

# Gel paving di stent coronarici: erosione e rilascio di molecole attive modello

Gel paving di stent coronarici: erosione e rilascio di molecole attive modello

Elena Orlando

Elena Orlando







UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

**Facoltà di Ingegneria**

Corso di Laurea Specialistica in Ingegneria Chimica

## **Gel paving di stent coronarici: erosione e rilascio di molecole attive modello**

Tesi in

**Principi di Ingegneria Chimica**

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidata:

Elena Orlando

matricola 0620200147

**Anno Accademico 2012/2013**



*Alla mia famiglia*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman  
La data prevista per la discussione della tesi è il 23 Aprile 2013  
Fisciano, 18 Aprile 2013

# Sommario

<b>Sommario .....</b>	<b>I</b>
<b>Indice delle figure .....</b>	<b>V</b>
<b>Indice delle tabelle .....</b>	<b>XI</b>
<b>Introduzione.....</b>	<b>1</b>
1.1 Malattie del sistema cardiovascolare: l'aterosclerosi _____	2
1.1.1 Aterosclerosi: teorie patogenetiche	3
1.1.2 Formazione della placca aterosclerotica: l'aterogenesi	4
1.1.3 Principali fattori di rischio per l'aterosclerosi e prevenzione	5
1.2 Le terapie chirurgiche per l'aterosclerosi _____	8
1.2.1 Intervento di bypass aortocoronarico (CABG)	8
1.2.2 Interventi percutanei coronarici	9
1.3 Gli stent: applicazioni e innovazioni _____	13
1.3.1a Problematiche e futuro degli stent: verso l'impiego di Stent rivestiti con matrici polimeriche biocompatibili che rilasciano un farmaco.	15
1.3.1b Stent bioassorbibili	18
1.3.2 Biomateriali impiegati nei sistemi a rilascio controllato di farmaco	20
1.3.3 Sistemi di rilascio controllato di farmaco	24
1.3.4 Meccanismi di rilascio nei DES	26
1.3.5 Strategie diverse di coating	29
1.4 Obiettivi del lavoro di tesi _____	31

**Materiali, apparecchiature e metodi..... 33**

2.1 Materiali	34
2.1.1 Pluronic F-127	34
2.1.1.a Applicazioni medicali del pluronico F-127	37
2.1.1.b Limite di gelazione dei copolimeri pluronici ed effetto co-soluto	38
2.1.2 Alginati	40
2.1.3 Vitamina B12	43
2.1.4 $\alpha$ -tocoferolo	43
2.1.5 Solfato di rame pentaidrato	44
2.1.6 Acqua distillata	44
2.1.7 Stent	45
2.1.8 Solventi e reagenti	45
2.2. Apparecchiature	45
2.2.1 Bagno termostataato	45
2.2.2 Texture analyzer	46
2.2.3 Dispositivo Arteria Simulata (“Simulated Artery Device”, SAD)	47
2.2.4 Spettrofotometro	51
2.2.5 HPLC	52
2.2.6 Centrifuga	53
2.2.7 Altre apparecchiature	53
2.3. Metodi	54
2.3.1 Preparazione delle soluzioni alginato/pluronic per la formulazione del gel paving	54
2.3.2 Preparazione della soluzione reticolante a base di solfato di rame	55
2.3.3 Preparazione del sangue simulato	56
2.3.4a Test effetto co-soluto: preparazione dei film	56
2.3.4b Test effetto co-soluto: prove meccaniche	56
2.3.5 Gel paving in situ dello stent	58
2.3.6 Prove di erosione in SAD	62
2.3.7 Prove di rilascio in SAD	66

---

Sommario e indici.	Pag. III
2.3.8 Analisi spettrofotometrica	66
2.3.9 HPLC	68
<b>Risultati e discussione .....</b>	<b>69</b>
3.1 Test sull'effetto co-soluto _____	70
3.1.1 Prove meccaniche sulle miscele polimeriche non caricate	70
3.1.2 Prove meccaniche sulle miscele caricate con la vitamina B12	73
3.1.3 Prove meccaniche sulle miscele caricate con $\alpha$ -tocoferolo	75
3.2 Fenomeni erosivi del <i>gel paving</i> _____	79
3.2.1 Cenni di reologia e fluidodinamica del sangue	79
3.2.2 Fenomeni erosivi sulle miscele gelate termicamente	83
3.2.3 Fenomeni erosivi sulle miscele gelate termicamente e ionotropicamente	87
3.3 Fenomeni erosivi e proprietà di rilascio del <i>gel paving</i> caricato con la vitamina B12 _____	93
3.3.1 Effetto del carico di vitamina B12 sulla gelazione termica e ionotropica	93
3.3.2 Rilascio di vitamina B12	95
3.4 Fenomeni erosivi e proprietà di rilascio del <i>gel paving</i> caricato con l' $\alpha$ -tocoferolo _____	98
3.4.1 Effetto del carico di $\alpha$ -tocoferolo sulla gelazione termica e ionotropica	99
3.4.2 Rilascio di $\alpha$ -tocoferolo	102
3.5 Determinazione delle costanti di erosione _____	104
3.5.1 Determinazione della costante di erosione del <i>gel paving</i> non caricato e del <i>gel paving</i> caricato con $\alpha$ -tocoferolo	105
<b>Conclusioni.....</b>	<b>109</b>
4.1 Conclusioni _____	110
<b>Appendice A.....</b>	<b>113</b>
Appendice A _____	114
A1: metodo di taratura convenzionale	114
A2: metodo di taratura con sottrazione spettrale	116

---

A3:Metodo di taratura con Hplc

118

**Bibliografia ..... 121**

---

## Indice delle figure

Figura 1 Causa di mortalità nel mondo. The World Health Report,2000,WHO Geneva, 2000.....	2
Figura 2 Processo di formazione della placca aterosclerotica .....	5
Figura 3 Evoluzione della formazione di una placca aterosclerotica.....	5
Figura 4 Bypass Aortocoronarico.....	9
Figura 5 Procedura di aterectomia rotazionale .....	11
Figura 6 Rappresentazione di un intervento di angioplastica coronarica e di un impianto di uno stent .....	13
Figura 7 Differenti geometrie per stent espandibili con palloncino (a, b, c, d) e stent autoespandibili (e, f, g, h) .....	14
Figura 8 Stent autoespandibile e stent espandibile con palloncino.....	15
Figura 9 Maggiori targets di farmaci in relazione al ciclo cellulare .....	17
Figura 10 risposta dei vasi arteriosi post impianto .....	17
Figura 11 Caratteristiche dei principali polimeri biodegradabili impiegati in applicazioni medicali.....	19
Figura 12 Rivestimenti di PLLA adibiti al rilascio di farmaco o proteine .....	20
Figura 13 Ruolo della biocompatibilità nelle applicazioni biomediche .....	22
Figura 14 Andamento della concentrazione di farmaco nel plasma per diversi sistemi di rilascio.....	24
Figura 15 Cinetiche di rilascio del farmaco in un dispositivo .....	25
Figura 16 Confronto tra somministrazione convenzionale di farmaco e sistema di rilascio controllato di farmaco.....	26
Figura 17 A sinistra il rivestimento del Cypher stent; a destra il profilo di rilascio in vitro del Sirolimus .....	28
Figura 18 Schema del Cypher stent per la formulazione di un rilascio lento .....	28
Figura 19 Profili di rilascio in vitro relativi al Cypher stent.....	29

---

Figura 20 A sinistra il rivestimento del Taxus Stent; a destra tre differenti profili di rilascio in vitro del Paclitaxel. Con i cerchietti è riportato un rilascio lento, mentre le altre due curve rappresentano un profilo moderato (triangoli) ed un profilo veloce.....	29
Figura 21 Struttura dello stent BiodivYsio .....	30
Figura 22 Sezione della struttura ipotizzata del rivestimento dello stent.....	31
Figura 23 Struttura di un copolimero pluronico.....	34
Figura 24 Micella con un farmaco solubilizzato.....	35
Figura 25 Fasi micellari del pluronico F-127 all'aumentare della temperatura.....	36
Figura 26 Flocchi di pluronico F-127 .....	36
Figura 27 Rappresentazione della concentrazione critica micellare e di gelazione nei blocchi di copolimeri pluronici .....	37
Figura 28 Diagramma di fase del Pluronic F127 ricavato da Malmsten e Lindman. I cerchi vuoti indicano la curva di gelificazione, quelli pieni il cloud point.....	38
Figura 29 Diagramma di fase del Pluronic F127 in presenza di NaCl confrontato con quello in soluzione acquosa semplice .....	39
Figura 30 Diagramma di fase del Pluronic F127 in presenza di NaSCN confrontato con quello in soluzione acquosa .....	39
Figura 31 Struttura chimica dell'alginato.....	40
Figura 32 Composizione percentuale degli alginati in differenti alghe .....	41
Figura 33 Coefficienti di selettività per due alginati.....	41
Figura 34 Rappresentazione schematica del processo di gelificazione indotto dallo ione calcio in accordo con la teoria “egg-box” .....	42
Figura 35 Effetto della concentrazione del catione, rappresentato dalle sfere, sulla struttura del gel: sinistra, modello a basso contenuto di catione; destra, modello ad alto contenuto di catione .....	42
Figura 36 Molecola della Vitamina B12.....	43
Figura 37 Molecola dell'alfa-Tocoferolo .....	43
Figura 38 Bagno termostato.....	46
Figura 39 TA.XT Plus Texture Analyzer .....	46
Figura 40 Dispositivo arteria simulata (SAD).....	47
Figura 41 Arteria Simulata (Simulated Artery device).....	48
Figura 42 Schematizzazione dell'apparato realizzato (in blu la parte fissa del circuito).....	49
Figura 43 Schematizzazione dell'apparato realizzato (in rosso la parte mobile del circuito).....	49

---

---

Figura 44 A sinistra i componenti; a destra la baionetta assemblata alle estremità alla quale vengono connessi due tubi di diverso diametro .....	50
Figura 45 Rulli della pompa circondati dal tubo di silicone .....	50
Figura 46 A sinistra è evidenziato il raccordo a Y innestato nella parte superiore dell'impianto .....	51
Figura 47 Schema a blocchi di un HPLC .....	53
Figura 48 Schematizzazione dei film preparati .....	57
Figura 49 Condizioni operative impostate per le prove di compressione .....	58
Figura 50 Schematizzazione della ricopertura dello stent con il doppio strato di gel [32] .....	59
Figura 51 Inserzione dello stent in arteria .....	60
Figura 52 Sezione del tubo di silicone (a sinistra); disposizione dello stent nel tubo siliconico (a destra) .....	60
Figura 53 Immagini relative all'impianto dello stent nel tubo siliconico .....	61
Figura 54 Immagine di uno tent prima e dopo espansione .....	61
Figura 55 Sezione del tubo con stent dopo gelificazione (a sinistra, il colore rosa è dovuto ad un colorante aggiunto per meglio evidenziare lo strato di gel adesivo e successiva reticolazione (a destra, la colorazione azzurra è dovuta agli ioni $\text{Cu}^{2+}$ ). .....	62
Figura 56 Schema del fluido in circolazione nella parte fissa dell'impianto .....	63
Figura 57 Schema del fluido in circolazione nella parte mobile .....	63
Figura 58 Cuvetta in quarzo attraversata da un fascio di luce .....	67
Figura 59 Cromatogramma ottenuto con concentrazione di tocoferolo in etanolo pari a 80 mg/L .....	68
Figura 60 Confronto sulle miscele non caricate .....	70
Figura 61 Confronto sui geli non caricati in condizioni di gelazione termica .....	71
Figura 62 Confronto sui geli non caricati in condizioni di gelazione termica e ionotropica .....	72
Figura 63 Confronto sulle miscele caricate con vitamina B12 .....	73
Figura 64 Confronto sui geli caricati con vitamina B12 in condizioni di gelazione termica .....	74
Figura 65 Confronto sui geli caricati con vitamina B12 in condizioni di gelazione termica e ionotropica .....	75
Figura 66 Miscela caricata con $\alpha$ -tocoferolo .....	76
Figura 67 Confronto sui geli caricati con $\alpha$ -tocoferolo in condizioni di gelazione termica e ionotropica .....	76

---

---

Figura 68 Confronto sulle miscele al 2% sottoposte a gelazione termica.....	77
Figura 69 Confronto sulle miscele al 2% sottoposte a gelazione termica e gelazione ionotropica.....	77
Figura 70 Confronto sulle miscele al 3% sottoposte a gelazione termica e gelazione ionotropica.....	78
Figura 71 Andamento della viscosità del sangue in funzione del diametro dei vasi sanguigni.....	81
Figura 72 Evoluzione nel tempo della massa residua di soft gel.....	84
Figura 73 Evoluzione nel tempo della massa residua di soft gel.....	85
Figura 74 Confronto masse residue in funzione del tempo del soft gel.....	85
Figura 75 Confronto geli non reticolati.....	86
Figura 76 Profili delle masse residue/erose.....	87
Figura 77 Fitting lineare dei dati sperimentali.....	88
Figura 78 Valori assunti dalla retta di fitting fino a completa erosione del gel.....	88
Figura 79 Profili delle masse residue di soft e soft/hard gel.....	89
Figura 80 Profili delle masse residue/erose.....	90
Figura 81 Profili delle masse residue.....	90
Figura 82 Profili delle masse erose.....	91
Figura 83 Confronto geli reticolati.....	92
Figura 84 Valori assunti dalle rette di fitting fino a completa erosione del gel.....	92
Figura 85 Confronto masse residue di gel.....	93
Figura 86 Confronto masse residue soft/hard gel.....	94
Figura 87 Spettro di assorbimento di ioni $\text{Cu}^{2+}$ e di vitamina B12 al tempo 0.....	95
Figura 88 Spettri di assorbimento di ioni $\text{Cu}^{2+}$ e di vitamina B12 relativi alle prove di erosione.....	97
Figura 89 Zoom degli spettri relativi al gel residuo e all'arteria dopo di un'ora di erosione.....	98
Figura 90 Confronto masse residue di gel.....	99
Figura 91 Confronto masse gel erose.....	100
Figura 92 Fitting lineare dei dati sperimentali.....	100
Figura 93 Valori assunti dalla retta di fitting fino a completa erosione del gel.....	101
Figura 94 Valori assunti dalle rette di fitting fino a completa erosione del gel caricato e non caricato.....	102
Figura 95 Evoluzione della massa residua di gel e del tocoferolo residuo in funzione del tempo.....	103

---

---

Figura 96 Andamento del tocoferolo rilasciato nel tempo.....	104
Figura 97 Schematizzazione della ricopertura di gel adesiva allo stent.....	105
Figura 98 Retta di taratura $\text{Cu}^{2+}$ in tampone bicarbonato .....	114
Figura 99 Retta di taratura della vitamina B12 in tampone bicarbonato .....	115
Figura 100 Retta di taratura dell' $\alpha$ - tocoferolo in etanolo .....	116
Figura 101 Spettro dell'assorbanza di una soluzione di $\alpha$ -TC in funzione della lunghezza d'onda.....	117
Figura 102 Spettro traslato rispetto al valore dell'assorbanza a 400 nm .....	117
Figura 103 Retta di taratura dell' $\alpha$ - tocoferolo in etanolo .....	119

---



## Indice delle tabelle

Tabella 1 Principali fattori di rischio per l'aterosclerosi .....	6
Tabella 2 Valori desiderabili di pressione arteriosa.....	7
Tabella 3 Principali parametri dei materiali che potrebbero influenzare la risposta biologica nell'organismo.....	22
Tabella 4 Principali caratteristiche di una generica risposta del corpo ospite ai biomateriali.....	23
Tabella 5 Materiali usati per applicazioni biomediche.....	23
Tabella 6 Caratteristiche tecniche SAD.....	48
Tabella 7 Masse dei componenti delle miscele polimeriche .....	55
Tabella 8 Condizioni operative impiegate nelle preparazione del film polimerici ...	57
Tabella 9 Scheda dati delle prove di erosione .....	65
Tabella 10 Caratteristiche dei test di rilascio.....	66
Tabella 11 Parametri fisici del plasma e del sangue.....	80
Tabella 12 Parametri del fluido e del dispositivo per il calcolo di $Re$ e $Wo$ .....	82
Tabella 13 Valori assunti dai numeri di $Re$ e $Wo$ nei vasi sanguigni .....	83
Tabella 14 Massa di cationi rame presente nel gel tal quale e nel gel caricato con B12 .....	96
Tabella 15 mg teorici e misurati delle masse di B12 al tempo "0" .....	97
Tabella 16 mg teorici e misurati delle masse di tocoferolo al tempo "0" .....	103
Tabella 17 Valori delle masse medie adese allo stent e delle costanti di erosione .	107



## Bibliografia

1. P. Larizza, *Malattie del cuore e dei vasi*, Casa Editrice Piccin – Nuova Libreria, 1992
2. C. Tisi, *Stent coronarici medicati: sviluppo di una nuova tecnica di gel-paving e di un dispositivo di controllo in vitro*. Tesi di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, (2012).
3. G. Fegiz, D. Marrano, U. Ruberti, *Manuale di Chirurgia Generale*, Casa Editrice Piccin, 1996
4. [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazion](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazion)
5. Fondazione Umberto Veronesi, *Malattie del cuore: prevenzione e cura*, Corriere della sera, Milano, 2006
6. D. P. Zipes, P. Libby, R. O. Bonow, E. Braunwald, *Malattie del cuore di Braunwald*, Casa Editrice Elsevier Masson , 2007
7. L. Rabbia, *Stent coronarici a rilascio controllato di farmaco: una tecnica innovativa di ricopertura*. Tesi di Laurea Specialistica in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno, (2009).
8. <http://www.policlinicogemelli.it/area/?id=1281&s=350>
9. G.Grassi, E. Noro, R. Farra, G.Guarnieri, R. Lapasin, M. Grassi. P. Matricardi, T. Coviello, A. Dal Cortivo, F., Alhaique, Rheological and mechanical proprieties of Pluronic-alginate gels for drug-eluting stent coating, *Journal of Controlled Release*, **116** e-85-e87 (2006).
10. N. Nelken, P.A. Schneider, Advancend in Stent technology and drug eluting stents, *Surgical Clinics of North America*, **84** 1203-1236 (2004)
11. O.F Bertrand, R Siphehia., R. Mongrain, J. Rodes, J.C. Tardif, L. Bilodeau, G. Cotè, M.G. Bourassa, Biocompatibility aspects of new stent technology, *JACC*, **32** 562-571 (1998).
12. N. Kukreja, Y. Onuma, J. Daemen, P.W. Serruys, The future of drug-eluting stents, *Pharmacological Research*, **57** 171-180 (2008)
13. L. Barend, N.M.M. Pires, H.M. Warda, P.V. Oemrawsingh, B.J.M. Vlijmen, P. Quax, M. J. Schalij, E. E. Wall, J. W. Jukema Drug-eluting stents: results, promises and problems, *International Journal of Cardiology*, **99** 9-17 (2005).

14. R., Waksman, Drug-eluting stents From bench to bed, *Cardiovascular Radiation Medicine*, **3** 226-241 (2002).
  15. M. Zilberman., R.C. Eberhart., Drug-eluting bioresorbable stents for various applications, *The Annual Review of Biomedical Engineering*, **8** 153-180 (2006).
  16. A.G. Pathiraja, Adhikari R., Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, **5** 1-16 (2003)
  17. <http://www.masteringegneriaclinica.it/Bioingegneria>
  18. D. F. Williams, On the mechanism of biocompatibility, *Biomaterials*, **30** 1-13 (2008)
  19. [http://www.scienzattiva.eu/files/risposte/C\\_Nanobiotech\\_drug\\_delivery.pdf](http://www.scienzattiva.eu/files/risposte/C_Nanobiotech_drug_delivery.pdf)
  20. L. Indolfi., Ingegnerizzazione di stent coronarici per il rilascio controllato di farmaco, Tesi di Dottorato di Ricerca in Ingegneria dei Materiali e delle Strutture, Università degli studi di Napoli, XX Ciclo.
  21. G. Acharya, K. Park Mechanism of controlled drug release from drug-eluting stents., *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58** 387-401 (2006)
  22. S. Venkatraman, F. Boey Release profiles in drug eluting stents: issues and uncertainties, *Journal of Controlled Release*, **120** 149-160 (2007).
  23. E. Batrakova., A.V. Kabanov., Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers, *Journal of Controlled Release*, **130** 98-106 (2008).
  24. E., Chavez, M. Cervantes, A. Naik, Y. N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, A. G. Quintanar, Applications of thermo-reversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulation., *J Pharm Pharmaceut Sci*, **9** 339-358 (2006)
  25. A.A. Barba, M., d'Amore, M. Grassi, S. Chirico, G. Lamberti, G. Titomanlio., Investigation of PluronicVC F127–Water Solutions Phase Transitions by DSC and Dielectric Spectroscopy, *Journal of Applied Polymer Science*, **114** 688–695 (2009)
  26. Malmsten M., Lindman B., Self assembly in aqueous block copolymers solutions, *Macromolecules* **25** 5440-5445 (1992)
  27. Grassi G., Scaggiante B., Dapas B., Farra R., Tonon F., Lamberti G., Barba A.A., Fiorentino S., Fiotti N., Biolo G., Abrami M., Grassi M., Therapeutic potential of Nucleic acid-based drugs in hyper-proliferative vascular diseases, sottomesso a *Current Medicinal Chemistry* (2013)
  28. C. Cuofano, Reticolazione dei geli a base di Alginato- Pluronic F127 con rame bivalente, Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno (2009)
  29. S. Pradhan., S.S. Shukla, K. L. Dorris, Removal of nickel from aqueous solutions using crab shells, *Journal of Hazardous Materials*, **125** 201-204 (2005).
-

- 
30. V. Robertiello, Rilascio di  $\alpha$ -tocoferolo da geli biocompatibili, Tesi di Laurea Ingegneria Alimentare , Università degli Studi di Salerno (2012).
  31. Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxoborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K.H, Vitamin E, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80** (7) 913-938 (2000)
  32. Dalmoro A., Barba A.A., Lamberti G., Grassi M., d'Amore M., Pharmaceutical applications of biocompatible polymer blends containing sodium alginate, *Advances in Polymer Technology*, **31**(3) 219-230 (2012)
-



*Eccomi giunta per la seconda volta ai titoli di coda. Questi però sono quelli che segnano la fine di quel pezzo di vita per me più importante, ed aggiungerei anche il più faticoso e desiderato.*

*Ringrazio il Prof. Gaetano Lamberti, e la Prof. Anna Angela Barba, che con la loro professionalità e con le loro attenzioni, mi hanno consentito di condurre al meglio il lavoro di tesi in un team fantastico.*

*Ringrazio Annalisa, per i suoi preziosi consigli e per il suo supporto. Spero con tutto il cuore che il nostro rapporto possa intensificarsi con il tempo. Sei mitica!*

*Ringrazio Sara, prima amica e poi compagna di studi. Abbiamo iniziato assieme questo percorso, che ha regalato ad entrambe momenti ed emozioni forti: alcuni li abbiamo condivisi e li ricorderò sempre. Grazie per avermi sopportata, sostenuta e capita anche nei momenti più bui.*

*Grazie Ing. De Santis, mi ha insegnato parecchio in questi anni ☺.*

*Grazie... a Margherita, compagna dentro e fuori il laboratorio, e grazie... a Clara, che ha condiviso con me un periodo breve, ma di grande felicità..*

*Grazie a tutti i ragazzi del T5a e del laboratorio di Impianti e Processi, che da più di un anno hanno condiviso con me non solo esperimenti ☺!*

*Grazie agli amici di sempre, e a quelli che sono subentrati dopo, Antonia, Pia, Sara, Chiara, Antonio, Marianna, Roby, Manu, Emilia, Titta: siete stati e sarete per me preziosi. E grazie ad Ivan, per tutto quello*

*che abbiamo costruito e che ci ha uniti in questi anni.*

*Grazie Mamma e grazie Papà, per aver sempre creduto in me. Senza il vostro aiuto ed i vostri insegnamenti non sarei diventata ciò che sono. Grazie a mia sorella, Valentina, la mia gioia. Il nostro legame non potrà che essere sempre più forte.*

*Grazie alle mie Zie, Franca, Elide, e Filo, per l'amore e il conforto che mi avete dato da sempre.*

*Grazie a te, amore mio, qualsiasi parola scriva non basterebbe ad esternare i miei pensieri e le mie emozioni. Spero che il raggiungimento di questo traguardo sia per noi l'inizio di un'avventura ancora più ricca e piena di soddisfazioni.*



