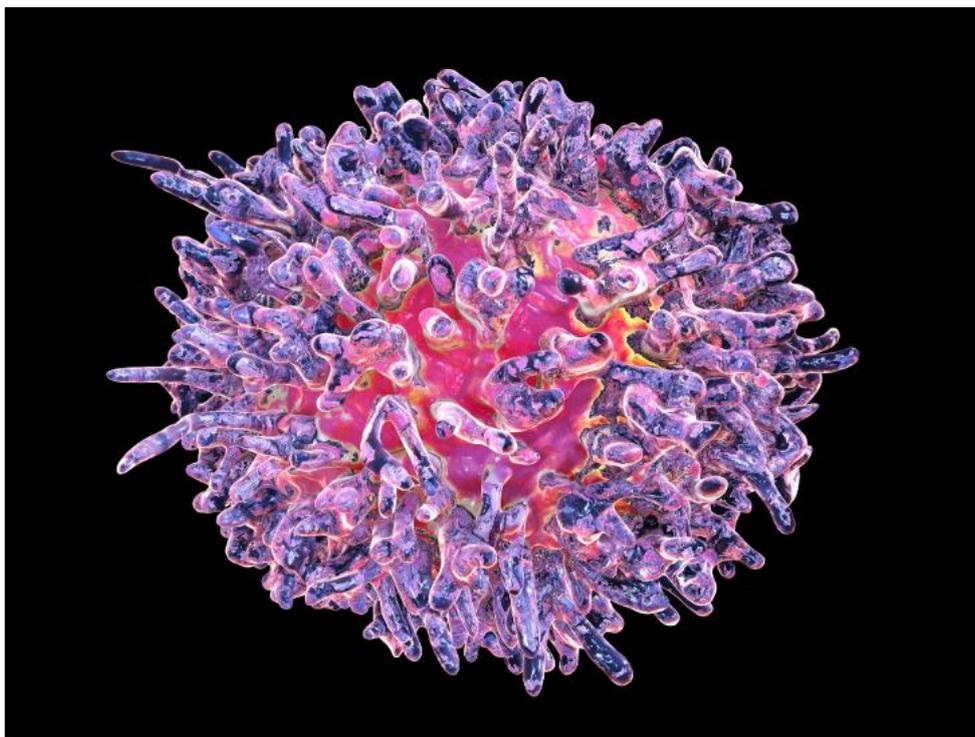


R&D nel Canton Ticino



La ricerca oncologica dei linfomi diffusi a grandi cellule B

Autrice: Viviane Lardi

Docente responsabile: Danilo Bellomo

Liceo Cantonale di Mendrisio

Anno scolastico 2022-2023

Immagine di copertina: linfocita B (Fonte 1)

INDICE

1	Premessa	4
2	Abstract.....	5
3	Introduzione all'argomento.....	6
3.1	Sistema immunitario	6
3.1.1	Funzioni.....	6
3.1.2	Vaccini.....	6
3.1.3	Immunità aspecifica (innata) e specifica (adattiva)	7
3.2	Sistema Linfatico	7
3.2.1	Linfociti	8
3.2.2	Linfomi.....	10
3.3	Attività in laboratorio	11
3.3.1	In vitro	11
3.3.2	In vivo.....	11
3.3.3	Colture cellulari.....	12
3.3.4	Conta cellulare	12
3.3.5	Screening farmacologico	13
3.3.6	Test del mycoplasma.....	13
3.3.7	MTT-assay.....	14
4	Parte Sperimentale	15
4.1	Obiettivo	15
4.2	Linee cellulari utilizzate	15
4.3	Farmaci utilizzati.....	15
4.3.1	Drug1 e Drug2	15
4.3.2	Everolimus (drug3)	16
4.3.3	Venetoclax (drug4).....	16
4.4	Materiale.....	17
4.5	Metodo.....	18
4.5.1	Conta cellulare	18
4.6	Risultati.....	19
4.6.1	Risultati del saggio colorimetrico.....	19

4.6.2	Commento ai grafici.....	20
4.6.3	Combinazione di più farmaci.....	21
5	Conclusione.....	22
6	Ringraziamenti.....	23
7	Allegati	24
7.1	Tabelle e grafici.....	24
7.2	Immagini.....	28
7.3	Glossario	33
7.4	Sitografia	34
7.5	Dichiarazione antiplagio.....	35

1 Premessa

Da tempo mostravo interesse per gli ambiti tumorali e avevo intenzione di approfondire questa tematica. Le radici di questo mio interesse derivano da una parte dalla mia storia familiare: uno dei miei nonni è deceduto tanti anni fa a causa di un tumore, mentre il secondo nonno ne soffre tuttora, sebbene fortunatamente in forma molto meno aggressiva. D'altra parte, invece, nutro un interesse "tecnico" per i tumori, non comprendendo fino in fondo come delle cellule possano danneggiare un intero organismo unicamente crescendo e moltiplicandosi.

Il lavoro di maturità mi ha offerto l'occasione per approfondire il mio entusiasmo e la mia curiosità per questo aspetto. Con lo stage svolto durante questa estate presso l'Istituto Oncologico di Ricerca di Bellinzona, sperimentando di prima persona il comportamento di queste cellule tumorali, ho arricchito le mie conoscenze biologiche e chimiche. Questa attività mi ha ulteriormente motivato nella stesura del presente documento.

Viviane Lardi

Rovio, 8 novembre 2022

2 Abstract

In questo lavoro sono stati eseguiti esperimenti per paragonare e approfondire le caratteristiche di quattro farmaci antitumorali: drug1, drug2, Everolimus (drug3) e Venetoclax (drug4). Per confermarne la validità, queste indagini sono avvenute su tre linee cellulari di linfomi diffusi a grandi cellule B (DLBCL): TMD8, RIVA e DOHH2.

Per trarre conclusioni concrete dalle indagini, al loro termine è stato praticato un saggio colorimetrico denominato MTT-assay. Questo fornisce dati riguardanti l'assorbanza luminosa dei rispettivi pozzetti delle well plate, dai quali si ricavano le percentuali di sopravvivenza delle cellule al termine delle indagini. I dati ottenuti permettono la valutazione di due aspetti decisivi: la sicurezza da una parte e l'efficacia del farmaco dall'altra.

Per la sicurezza vengono esaminate le concentrazioni alle quali il farmaco raggiunge determinati risultati. Più bassa risulterà esserne la concentrazione, più sicuro sarà il farmaco. Per valutare l'efficacia invece, si calcolano le percentuali di sopravvivenza delle linee cellulari, indipendentemente dalla concentrazione del farmaco. Più bassa risulta la percentuale di sopravvivenza, più efficace sarà il farmaco applicato.

Secondo il primo criterio, drug3 risulta essere il trattamento più sicuro. Ad una minima concentrazione di 0.001nM, le cellule in esame presentano una riduzione media del 60% di sopravvivenza. La linea dal risultato migliore risulta essere TMD8, che raggiunge il valore di 20% alla concentrazione minima di 0.001nM e il valore di 7.452% alla concentrazione massima di 100'000nM.

Seguendo il secondo criterio invece, drug2 risulta essere il trattamento più efficace. Porta il risultato migliore per due delle tre linee: per la linea TMD8 con una sopravvivenza del 0.229% e per la linea DOHH2 del 13.367%. La sopravvivenza media delle tre linee trattate con drug2 è del 11.704%. Questo valore risulta il migliore di tutto l'esperimento, ma è ottenuto a scapito di una concentrazione massima, rendendo il farmaco troppo poco sicuro per l'organismo.

Nell'ottica di un paziente ipotetico, è necessario trovare un compromesso ottimale fra sicurezza ed efficacia. Visto che drug1, drug2 e drug4 necessitano delle concentrazioni elevatissime, per un utilizzo sicuro rimane unicamente drug3, sebbene la sua efficacia media ammonti "solo" al 28.056%. Una scelta tutt'altro che facile, che probabilmente medici e pazienti sono obbligati ad affrontare giornalmente.

3 Introduzione all'argomento

Questo lavoro analizza i trattamenti mirati contro i linfomi diffusi a grandi cellule B (DLBCL: *diffuse large B cell lymphoma*). Dopo una introduzione generale al sistema citato, questo lavoro approfondirà il caso di tre linee cellulari DLBCL – provenienti da due sottotipi tumorali differenti – trattate con quattro farmaci, andando a influire sul funzionamento di due complessi proteici.

3.1 Sistema immunitario

3.1.1 Funzioni

La funzione principale del sistema immunitario è di proteggere l'organismo dagli agenti patogeni come batteri o virus e di rimuovere dalle cellule i tessuti danneggiati o morti così come i globuli rossi invecchiati.

A questo scopo il sistema immunitario è fornito di difese primarie come la superficie cutanea e le mucose, le quali impediscono l'entrata dei patogeni nel corpo e ne permettono l'espulsione.

Le mucose presentano la prima difesa delle cavità respiratorie nasali e tracheali. Vengono prodotte dalle vie respiratorie, che inglobano i batteri e virus e li espellono tramite colpi di tosse o starnuti. Per la difesa delle cavità orali, sono la saliva e i succhi gastrici a giocare un ruolo determinante.

Qualora il microorganismo riuscisse ad entrare nell'organismo, intervengono le tonsille aumentando la produzione di globuli bianchi, i quali sono adibiti alla sconfitta dell'antigene.

Quando il patogeno inizia a proliferare si manifesta la malattia. Una volta localizzata quest'ultima

si attiva il sistema immunitario: inizialmente i flussi sanguigni vengono concentrati presso la zona infetta, apportando calore. Questo causa rossori, gonfiori e un innalzamento della temperatura locale.

La maggior parte dei batteri e virus basano il loro funzionamento su proteine specifiche, che risultano funzionanti in una fascia di temperatura molto ristretta attorno alla temperatura corporea di 37°C. Non appena questa si innalza o viene alterata, le proteine dei patogeni vengono denaturizzate e non funzionano più, causandone così la morte.

Se queste prime misure adottate dal sistema immunitario risultano ancora insufficienti per evitare la diffusione della malattia, entrano in gioco i globuli bianchi che, tramite la produzione di anticorpi specifici al morbo, lo attaccano e lo distruggono.

Questi anticorpi sono prodotti in modo da permanere a lungo all'interno dell'organismo, sviluppando così una memoria immunitaria, permettendo di accelerare la risposta ad una possibile infezione successiva dallo stesso patogeno.

3.1.2 Vaccini

Il medesimo meccanismo viene attivato tramite le vaccinazioni. In questo caso gli antigeni iniettati possono avere una natura diversa a dipendenza dalla malattia:

- Vaccini vivi attenuati: trattano agenti resi non patogeni;
- Vaccini inattivati: adoperano antigeni uccisi tramite temperature elevate o sostanze chimiche;
- Vaccini ad antigeni purificati: agenti purificati delle componenti pericolose;

- Vaccini ad anatossine: utilizzo delle molecole patogene sufficienti per l'attivazione delle difese immunitarie, ma insufficienti per la diffusione della malattia stessa;
- Vaccini a DNA ricombinante: prodotti tramite clonazione e produzione in grandi quantità di un antigene.

Esistono casi nei quali il sistema reagisce a sostanze di per sé innocue, come se fossero pericolose. In tal caso si parla di allergia.

Come già accennato, la difesa principale dell'organismo viene affidata ai globuli bianchi. Questi hanno la possibilità di agire tramite i fagociti, riconoscendo la cellula estranea ed eliminandola direttamente. Affrontano secondariamente l'invasore con i linfociti, producendo anticorpi e citochine.

Pertanto, le patologie si sviluppano quando le difese attivate non sono in grado di sconfiggere il patogeno. Esso risulta quindi troppo forte oppure si maschera come immune, non facendosi riconoscere dalle difese immunitarie.

3.1.3 Immunità aspecifica (innata) e specifica (adattiva)

Esistono due immunità che caratterizzano il nostro sistema: quella aspecifica e quella specifica. La prima è presente nel nostro organismo sin dalla nascita; si presenta in tutti i soggetti nei quali il sistema immunitario non si è ancora sviluppato e non dà risposte specifiche e selettive agli antigeni che penetrano nell'organismo tramite piccole ferite. Essa ha margini di difesa molto limitati ed è offerta in primo piano dagli strati esterni del corpo come la pelle e le mucose esterne; in secondo piano invece dalle cellule del

sistema immunitario (cellule di difesa) e da proteine.

La seconda immunità invece, quella specifica, si sviluppa man mano che l'organismo incontra i patogeni. Entra in gioco quando si presentano patogeni troppo forti o specifici per essere combattuti dall'immunità innata. Essa presenta un tempo di reazione più lungo rispetto all'immunità aspecifica, perché nella fase iniziale il patogeno deve essere identificato prima di essere distrutto. L'immunità specifica permette dunque una risposta più mirata al patogeno, ma con tempi di reazione più lunghi. Oltretutto ha la capacità di sviluppare cellule di memoria che memorizzano il patogeno presentato in modo da accorciare il tempo di reazione per le volte seguenti, nel caso questo si dovesse ripresentare. Esso è composto da linfociti B, T e cellule B di memoria. Questa immunità è determinata dall'azione del sistema linfatico, che mira alla difesa da patogeni esterni.

3.2 Sistema Linfatico

Questo sistema porta somiglianze con – ad esempio – il sistema cardio-circolatorio. Questo ha vasi che gli permettono di raggiungere ogni cellula del corpo e lo stesso lo troviamo anche nel sistema linfatico con i vasi linfatici. A differenza del primo però, il secondo non è munito di pompa, ma muove la linfa unicamente grazie alla forza di gravità e al lavoro peristaltico della muscolatura liscia. Senza una pompa, la velocità della linfa è di 6.2 nm/sec.; risulta dunque notevolmente ridotta rispetto a quella del sangue (2×10^5 nm/sec). Il suo ruolo principale riprende l'immunità specifica del sistema immunitario, ossia la difesa del nostro organismo da eventuali attacchi

da parte di agenti patogeni. Grazie ai linfociti attivi nella linfa, questo sistema ha sempre “un’arma pronta” per intervenire contro diversi pericoli. Per questa ragione è strettamente correlato al sistema linfatico.

Spesso il sistema linfatico e immunitario vengono confusi e immedesimati nonostante presentino azioni completamente differenti. Il sistema immunitario comprende l’azione di un gruppo di cellule, mentre il sistema linfatico consiste unicamente nel trasporto di queste cellule.

3.2.1 Linfociti

I Linfociti sono cellule del sangue e, insieme ai macrofagi, fanno parte dei globuli bianchi.

Sono la parte essenziale dell’immunità dell’organismo e si distinguono in due grandi tipi: linfociti B e T.

La differenza maggiore fra di loro è la seguente: i primi sono adibiti indirettamente alla distruzione dei patogeni tramite la produzione di anticorpi; i linfociti T invece lo distruggono direttamente.

Linfociti B

Il loro nome deriva dal luogo nel quale vengono prodotti: il midollo osseo (*bone marrow*). Sono attivati in seguito ad una stimolazione da parte dei linfociti T-helper, che a loro volta vengono richiamati dalla presenza di un patogeno con le proteine corrispondenti ai loro recettori. Con questo contatto/comunicazione tra linfociti B e T-helper, viene spinta la proliferazione e differenziazione dei linfociti B, i quali si suddivideranno ulteriormente in plasmacellule e in cellule di memoria.

Plasmacellule

Cellule derivanti dai linfociti B, adibite alla fabbricazione degli anticorpi nel caso della ripresentazione dell’antigene per la quale è specificata.

Esistono due tipi di plasmacellule: quelle a breve e quelle a lunga sopravvivenza.

Le prime, non avendo acquisito la capacità di migrare nel midollo osseo o nella milza, muoiono in un lasso di tempo fra 3 e 7 giorni. Le seconde invece, una volta raggiunto il midollo osseo oppure la milza, sopravvivono per anni e svolgono la loro funzione per altrettanto tempo ricevendo stimoli di sopravvivenza.

Generalmente le plasmacellule non hanno alcuna funzione di memoria, a differenza dei linfociti B di memoria. Derivano entrambe dai linfociti B immaturi, ma si sviluppano a fini diversi.

Linfociti B di memoria

Derivano dalla risposta immunitaria primaria. Hanno la capacità di vagare per l’organismo per anni in cerca dell’antigene. Nel caso ne incontrassero uno, la risposta immunitaria secondaria risulterà molto più veloce rispetto alla precedente.

I linfociti B non si trovano unicamente nel midollo osseo; in base al loro stadio di maturazione cambiano luogo da dove poi entrare in azione.

- Fase di maturazione 1 → linfociti B-1.
Si trovano in prossimità del midollo osseo e possiedono già una parte delle funzionalità del linfocita maturo. Hanno una bassa affinità ad un gran numero di antigeni, ma sono comunque capaci di produrre anticorpi. Questo permette loro di fare già parte del sistema immunitario umorale.

Non sono ancora abili nella memoria immunitaria, per questo non fanno ancora parte del sistema immunitario acquisito.

- Fase di maturazione 2° → linfociti B della zona marginale.

Collocati nelle zone circostanti alla milza, rispondono velocemente alla presenza di antigeni con la produzione di anticorpi. Come nella fase precedente, non sono ancora capaci di memoria immunitaria.

- Fase di maturazione 3° → linfociti follicolari. Risiedono nei follicoli degli organi dei linfonodi secondari. Sono completamente maturi e pronti ad incontrare un antigene ed a sviluppare la rispettiva memoria.

Quando una di quest'ultime cellule incontra un gene patogeno, essa impiega dalle 48 alle 72 ore per raccogliere le informazioni necessarie alla sintesi dell'anticorpo corrispondente (periodo induttivo). Dopodiché passa alla effettiva produzione prima di rilasciarli nell'organismo.

Una volta terminato il periodo induttivo, la cellula matura si divide per mitosi in una plasmacellula, o cellula effettrice, ed in una cellula B di memoria.

Anticorpi

Sono composti proteici e di zuccheri che circolano nei vasi sanguigni. Vengono prodotti da cellule specifiche del sistema immunitario e hanno il compito di individuare il patogeno potenzialmente pericoloso.

La loro strategia di attacco consiste nell'adesione al patogeno neutralizzandolo e attirando cellule linfatiche in loro soccorso per prevedere una corretta distruzione di esso.

Gli anticorpi vengono prodotti dalle plasmacellule dei linfociti B e rispondono unicamente

all'antigene per il quale sono stati prodotti. Funzionano secondo il concetto di chiave-serratura e rispondono dunque ad una sola proteina.

I compiti principali degli anticorpi stanno in una prima neutralizzazione dei germi, attaccandosi direttamente alla loro superficie oppure alle loro tossine, rendendoli così innocui. Richiamano ulteriori cellule del sistema immunitario e attivano complessi proteici che stimolano l'aumento della velocità della risposta immunitaria.

Linfociti T e NK

Oltre ai linfociti B, nel sistema sono presenti altre due grandi categorie di linfociti: i linfociti T e i linfociti NK.

I primi vengono prodotti nel midollo spinale, dove completano la loro maturazione. Dopodiché vengono spostati nel timo tramite i vasi sanguigni. Da qui deriva il loro nome di linfociti T (da Timo).

I linfociti vagano per l'organismo nei vasi sanguigni, nei vasi linfatici oppure vengono richiamati verso uno specifico tessuto o organo a seconda delle necessità e delle infezioni in atto.

Sono suddivisi in linfociti-t-citotossici e linfociti-T-helper. I primi sono adibiti all'attacco diretto della cellula infetta, mentre i secondi affrontano l'avversario in modo diverso: stimolano la produzione di anticorpi nei linfociti B e rilasciano messaggi di natura chimica (citochine) che inducono all'attivazione dei linfociti-T-citotossici.

I secondi, i linfociti NK, vengono chiamati *Natural Killer-cells* e sono i linfociti effettori del sistema immunitario innato. La loro attività viene stimolata dal rilascio di citochine da parte dei linfociti B, la quale viene rilasciata quando è necessario una risposta immunitaria. Controllano lo

sviluppo e la presenza di cellule tumorali o infette da batteri e virus, moderandone lo spargimento e la contaminazione di ulteriori cellule. Riconoscono le cellule infette grazie a strutture molecolari situate in loro superficie. In prossimità di essa, rilasciano proteine contenute al loro interno denominate *granzymes*. Queste perforano la membrana della cellula bersaglio, causandone l'apoptosi (morte programmata e naturale).

3.2.2 Linfomi

I linfomi sono cellule tumorali del sistema linfatico sviluppatasi dando origine a linfonodi di dimensioni eccessivamente grandi. La moltiplicazione di queste cellule tumorali non è più controllata dall'organismo e lo danneggia.

Hodgkin e non-Hodgkin

Esistono molte differenziazioni all'interno della medesima patologia: la prima differenziazione viene fatta tra linfomi Hodgkin e linfomi non-Hodgkin.

Entrambi sono linfonodi maligni e derivanti da cellule B. All'esame istologico, i linfomi Hodgkin presentano alcune cellule denominate *Reed Sternberg*. Queste sono cellule di grandi dimensioni con due nuclei distinti, che tendono a propagarsi in specifici organi: i polmoni, la milza, il fegato o il midollo osseo.

I linfomi non-Hodgkin invece, non presentano queste cellule, ma risultano comunque pericolosi. Mirano all'alterazione del ciclo di vita dei linfociti, dove normalmente quelli invecchiati dovrebbero morire, per poi venir sostituiti da linfociti nuovi. In queste patologie i linfociti invece non muoiono; il corpo continua a produrli aumentando esponenzialmente la quantità e causando

così un ingrandimento sproporzionato dei linfonodi.

La distinzione tra le due tipologie è importante per definire l'approccio terapeutico al quale sottomettere il paziente. Le loro caratteristiche necessitano infatti trattamenti molto diversi fra di loro.

Distinzione tra linfomi

I linfomi diffusi a grandi cellule B hanno origine da sviluppi errati della cellula B. Può essere suddiviso in due sottotipi principali che originano in fasi distinte: a cellule B del centro germinativo (GCB) e a cellule B attivate (ABC). Il sottotipo GCB deriva dalle cellule B del centro germinativo, mentre il sottotipo ABC deriva da cellule B in stadi successivi allo sviluppo. Oltre a quanto già constatato, i linfomi si differenziano tra di loro in base al momento di maturazione. Questo avviene nel centro germinativo nel quale il carattere tumorale si è sviluppato.

Il centro germinativo (vedasi Immagine 1) è una struttura interna al linfonodo che si occupa non solo della maturazione dei linfociti, ma pure della loro proliferazione e differenziazione così come della mutazione genetica delle plasmacellule per adattare la produzione di anticorpi al patogeno da sconfiggere.

Mantello

Il mantello consiste di un insieme di cellule B memoria che rivestono completamente il centro germinale. Si tratta di cellule già sottoposte ad una prima specializzazione e che pertanto non possono svilupparsi diversamente dalle cellule di memoria immunitaria.

Centro germinativo

La zona interna al mantello, ossia il centro germinativo, viene suddiviso in due parti: *la dark* e *light -zone*. Entrambe si distinguono in base alla colorazione della zona.

Dark zone

La parte iniziale risulta più scura perché implica una forte densità di linfociti rispetto alla *light zone*. Questo perché al suo interno avviene la rapida proliferazione mitotica dei linfociti, che in tale stadio vengono denominati centroblasti, e la impermutazione somatica. Questa altera l'affinità genetica degli anticorpi prodotti dalle plasmacellule.

Light zone

Se l'impermutazione riesce ad accedere correttamente alla *light zone*, il centroblasto incrementa le proprie capacità. Ne consegue una selezione tra linfocita-T oppure linfocita-B, che porta ad una ulteriore differenziazione tra plasmacellula e cellula B memoria (vedasi Grafico 1).

Nel caso avvenissero mutazioni svantaggiose durante la impermutazione somatica, i centroblasti vengono definiti come cellule B apoptotiche, le quali muoiono in maniera controllata. Se queste cellule non venissero annientate, potrebbero riprodursi liberamente mettendo in pericolo l'organismo.

3.3 Attività in laboratorio

In seguito, si riprendono alcune esperienze fatte durante lo stage in laboratorio.

3.3.1 In vitro

La sperimentazione in vitro è una tecnica fondamentale per le ricerche effettuate in laboratorio.

Viene eseguita all'interno di vetrini dove lo sviluppo del contenuto può essere osservato nei minimi dettagli ad occhio nudo oppure con il microscopio. Le indagini avvengono su numerose linee cellulari, delle quali si conoscono tutte le informazioni rilevanti. Fra queste la mutazione, il paziente di provenienza e la sensibilità della linea alle alterazioni genetiche.

All'inizio della coltura, le cellule vengono rese immortali: viene impedito loro di andar contro all'apoptosi così da garantirne una disponibilità sufficiente per le varie linee necessarie per gli esperimenti.

Le cellule di ogni linea vengono sottoposte regolarmente a controlli di qualità al fine di garantirne un buon stato di salute. In caso di contaminazioni o mutazioni, le cellule risulterebbero inutilizzabili e verrebbero sostituite con altre cellule della medesima linea.

3.3.2 In vivo

La sperimentazione in vivo segue alla sperimentazione in vitro eseguita in laboratorio. È necessaria affinché il farmaco possa essere ammesso sul mercato. Serve inoltre per garantire il corretto sviluppo della terapia tra organismo e farmaco. Le indagini svolte in laboratorio riproducono le condizioni ideali per le cellule e per la loro crescita. Queste condizioni non corrispondono però a quelle dell'organismo nel quale viene poi introdotto il trattamento. La sperimentazione in vivo è pertanto indispensabile onde garantire che il farmaco mantenga la sua funzione anche all'interno degli organismi.

Prima che il farmaco sia utilizzato su esseri umani, questo viene sperimentato su animali. A

questo scopo si utilizzano inizialmente i topi, perché sono gli animali più simili all'uomo a livello di organismo. Un certo numero di cellule tumorali viene introdotta nel fianco del topo, dove crescono e possono essere esaminate e analizzate. Negli esperimenti si lascia crescere il tumore fino ad una dimensione sufficiente per effettuare gli studi necessari, senza però lasciar crescere il linfoma ad una dimensione pericolosa per l'animale. I farmaci gli vengono somministrati per via endovenosa oppure per via orale.

3.3.3 Colture cellulari

Gran parte dei lavori concernenti i linfomi effettuati nei laboratori si basano su cellule già affette da linfoma. Per questo motivo devono disporre di una grande quantità di esse per permetterne gli studi. Poter garantire una quantità sufficiente di queste cellule è essenziale ed è quindi basilare coltivarle con molta attenzione. Se queste si trovano in condizioni favorevoli, ossia a temperatura ideale, con quantità sufficiente di nutrienti, ossigeno e spazio, proliferano facilmente restando sane e quindi utilizzabili. Nel caso fossero in salute ma non vengono necessitate, le colture vengono congelate in azoto liquido. La surgelazione delle cellule non provoca alcuna modifica nella salute delle stesse, ma evita di sprecare spazio, tempo e nutrienti nel loro mantenimento. Quando poi vengono utilizzate, queste si scongelano e sono subito utilizzabili.

Colture in sospensione

Ci sono due tipologie di crescita cellulare: la crescita in sospensione e la crescita in adesione.

Nel caso della crescita in sospensione, le cellule crescono e proliferano sospese nel terreno nel

quale sono disposte. In tal caso, la *flask* viene utilizzata in modo verticale, per disporre la maggior parte del volume a favore della crescita delle cellule.

Colture in adesione

In questo secondo caso, le cellule crescono una adesa all'altra, formando piccoli grumi che man mano si uniscono formando infine una patina sottile e delicata. Dopo qualche giorno dalla messa a coltura si riconosce il lato della *flask* a contatto con il terreno e le cellule. La *flask* sarà posizionata orizzontalmente e risulterà opaca. Nel terreno stesso non saranno presenti cellule, a meno di movimenti bruschi che facilmente le distaccano tra loro, perché tutte saranno collocate sul fondo.

L'Immagine 12 mostra sia *flask* posizionate orizzontalmente (che avranno delle messe a coltura in adesione), sia *flask* posizionate verticalmente (con colture in sospensione).

3.3.4 Conta cellulare

La conta cellulare viene effettuata per conoscere due fattori principali: il numero preciso di cellule presenti al millilitro di terreno così come la percentuale di sopravvivenza delle cellule. Queste informazioni permettono di constatare in tempo un'infezione batterica, virale o di mycoplasma oppure una variazione delle condizioni non più ideali alla proliferazione e sopravvivenza della coltura. Inoltre, la conta serve per calcolare la quantità di liquido necessario per gli esperimenti e per avere un'ulteriore conferma della riuscita o del fallimento di un'indagine. Essa viene effettuata con dei macchinari automatizzati e tramite l'aggiunta del pigmento di colore blu, trypan blu,

alla porzione di cellule. Questo pigmento permette di riconoscere le cellule vive da quelle morte nel *cellular-screening*. Nelle cellule morte o danneggiate, la membrana cellulare risulta forata. Questo permette al pigmento di diffondere all'interno della cellula. La cellula risulterà dunque scura alla lettura e verrà riconosciuta come morta. Nelle cellule vive contrariamente la membrana è intatta e il pigmento non riesce a propagarsi nel suo interno. La cellula risulta chiara alla lettura.

3.3.5 Screening farmacologico

Lo screening farmacologico è il metodo di ricerca maggiormente usato. Consiste nell'inserimento di una quantità costante di cellule per tutti i pozzi, mentre si aumenta la concentrazione del farmaco lungo la *well plate* (vedasi Immagine 2). La concentrazione di farmaco aumenta del fattore cinque per ogni colonna, spostandosi da sinistra verso destra lungo la *well plate*. Le cellule vengono poste in incubazione in condizioni ideali per un periodo di tempo in base al trattamento aggiunto (solitamente 72 ore).

nM	0.001	0.1	0.13	0.64	3.2	16	80	400	2'000	10'000
----	-------	-----	------	------	-----	----	----	-----	-------	--------

3.3.6 Test del mycoplasma

Questo esame mette in evidenza una potenziale contaminazione batterica da mycoplasma delle cellule. Questa ostacolerebbe la crescita e proliferazione delle cellule in questione. La contaminazione da mycoplasma è frequente nei laboratori ed è dunque essenziale rivelarla sulle linee.

I risultati vengono ottenuti grazie all'aggiunta del reagente *buffer* ad un campione di cellule che si vuole sottoporre all'esame. Questo reagente porta le cellule contaminate ad emettere una luce che

Questa organizzazione permette di sperimentare due farmaci diversi su una sola linea cellulare (o viceversa) su una unica *well plate*. Ogni esperimento viene effettuato tre volte. Triplicandone i risultati, si riducono i margini di errore, ottenendo evidentemente risultati più affidabili. La struttura della *plate* è la seguente (vedasi Immagine 2):

- la prima riga viene utilizzata per denominare la linea sperimentata;
- le sei righe centrali contengono le cellule con le rispettive concentrazioni di farmaco;
- l'ultima riga contiene unicamente il terreno nel quale vengono fatte crescere le cellule.
- la prima colonna contiene unicamente cellule nel proprio terreno ed è utilizzata per il controllo positivo. A fine esperimento questa colonna, tramite l'MTT-assay, risulterà avere la crescita più alta, ossia il risultato che definisce la crescita delle cellule in assenza di farmaco.

Le concentrazioni vengono espresse con l'unità di misura nano molare nM ossia $\text{mol} \times 10^{-9}$ e sono distribuite sulla *well plate* come segue:

viene rilevata e letta dal medesimo apparecchio di lettura utilizzato per il saggio colorimetrico MTT. Più luce viene emessa dalle cellule, più avanzata risulterà la contaminazione da mycoplasma.

Si effettuano due controlli: C+ e C-, come controlli positivi e negativi per garantire la riuscita del test (vedasi Tabella 1).

Una volta aggiunto il reagente *buffer*, la prima lettura viene divisa per la seconda lettura effettuata a distanza di dieci minuti dalla prima. In caso di contaminazione il risultato della divisione risulta

superiore a 1. Nel caso contrario, il valore si troverà al di sotto di esso. Nella lettura della Tabella 1 solo il controllo positivo (C+) risulta essere contaminato, mentre tutte le altre linee in esame non sono soggette a contaminazioni.

3.3.7 MTT-assay

L'MTT-assay è un saggio colorimetrico che verifica la sopravvivenza delle cellule nei rispettivi pozzetti, leggendone l'assorbanza. Consiste nell'aggiunta del composto 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio al composto cellulare della *well plate* dopo le 72 ore di incubazione. Il composto viene digerito dagli enzimi delle cellule sopravvissute e dà come prodotto di reazione un sale di colore scuro che va a precipitare - inizialmente - sul fondo della cellula. La digestione enzimatica sottopone il composto iniziale ad una reazione chimica di riduzione (vedasi Immagine 8). Per deporre il sale in modo omogeneo all'interno del pozzetto, quattro ore dopo l'aggiunta dell'MTT, si aggiunge l'SDS. Questo discioglie chimicamente la membrana cellulare e libera il sale, facendolo precipitare sul fondo del pozzetto. La lettura per assorbanza avviene tramite il *Cytation* (che emette raggi luminosi), calcolando quanti raggi non vengono assorbiti dalle cellule. I pozzetti contenenti cellule per la maggior parte morte, avranno un lieve deposito di sale, essendo che l'MTT non è stato sottoposto all'attività enzimatica e risulteranno dunque chiare. Avranno un risultato di assorbanza basso rispetto ai pozzetti che invece contengono le cellule per la maggior parte ancora vive. Queste avranno sottoposto il composto MTT alla reazione di riduzione e avranno dato come prodotto di scarto il sale. Essendo questo più scuro, permette una maggiore

assorbanza dei raggi emessi e porta dunque ad un risultato maggiore.

4 Parte Sperimentale

4.1 Obiettivo

L'obiettivo di questa indagine sta nell'osservazione del comportamento dei farmaci *drug1*, *drug2*, *Everolimus* e *Veneoclax* sulle linee cellulari TMD8, RIVA e DOHH2.

4.2 Linee cellulari utilizzate

L'esperimento utilizza TMD8, RIVA e DOHH2 come linee derivanti dal linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). TMD8 e RIVA derivano dal tipo ABC (*Activated-B-Cell*), ossia la tipologia di linfoma che si forma nello stadio post-germinale. Questo si localizza all'esterno del centro germinativo, durante la maturazione verso la plasmacellula. DOHH2 deriva da GCB (*Germinal-Center B-cell*) localizzato invece tra la proliferazione e l'ipermutazione somatica nello stadio iniziale della *dark zone*, ancora situato all'interno del centro germinativo, a differenza di ABC.

4.3 Farmaci utilizzati

4.3.1 Drug1 e Drug2

Si tratta di due farmaci che vanno ad inibire il corretto funzionamento del pathway PI3k-AKT (vedasi Immagine 3), del quale la proteina mTOR ne fa parte. Questa sta per *mammalian Target Of Rapamycin*, ossia la proteina che gioca il ruolo determinante per la crescita e proliferazione della cellula. Agisce sulla subunità catalitica dei due complessi proteici discendenti direttamente dal complesso portico sopraccitato, ossia mTORc1 e mTORc2 (*mammalian Target Of Rapamycin complexes 1/2*).

È un sensore ormonale e viene attivato dagli ormoni che regolano il metabolismo, come gli amminoacidi, il glucosio e l'insulina. Questo gli permette di regolare il bilancio energetico e il peso corporeo. Grazie a questa caratteristica, viene somministrato anche alle persone affette di leucemia e diabete oltre ai pazienti colpiti da DLBCL.

mTORc1

Questo complesso proteico regola numerosi pathway strettamente legati alla crescita delle cellule e dei tessuti. Ha un carattere anabolico come la produzione di ribosomi, sintesi proteica, nucleica e degli acidi grassi. Esso sopprime automaticamente il processo catabolico dell'autofagia, e con ciò la produzione di lisosomi, organelli nei quali avviene l'autofagia vera e propria.

Il complesso viene stimolato dagli amminoacidi come l'insulina e leucina così come dalla presenza di stress ossidativo.

Esattamente il contrario succede se mancano i composti sopraccitati oppure, in presenza di stress riduttivo, curcumina o caffeina.

mTORc2

Questo composto organizza il citoscheletro e il trasporto ionico associato ad esso. Una mancanza causerebbe difficoltà nella costruzione di sottili filamenti delle miofibrille del tessuto muscolare. Rispetto a mTORc1, mTORc2 presenta differenze a livelli di substrati proteici. Questi includono AKT, un'ulteriore proteina chinasi connessa nei segnali anabolici.

Diversamente da mTORc1, le conoscenze su mTORc2 sono minori. È un complesso proteico del quale si presume una sua iperattività nei casi di tumori e linfomi.

4.3.2 Everolimus (drug3)

Esso appartiene ad una classe di trattamenti farmacologici di *kinase inhibitors* (vedasi Immagine 4). Viene utilizzato sia quale trattamento tumorale, sia quale prevenzione dalla risposta di rigetto da parte dell'organismo in casi di trapianti. Anch'esso agisce sul medesimo pathway di *drug1* e *drug2*, ma va ad inibire unicamente mTORc1 (vedasi Immagine 5).

Nel caso di trapianti, *drug3* agisce da immunosoppressore. Sopprime l'attivazione e moltiplicazione dei globuli bianchi che solitamente sono adibiti alla difesa dell'organismo, per fare in modo che gli stessi non vadano ad attaccare l'organo trapiantato.

Nella presenza di un tumore invece, ne rallenta la crescita riducendone l'apporto di sangue e così anche di nutrienti. Legandosi ad una proteina, FKBP-12, esso forma un complesso che ostacola l'attività di mTOR.

4.3.3 Venetoclax (drug4)

Si tratta di un "medicinale orfano", ossia un farmaco utilizzato unicamente se è stata confermata una resistenza alla chemioterapia (vedasi Immagine 6). A differenza di mTOR-inhibitor, *drug4* è un inibitore della proteina anti-apoptotica Bcl-2, che viene prodotta in modo eccessivo nelle patologie tumorali di DLBCL.

Agisce a livello mitocondriale (vedasi Immagine 7) e si lega a domini specifici del complesso Bcl-2, esercitando un'attività citotossica nei confronti delle cellule che sovraesprimono questo complesso proteico.

In una situazione comune, nella quale il paziente non presenta alterazioni genetiche importanti, si punta in primis al trattamento chemioterapeutico.

Solo se questo fallisce si passa al trattamento con *drug4*.

Se invece sono presenti alterazioni genetiche particolari, il primo trattamento al quale si punta è quello di due farmaci: ibrutinib e idelalisib. Se questi non si rivelano idonei o non permettono di raggiungere risultati sufficienti, si passa poi al trattamento con *drug4*. La chemioterapia non viene presa in considerazione quando il paziente ha delle alterazioni genetiche. In questi casi il trattamento con *drug4* non è idoneo.

Apoptosi e necrosi

L'apoptosi e la necrosi sono due tipologie differenti di morte cellulare.

La prima definisce una morte programmata delle cellule dell'organismo, ossia l'eliminazione delle cellule indesiderate e la rimozione delle cellule che hanno terminato la loro funzione. Un carattere anti-apoptotico descrive un comportamento che non permette questa morte e dove la cellula continua a vivere, pur non essendo più in grado di svolgere il proprio compito. Questo avviene nel caso tumorale. I trattamenti contro questo carattere sono pro-apoptotici, ossia stimolano la morte cellulare per riportare all'equilibrio il ciclo di morte e proliferazione cellulare.

La necrosi invece è una morte che segue ad un grave trauma subito dalla cellula. Quest'ultima si gonfia rapidamente fino a scoppiare. Il contenuto intracellulare si versa nell'ambiente extracellulare prossimo alla cellula, causando una risposta infiammatoria.

L'apoptosi si presenta molto più spesso rispetto alla necrosi, perché la necrosi si osserva solo nel caso di una completa assenza di controllo sulla cellula stessa.

4.4 Materiale

- Terreno per la coltura:
 - RPM Medium: nutrimenti per una adeguata crescita cellulare come sali, vitamine e ioni;
 - 1% penicillina e streptomina: antibiotici per evitare contaminazioni;
 - 10% FBS: proteine necessarie alla crescita;
 - Rosso fenolo: indicatore di pH che permette di comprendere lo stato del terreno nel quale le cellule sono messe a coltura. Più la colorazione è rossa, più nutrienti saranno presenti nel terreno e la soluzione sarà basica. Se il colore è arancione, la soluzione è diventata acida per i composti di scarto delle cellule e per l'assenza di nutrienti. In tal caso il terreno deve essere sostituito.
- Diversi contenitori di plastica e *flask* per garantire la sterilità e un ambiente ideale alla crescita e proliferazione delle cellule.
- *Well plate*:

La piastra di coltura viene usata per osservare lo sviluppo delle cellule nei singoli pozzetti. Ne contiene 96 (approssimati a 100 per facilitare i calcoli), ognuno con un volume massimo di 100µL.
- *Masterblock*:

Questa è anch'essa una piastra, ma adibita alla preparazione dei farmaci per gli esperimenti. Può contenere fino a 2mL.
- Guanti di protezione:

I guanti utilizzati in laboratorio hanno una componente in nitrile che permette una maggiore protezione dalle sostanze tossiche e dannose rispetto a normali guanti in lattice. La loro funzione è anche igienica: un contatto diretto tra la pelle e le cellule aumenterebbe il rischio di contaminazione delle stesse.
- Occhiali di protezione
- Camice da laboratorio:

Necessario per la sicurezza personale in caso di riversamenti di sostanze corrosive e tossiche.
- Pipette multicanali:

Vengono utilizzate per velocizzare il processo di preparazione dei pozzetti. Questo strumento è munito di 12 pipette a volume regolabile ed è un attrezzo ad alta precisione per l'aggiunta del farmaco al composto cellulare (vedasi Immagine 10).
- Centrifuga:

Questo macchinario centrifuga i composti separando le componenti di densità diverse. Le rotazioni per minuto possono essere variate in base al composto e all'esperimento. Solitamente vengono utilizzate 3000 rpm (rotazioni al minuto, vedasi Immagine 11).
- Incubatore:

È un armadietto completamente isolato dall'ambiente esterno per mantenere il più possibile le condizioni corporee ideali alla proliferazione delle cellule. Mantiene una temperatura di 37°C e contemporaneamente una pressione di 1 atmosfera (atm). È munito di vari ripiani sui quali posizionare le numerose *flask* (vedasi Immagine 12).
- Vortex:

Questo apparecchio permette di agitare e mescolare i liquidi nelle provette (vedasi Immagine 13). Con composti congelati, il vortex ne accelera lo scioglimento.

- **Apparecchio per la conta cellulare:**
Con l'aggiunta del trypan blu al composto, l'apparecchio (vedasi Immagine 14) riconosce le cellule vive da quelle morte, ne stabilisce la percentuale di sopravvivenza e la quantità di cellule per mL.
- **MTT-assay:**
Saggio colorimetrico per rilevare l'azione del farmaco nelle diverse linee.
- **Cytation:**
Apparecchio in grado di leggere vari parametri in base all'informazione ricercata (vedasi Immagine 15).
- **Cappa:**
Le lavorazioni di spostamento o diretto contatto delle cellule con l'ambiente esterno vengono effettuate sotto cappa, ossia in un ambiente sterile, così da ridurre la possibilità di

contaminazioni delle cellule sotto esame (vedasi Immagine 16).

4.5 Metodo

Ogni linea cellulare viene esaminata su due *well plates* (vedasi Tabella 2), ognuna delle quali contiene due trattamenti diversi come mostrato nell'Immagine 2. Dopo un'incubazione di 72 ore ed un MTT-assay si ottengono i dati di assorbanza dei diversi pozzetti. Questi dati permettono poi di calcolare la percentuale di sopravvivenza, di strutturarne un grafico e di trarre le conclusioni dell'esperimento.

4.5.1 Conta cellulare

Ci sono circa 2 x 100 pozzetti da riempire per ogni linea cellulare, ognuno contenente 100'000 cellule (vedasi risultati Tabella 3). Il calcolo si presenta come segue:

Cellule necessarie:

100'000 cellule a pozzetto x 100 pozzetti x 2 *well plate* a linea cellulare = **2 Mio cellule per linea**

Volume da preparare per ogni linea:

100µL a pozzetto x 100 pozzetti x 2 *well plate* a linea cellulare = **20 mL totali**

Calcolo dei mL da prelevare da ogni linea per un totale di 2 Mio di cellule:

formula $\rightarrow \frac{\text{cellule necessitate}}{\frac{\text{cellule}}{\text{mL}} \text{ secondo la linea cellulare}}$

$$\text{TMD8: } \frac{2 \text{ Mio cell.}}{819'000 \text{ cell./mL}} = 2.44 \text{ mL}$$

$$\text{RIVA: } \frac{2 \text{ Mio cell.}}{708'000 \text{ cell./mL}} = 2.83 \text{ mL}$$

$$\text{DOHH2: } \frac{2 \text{ Mio}}{1'650'000 \text{ cell./mL}} = 1.21 \text{ mL}$$

+ 17.6 mL

+ 17.2 mL

+ 18.8 mL

Portare a volume V = 20 mL

I farmaci vengono preparati all'interno di una *masterblock*, la quale permette la preparazione di quantità sufficienti alla diluizione corretta. A questa si aggiungono le cellule fino a un volume di 20mL.

4.6 Risultati

4.6.1 Risultati del saggio colorimetrico

RIVA

Trattamento con drug1 e drug2

La linea cellulare RIVA in questa *well plate* (vedasi Immagine 17) è stata trattata con *drug1* e *drug2*.

Questo farmaco ha un'azione che - per essere efficace - necessita concentrazioni molto elevate. Infatti, tutta la *well plate* eccetto le ultime tre colonne hanno una colorazione molto scura; questo mostra che il farmaco non ha inibito la sopravvivenza delle cellule.

I risultati delle due *well plate* si assomigliano, perché questi due trattamenti agiscono sulla medesima cascata proteica di mTOR.

Trattamento con drug3 e drug4

La medesima linea cellulare dell'esperimento sopraccitato presenta risultati ben diversi con *drug3* e *drug4* (vedasi Immagine 18). Nonostante anche *drug3* sia un mTOR-inibitor come *drug1* e *drug2*, esso presenta un comportamento ben differente. Agisce nel medesimo pathway di *drug1* e *drug2*, ma inibisce solo la cascata proteica del complesso mTORc1, portando così a effetti molto diversi.

Sorprendentemente, ne risultano buoni risultati già a concentrazioni bassissime, cosa che negli altri farmaci non avviene. Una concentrazione minima di 0.001nM sembra bastare per inibire notevolmente la sopravvivenza delle cellule.

Drug4 invece, l'unico Bcl2-inibitor sperimentato, riprende la tendenza di *drug1* e *drug2*. Risulta però più efficace dei primi tre farmaci sulla

linea RIVA. Mantiene alto il valore di sopravvivenza delle cellule, inibendola però drasticamente a partire da un valore medio della concentrazione attorno a 3.2nM. Sopra questa concentrazione i pozzetti risultano pressoché limpidi, indicando una inibizione notevole da parte del farmaco.

TMD8

In base ai parametri colorimetrici, i quattro farmaci agiscono in modo analogo come sulla linea cellulare RIVA precedente (vedasi Immagine 19 e Immagine 21). Si percepisce direttamente l'analogia tra MTT-assay e grafico nell'Immagine 20:

confronto diretto tra MTT-assay e grafico di TMD8 trattato con Drug3 e nell'Immagine 22, dove al calare dei grafici, i colori dei pozzetti sottostanti si schiariscono. Nel caso contrario se i grafici si mantengono costanti, anche la colorazione dell'MTT-assay rimane invariata.

4.6.2 Commento ai grafici

Vedasi Grafico 2 e Grafico 3

In questi grafici si osserva un andamento standard della relazione fra concentrazione del farmaco sull'asse x e la percentuale di sopravvivenza delle cellule sull'asse y.

L'andamento dei grafici di *drug1* e *drug2* è affine. La similitudine è - come già detto in precedenza - dovuta alla loro azione conforme sul *mammalian Target Of Rapamycin pathway* (mTOR).

TMD8 è la linea con l'andamento più drastico rispetto alle altre due linee, in entrambi i trattamenti. Supera il valore iniziale (100%) in ambedue i casi con valori di 111.476% per *drug1* e 113.834% per *drug2*. Una volta terminati i trattamenti, le linee sono ordinate con la medesima sequenza. Il risultato più basso viene raggiunto da TMD8 con 0.399% e 0.229%, seguito da DOHH2 con 15.306% e 13.367% e terminando con RIVA, al 49.519% e 21.518%.

Nonostante i due trattamenti portino la medesima tendenza, è riconoscibile che *drug2* risulta più forte rispetto a *drug1*. L'andamento del secondo trattamento è analogo al primo, ma riprodotto estremizzando le tendenze delle linee. Infatti, nella media finale delle tre linee per ogni farmaco si constata che *drug1* termina in una media del 21.724%, mentre *drug2* termina in 11.704%, la media migliore dell'indagine.

Vedasi Grafico 4

Drug3 presenta un andamento differente rispetto a tutti gli altri farmaci, in modo particolare rispetto a *drug1* e *drug2*. Nonostante la somiglianza tra di loro, a livello di azione proteica (pa-

thway mTOR) presentano due andamenti completamente diversi. Come già riscontrato durante l'analisi del saggio colorimetrico MTT, la sopravvivenza cala improvvisamente già alla prima concentrazione di 0.001nM. In media si riduce di $2/3$ rispetto al valore iniziale. Dopodiché, l'andamento si stabilizza e mostra delle variazioni con le concentrazioni più alte. All'ultima e penultima concentrazione, la sopravvivenza delle linee RIVA e DOHH2 aumenta lievemente, cosa poco plausibile. Si presumono degli errori durante i procedimenti di preparazioni delle *well plates*.

Spicca all'occhio l'andamento costante di TMD8: dopo un calo iniziale fino a 20.254%, procede linearmente fino al valore associato alla penultima concentrazione di 15.759%. Presenta poi un ulteriore calo fino al valore di 7.452%.

Al contrario di TMD8, RIVA e DOHH2 hanno andamenti meno costanti. Per RIVA, questi valori oscillano del $\pm 5\%$ attorno al 39%, mentre per DOHH2 i valori oscillano del $\pm 3\%$ attorno al 30%.

Vedasi Grafico 5

Nonostante la sua azione su una catena proteica differente rispetto a *drug1* e *drug2*, *drug4* presenta un andamento simile a questi due farmaci. Anche TMD8 inizialmente supera il 100%, scendendo poi però con tendenza lineare fino ad un valore finale di 23.323%. L'andamento di DOHH2 invece è meno lineare (così come in *drug1*) e termina con un valore alto a 42.0786%.

L'andamento di RIVA non mostra analogie con le altre linee. Se negli altri tre casi (*drug1*, *drug2* e *drug3*) era TMD8 ad avere la tendenza più drastica ed il risultato più basso, su questo farmaco è

RIVA. L'efficacia del farmaco aumenta fortemente con concentrazioni medie, fra 0.64nM e 16nM, fino ad ottenere una sopravvivenza pressoché nulla alla concentrazione massima, dove il valore è di 1.019%.

4.6.3 Combinazione di più farmaci

Una volta terminati gli esperimenti, si può valutare la combinazione di due o più farmaci in base alle caratteristiche osservate, ai risultati ottenuti e alla linea da trattare.

Un'altra dimensione di distinzione concerne la durata della terapia: a corto o a lungo termine.

Una terapia a corto termine può concentrarsi sull'efficacia dei farmaci. In questo caso le combinazioni possono considerare i farmaci con l'efficacia maggiore: *drug1* o *drug2* combinati con *drug4*. La scelta fra i primi due potrà essere fatta in base alla linea da trattare.

Per le terapie a lungo termine invece prevale la considerazione della sicurezza, ossia l'utilizzo di farmaci efficaci a basse concentrazioni, perché meno dannose per l'organismo. Si consiglia quindi la combinazione di *drug3* con *drug4*, perché la bassa concentrazione del primo farmaco inibisce già notevolmente la sopravvivenza delle cellule.

5 Conclusione

Dei quattro farmaci sperimentati; tre esercitano un simile effetto sulle linee da me testate. L'analogia è più marcata tra *drug1* e *drug2*, sebbene anche il trend di *drug4* segua una tendenza simile. Il farmaco che più si differenzia con gli altri è *drug3*. Ritengo questa conclusione particolare; essendo *drug3* un inibitore del medesimo pathway di *drug1* e *drug2*, mi sarei aspettata risultati simili a questi. Da *drug4* invece mi aspettavo una reazione diversa; ha reagito come *drug1* e *drug2* nonostante sia l'unico ad inibire una catena proteica differente da mTOR.

Ho potuto concludere l'esperimento grazie al saggio colorimetrico MTT. Questo mi ha permesso la lettura dell'assorbanza luminosa delle cellule al termine delle indagini. Inserendo questi dati all'interno dei calcoli di percentuale, ho ottenuto la percentuale di sopravvivenza delle cellule di ogni linea ad ogni concentrazione esaminata.

L'analisi dei risultati insieme ai due concetti della sicurezza e dell'efficacia mi permettono di suggerire *drug2* e *drug3* quali farmaci prevalenti. *Drug3*, nonostante il suo andamento particolare, risulta essere il trattamento più sicuro comparato agli altri tre. Alla concentrazione minima di 0.001nM, la media di sopravvivenza di tutte e tre le linee trattate con *drug3* si riduce mediamente del 67%. Alle medesime concentrazioni, gli altri farmaci raggiungono tutt'altri risultati: 96.9% per *drug1*, 99.7% per *drug2* e 100% per *drug4*. Dopo una prima riduzione radicale, le linee di *drug3* si stabilizzano fino alla concentrazione massima, senza però portare a dei chiari, ulteriori miglioramenti. La linea TMD8 si stabilizza ai valori di $17\pm 3\%$ per poi terminare con il 7.452%. La linea RIVA rimane invariata ai valori di $39\pm 5\%$, terminando con il 40.397%. Infine, la linea DOHH2 si consolida a valori di $30\pm 3\%$ per terminare con il 36.318%. Come accennato nel rapporto, i valori delle ultime due linee alle concentrazioni massime non permettono deduzioni chiare.

Analizzando la sola efficacia dei farmaci si traggono conclusioni completamente diverse rispetto a quanto sopraccitato. Per le linee TMD8 e DOHH2, *drug2* risulta essere il trattamento migliore. Si raggiungono i risultati più bassi in assoluto: 0.229% per TMD8 e 13.367% per DOHH2. La linea RIVA invece, ottiene il risultato migliore (pari al 1.019%) utilizzando *drug4*.

Se analizzo le medie della sopravvivenza delle tre linee per ogni farmaco, constato che *drug2* è l'unico a raggiungere una media al di sotto del limite di 20%. Con una media di 11.704%, *drug2* supera di gran lunga gli altri trattamenti con le medie di 21.742% per *drug1*, 22.140% per *drug4* e 28.056% per *drug3*.

Essendo il farmaco migliore per due delle tre linee e raggiungendo la media migliore tra i quattro farmaci, ritengo *drug2* il trattamento più efficace.

Esaminando la media delle singole linee constato che, con un valore di 7.028%, TMD8 è la linea più sensibile ai trattamenti. Seguono poi DOHH2 e RIVA con risultati del 26.765% e del 28.113%.

6 Ringraziamenti

Tengo a ringraziare calorosamente il Prof. Danilo Bellomo per avermi seguito durante la stesura di questo lavoro e per i suoi numerosi consigli. Ringrazio pure il Dr. Francesco Bertoni per avermi offerto l'opportunità di svolgere uno stage presso lo IOR di Bellinzona. Rivolgo inoltre i miei ringraziamenti a Filippo ed Elisa per avermi fatto strada nei laboratori, tra camici e pipette. Un caloroso e particolare grazie a Chiara Tarantelli; con la sua infinita pazienza e il suo genuino interesse per il mio lavoro di maturità mi ha accompagnata offrendomi sempre un prezioso supporto.

Senza l'aiuto di queste persone non avrei potuto svolgere il mio lavoro di maturità come si presenta oggi. Lo concludo pertanto con soddisfazione e con tanta gratitudine verso chi mi ha accompagnato lungo questo cammino.

Viviane Lardi

Rovio, 8 novembre 2022

7 Allegati

7.1 Tabelle e grafici

	C+	C-	RCK8	WSU	Z138	TMD8	SUD10
lettura 1	396	601	105	663	555	603	815
lettura 2	1043	229	521	363	324	449	517

$\frac{\text{lettura 1}}{\text{lettura 2}}$	2.6338	0.381	0.739	0.5475	0.5837	0.74461	0.63436
---	--------	-------	-------	--------	--------	---------	---------

Tabella 1: risultati del test del mycoplasma

Linea cellulare 1										
unicamente cellule	1									Drug1
	2									
	3									
unicamente cellule	1									Drug2
	2									
	3									
Blank										

Linea cellulare 1										
unicamente cellule	1									Drug3
	2									
	3									
unicamente cellule	1									Drug4
	2									
	3									
Blank										

Tabella 2: occupazione di una linea cellulare sottoposta a quattro trattamenti farmacologici all'interno di due "well plates"

Linee cellulari	% di sopravvivenza	Cellule al mL
TMD8	84%	819'000
RIVA	93.20%	708'000
DOHH2	83.20%	1'650'000

Tabella 3: risultati della conta cellulare delle linee cellulari prese in esame

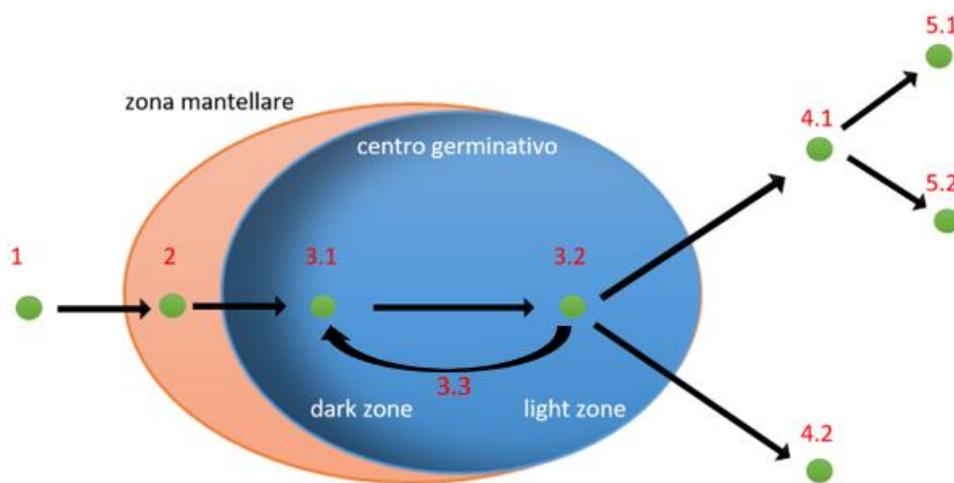


Grafico 1: Schema di maturazione dei linfociti B

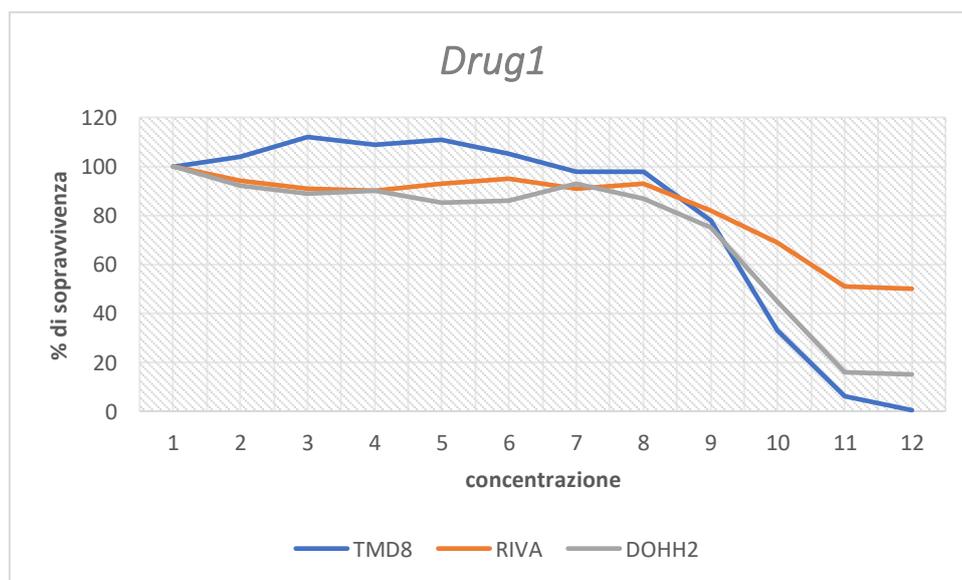


Grafico 2: andamento della % di sopravvivenza delle cellule di tutte e tre le linee cellulari sottoposte al trattamento di drug1

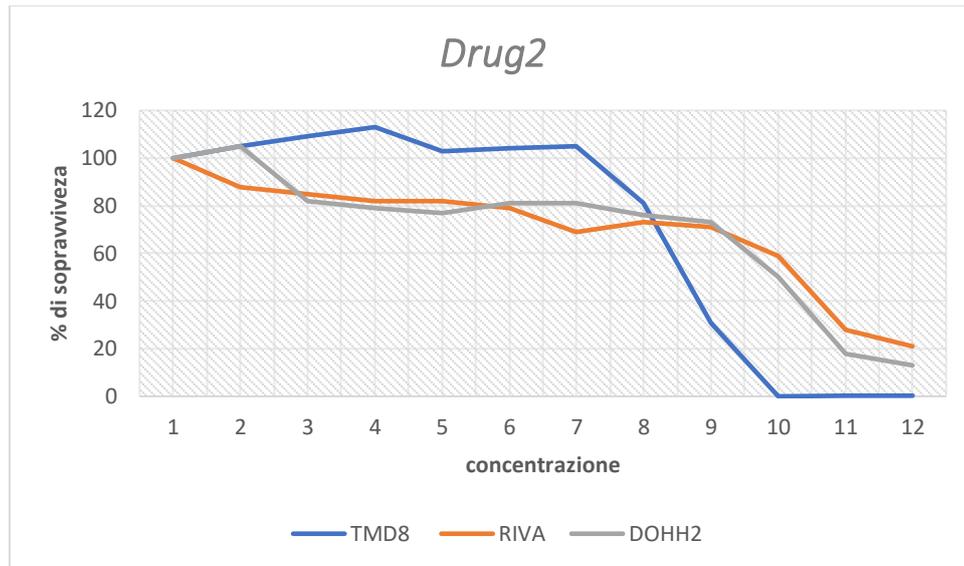


Grafico 3: andamento della % di sopravvivenza delle cellule di tutte e tre le linee cellulari sottoposte al trattamento di drug2

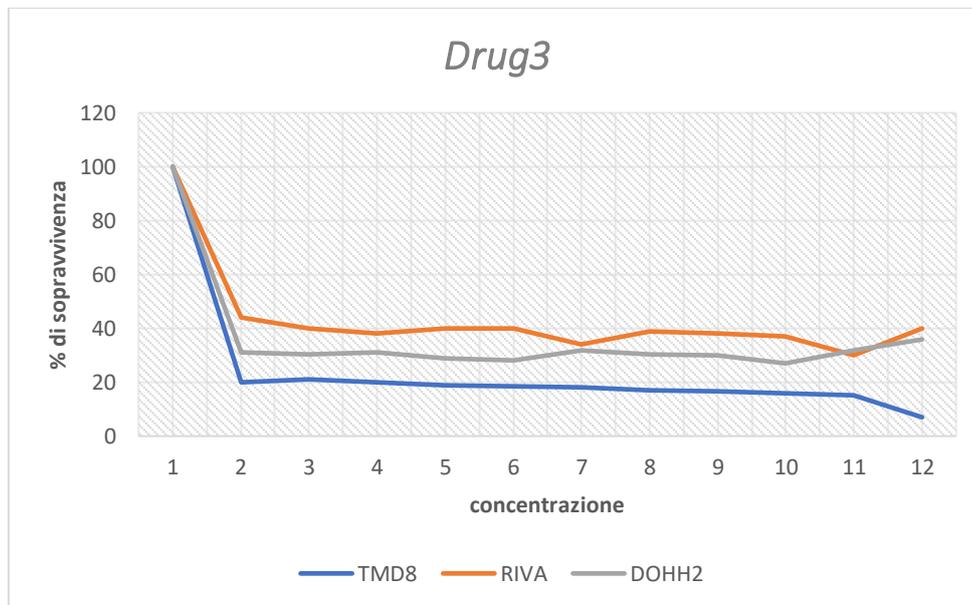


Grafico 4: andamento della % di sopravvivenza delle cellule di tutte e tre le linee cellulari sottoposte al trattamento di drug3

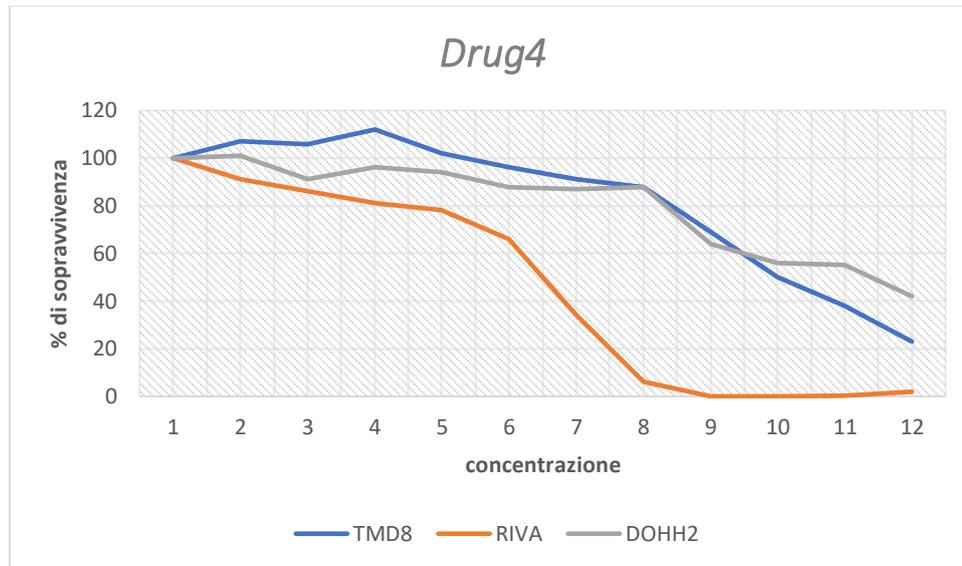


Grafico 5: andamento della % di sopravvivenza delle cellule di tutte e tre le linee cellulari sottoposte al trattamento di drug4

7.2 Immagini

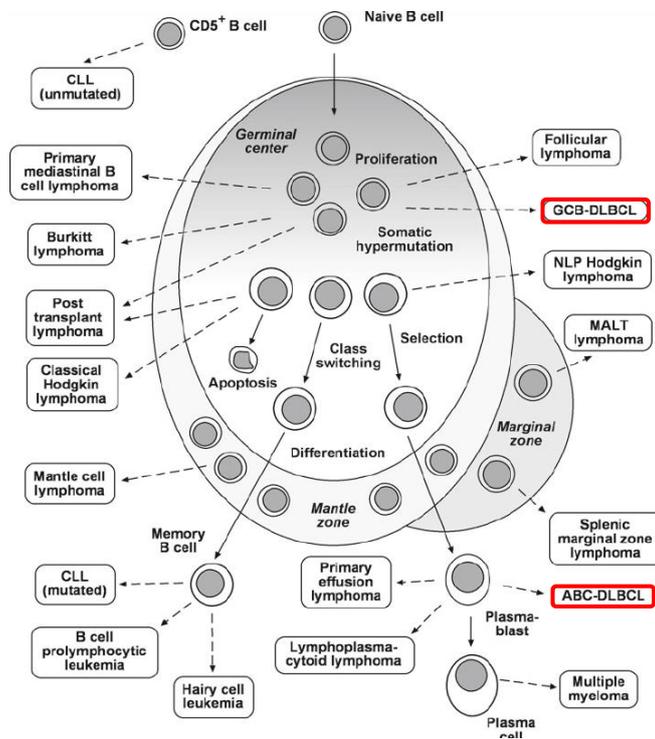
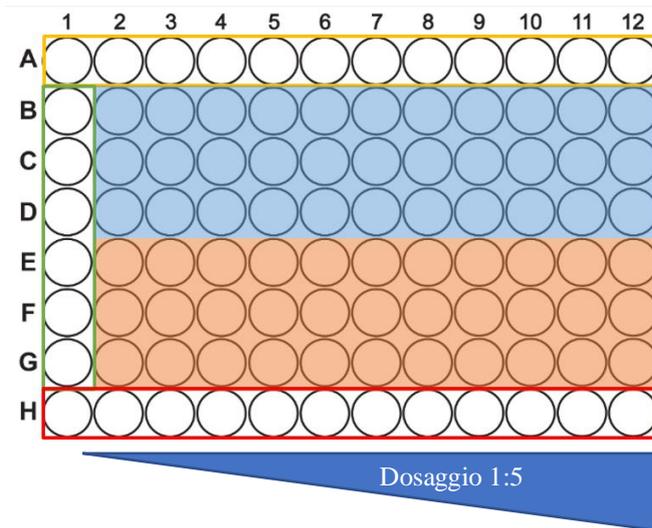


Immagine 1: diversificazione dei linfomi a dipendenza del loro stadio di maturazione (Fonte 10)



Appellativo della linea cellulare in esame

Farmaco/Trattamento 1

Farmaco/Trattamento 2

Blank

Cellule in coltura normale

Immagine 2: progettazione “well plate” nello screening farmacologico

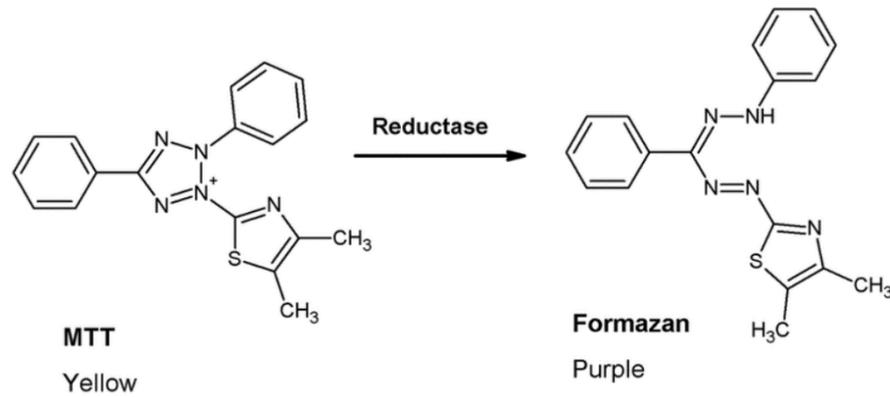


Immagine 8: reazione chimica di riduzione da MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) al prodotto di reazione formazano (sale di colorazione scura) (Fonte 11)



Immagine 9: terreno per coltura delle cellule pronto all'utilizzo



Immagine 11: centrifuga di laboratorio



Immagine 10: pipette multicanali. A sinistra la pipetta manuale con volume massimo di 200 μ L e a destra quella automatica con volume regolabile da 100 μ L a 1200 μ L



Immagine 12: incubatore e simulatore delle condizioni ideali per la crescita e proliferazione delle cellule



Immagine 13: Vortex

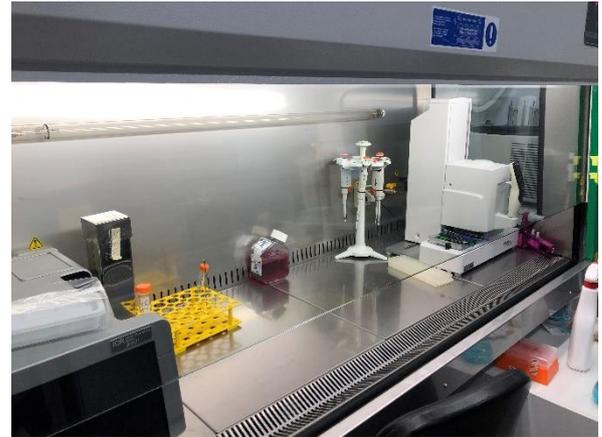


Immagine 16: cappa per la garanzia di un ambiente sterile durante le operazioni effettuate con le cellule



Immagine 14: apparecchiatura per la conta cellulare

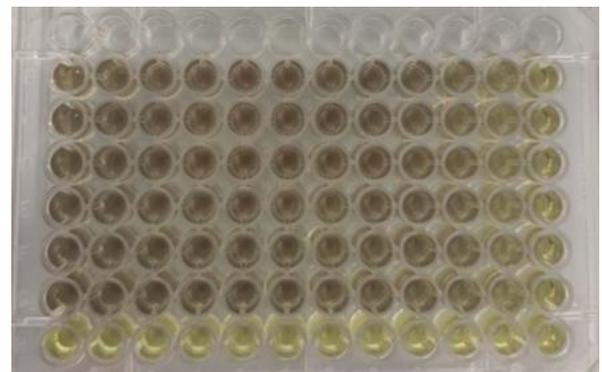


Immagine 17: "well plate" della linea cellulare RIVA trattata con drug1 e drug2 al termine dell'esperimento



Immagine 15: Cytation, apparecchiatura per la lettura dei vari parametri (luminescenza, assorbanza, ecc.)

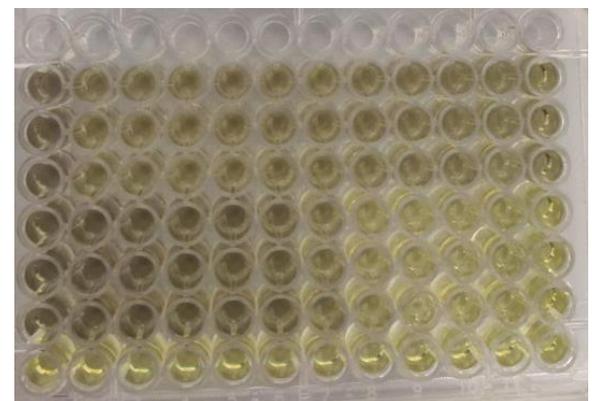


Immagine 18: "well plate" della linea cellulare RIVA trattata con drug3 e drug4 al termine dell'esperimento

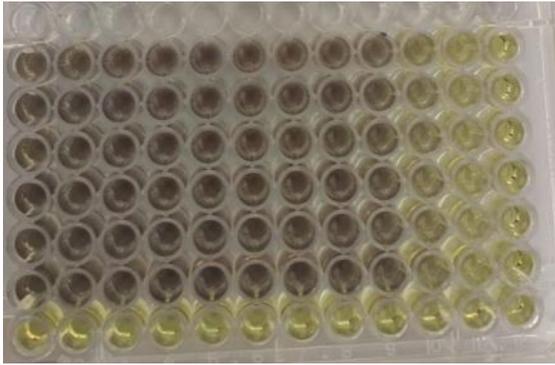


Immagine 19: "well plate" della linea cellulare TMD8 trattata con drug1 e drug2 al termine dell'esperimento

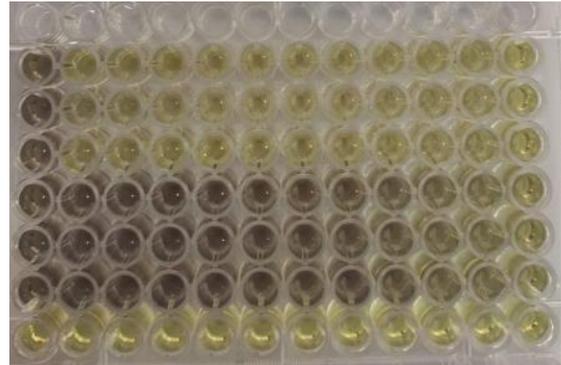


Immagine 21: "well plate" della linea cellulare TMD8 trattata con drug3 e drug4 al termine dell'esperimento

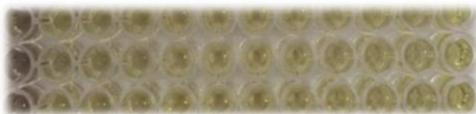
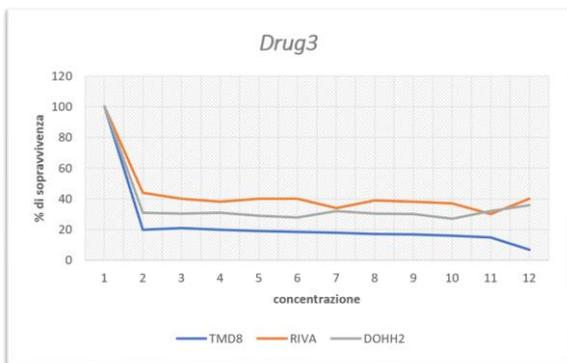


Immagine 20: confronto diretto tra MTT-assay e grafico di TMD8 trattato con Drug3

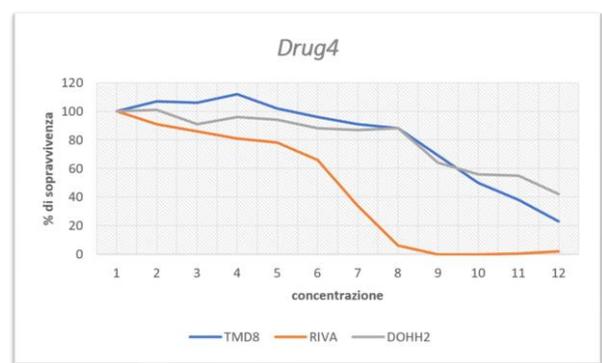


Immagine 22: confronto diretto tra MTT-assay e grafico di TMD8 trattato con Drug4

7.3 Glossario

fagociti:	Cellule del sistema immunitario che sconfiggono gli elementi estranei inglobandoli al loro interno
citochine:	Complessi proteici rilasciati dai linfociti per stimolare la risposta immunitaria
sistema immunitario umorale:	Sistema che gestisce le risposte immunitarie attivando la produzione di anticorpi (Fonte 24)
immunitario acquisito:	Sistema che conserva la memoria delle risposte immunitarie
periodo induttivo:	Periodo di elaborazione delle informazioni e della formulazione di una risposta immunitaria
esame istologico:	Test di laboratorio per diagnosticare i tumori
centroblasti:	Linfocita B a rapida proliferazione mitotica situato nella <i>dark zone</i> del centro germinativo
ipermutazione somatica:	Adattamento del sistema immunitario a nuovi elementi estranei
cellule B apoptotiche:	Linfociti B che sono destinati a morire perché mutati o pericolosi
mycoplasma:	Batterio che contamina facilmente le linee cellulari
subunità catalitica:	Cambiamento della velocità di reazione (Fonte 25)
carattere anabolico:	Processo di assimilazione e sintesi di molecole complesse a partire da molecole più semplici (Fonte 26)
processo catabolico:	Processi metabolici che danno come prodotti sostanze più semplici rispetto alle sostanze di partenza (Fonte 27)
autofagia:	Processo di pulizia, rinnovo cellulare e depurazione (Fonte 28)
insulina e leucina:	Aminoacidi che stimolano la sintesi proteica e sostiene il metabolismo. Sono uno indipendente dall'altro (Fonte 29)
stress ossidativo:	Squilibrio tra ossidanti e antiossidanti, a vantaggio dei primi, capace di danneggiare l'organismo (Fonte 30).
stress riduttivo:	Accumulo di troppi elettroni all'interno della cellula causato principalmente dall'alimentazione (Fonte 31).
citoscheletro:	Accumulo di costruzioni cellulari che formano una rettificazione di tubi e filamenti (Fonte 32).
miofibrille:	Filamenti di actina e miosina che permettono la contrazione muscolare

7.4 Sitografia

- Fonte 1: [CML-behandeling asciminib voldoet aan verwachtingen in fase III-studie - NTVH](#)
- Fonte 2: Danilo Bellomo, Allarme morbillo!, slide 9-10, presentazione per anno scolastico 2021-2022
- Fonte 3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>
- Fonte 4: <https://www.britannica.com/science/lymphocyte>
- Fonte 5: <https://rupress.org/jem/article/216/9/2113/120710/NK-cells-switch-from-granzyme-B-to-death-receptor>
- Fonte 6: [Differences Between Hodgkin & Non-Hodgkin Lymphoma | Moffitt](#)
- Fonte 7: [Lymph Node Structure and Function | AACCC.org](#)
- Fonte 8: [Germinal Centers - PubMed \(nih.gov\)](#)
- Fonte 9: [Somatic Hypermutation - an overview | ScienceDirect Topics](#)
- Fonte 10: [Germinal center reaction and cellular origin of human B cell lymphomas... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)
- Fonte 11: [Conversion of MTT to formazan by NADH-dependent reductases. | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)
- Fonte 12: [Mechanisms of PI3K/AKT/mTOR pathway activation and targeted therapies... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)
- Fonte 13: [mTOR inhibitors in cancer therapy - PMC \(nih.gov\)](#)
- Fonte 14: <https://www.artoi.it/mtor-inibitori/>
- Fonte 15: <https://www.myprotein.it/thezone/integratori/mtor-cos-e-funzioni-integrazione/>
- Fonte 16: [mTORstressC2: The other mTOR in autophagy regulation - PubMed \(nih.gov\)](#)
- Fonte 17: [Everolimus: Uses, Dosage, Side Effects, Warnings - Drugs.com](#)
- Fonte 18: <https://www.abcam.com/products/biochemicals/everolimus-mtor-inhibitor-ab142151.html>
- Fonte 19: [Mode of action of everolimus. PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase:... | Download Scientific Diagram \(researchgate.net\)](#)
- Fonte 20: [Venetoclax: principio attivo con effetto terapeutico - VIDAL](#)
- Fonte 21: [Molecole Venetoclax - Bing images](#)
- Fonte 22: [Copanlisib synergizes with conventional and targeted agents including venetoclax in B- and T-cell lymphoma models - ScienceDirect](#)
- Fonte 23: https://www.treccani.it/enciclopedia/apoptosi-morte-cellulare-programmata_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/
- Fonte 24: [Immunità umorale e Anticorpi | Cos'è, Come Funziona | X115®](#)
- Fonte 25: [Che cos'è l'attività catalitica? - Spiegato](#)
- Fonte 26: [anabolismo in "Dizionario di Medicina" \(treccani.it\)](#)
- Fonte 27: [Catabolismo - Wikipedia](#)
- Fonte 28: [Autofagia | Cos'è? Funzioni, Benefici | Come Aumentarla | X115®](#)
- Fonte 29: [I benefici della leucina su metabolismo lipidico e omeostasi energetica \(nutrientiesupplementi.it\)](#)
- Fonte 30: [Stress ossidativo: cos'è? Sintomi, cause, rimedi e conseguenze per la salute \(benessere360.com\)](#)
- Fonte 31: <https://notiziescientifiche.it/stress-riduttivo-e-fegato-i-ricercatori-scoprono-arma-di-contrasto/>
- Fonte 32: <https://www.chimica-online.it/biologia/citoscheletro.htm>

7.5 Dichiarazione antiplagio

Dichiaro sul mio onore che quanto scritto nel presente lavoro è stato da me redatto e che - citazioni, immagini e grafici (in parte) esclusi - nessuna porzione è stata copiata da pubblicazioni scientifiche, Internet o da lavori di ricerca già presentati in ambito accademico da me o da altri studenti. Nel caso di parti tratte da pubblicazioni scientifiche, da Internet o da altri documenti, ne ho espressamente e direttamente indicato la fonte al capitolo 7.4.

Viviane Lardi

Rovio, 8 novembre 2022