

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO – BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

Dottorato in Neuroscienze

-XXIV ciclo-



**CARATTERIZZAZIONE DELL'EFFETTO ANALGESICO DI UN  
NUOVO LIGANDO DEL RECETTORE I2 IMIDAZOLINICO  
IN UN MODELLO DI DOLORE NEUROPATICO  
INDOTTO DA BORTEZOMIB**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Guido CVALETTI

Tutor: Chiar.mo Prof. Guido CVALETTI

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Cristina MEREGALLI

Matricola n. 058692

Anno Accademico 2010-2011

*“...Se non puoi essere una via maestra  
sii un sentiero.  
Se non puoi essere il sole,  
sii una stella.  
Sii sempre il meglio  
di ciò che sei.  
Cerca di scoprire il disegno  
che sei chiamato ad essere,  
poi mettiti a realizzarlo nella vita.”*

*M.L.King*

# INDICE

<b>SCOPO DEL LAVORO E RIASSUNTO</b>	pag. 4
<b>INTRODUZIONE</b>	
<b>1. Classificazione delle neuropatie periferiche</b>	pag. 9
<b>2. Neuropatia indotta da chemioterapici</b>	pag.11
<b>3. Bortezomib</b>	
3.1 Inibitori del proteasoma	pag.12
3.2 Farmacodinamica di bortezomib	pag.14
3.3 Farmacocinetica di bortezomib	pag.15
3.4 Studi clinici	pag.16
3.5 Modelli in vivo di neuropatia periferica da bortezomib	pag.18
3.6 Dolore neuropatico indotto da bortezomib	pag.20
<b>4. Modelli preclinici di dolore neuropatico da chemioterapico</b>	pag.21
<b>5. Recettori I<sub>2</sub> imidazolinici</b>	
5.1 Descrizione e localizzazione dei recettori I <sub>2</sub>	pag.23
5.2 Recettori I <sub>2</sub> e dolore neuropatico	pag.24
5.3 CR4056: nuovo ligando del recettore I <sub>2</sub>	pag.24
<b>6. Chemioterapici antitubulinici</b>	
6.1 Struttura dei microtubuli	pag.26
6.2 Funzionalità biologica e formazione dei microtubuli	pag.27
6.3 Meccanismo d'azione dei farmaci antitubulinici	pag.28
<b>MATERIALI E METODI</b>	
<b>1. Studi <i>in vivo</i>: modello animale</b>	
1.1 Sviluppo del modello animale	pag.29
1.2 Preparazione delle soluzioni	pag.29

---

1.3 Modalità di somministrazione	
1.3.1 <i>Esperimento 1</i>	pag.30
1.3.2 <i>Esperimento 2</i>	pag.31
1.3.3 <i>Esperimento 3</i>	pag.31
1.4 Metodi di valutazione	
1.4.1 Tossicità generale e peso corporeo	pag.33
1.4.2 Neurotossicità: Velocità di conduzione nervosa	pag.33
1.4.3 Neurotossicità: analisi morfologica del nervo sciatico e dei DRG	pag.34
1.4.4 Test comportamentali: dynamic e plantar test	pag.35
1.4.5 Ematologia ed ematochimica	pag.37
1.5 Analisi statistiche	pag.37
<b>2. Studi <i>in vitro</i>: linee cellulari</b>	
2.1 Reagenti chimici	pag.38
2.2 Colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali	pag.38
2.3 Saggio di citotossicità	pag.39
2.4 Studio di non-interferenza	pag.40
2.5 Analisi statistiche	pag.40
<b>3. Effetto farmacodinamico di bortezomib sull'attività del proteasoma</b>	
3.1 Isolamento PBMC da sangue intero	pag.41
3.2 Lisi dei PBMC ed estrazione proteica	pag.42
3.3 Estrazione proteica da tessuto periferico	pag.42
3.4 Saggio di attività del proteasoma	pag.43
<b>4. Valutazione della forma polimerizzata dell'<math>\alpha</math>-tubulina acetilata</b>	
4.1 Analisi di espressione: Western blot	pag.45
4.2 Estratto da nervo sciatico	
4.2.1 Estrazione proteica	pag.45
4.2.2 Determinazione della concentrazione proteica	pag.46
4.2.3 Separazione elettroforetica e trasferimento proteico	pag.46
4.2.4 Immunoblotting	pag.47
4.2.5 ECL	pag.48
4.2.6 Valutazione densitometrica delle lastre	pag.48

**RISULTATI****1. Studio dell'effetto analgesico di CR4056 in un modello *in vivo* di dolore neuropatico indotto da bortezomib**

- 1.1 Tossicità generale: mortalità, osservazioni generali e peso corporeo pag.51
- 1.2 Neurotossicità: velocità di conduzione nervosa pag.55
- 1.3 Neurotossicità: analisi morfologica del nervo sciatico e dei DRG pag.62
- 1.4 Test comportamentali: dynamic e plantar test pag.66
- 1.5 Ematologia ed ematochimica pag.72

**2. Studi in vitro**

- 2.1 Colture organotipiche di DRG trattati con bortezomib pag.76
- 2.2 Saggio di citotossicità pag.79
- 2.3 Studio di non interferenza pag.79

**3. Effetto farmacodinamico di bortezomib sull'attività del proteasoma pag.81****4. Valutazione della forma polimerizzata dell' $\alpha$ -tubulina acetilata pag.83****DISCUSSIONE pag.86****BIBLIOGRAFIA pag.96****PUBBLICAZIONI pag.106****RINGRAZIAMENTI pag.108**

## **SCOPO DEL LAVORO E RIASSUNTO**

L'indagine principale della seguente tesi di dottorato in Neuroscienze, circa la valutazione di un potenziale farmaco analgesico, si è resa possibile in seguito ad una consolidata collaborazione tra il Dipartimento di Neuroscienze e l'azienda farmaceutica Rottapharm S.p.A (Milano, Italia). Tale azienda può vantare un ricco ventaglio di farmaci originali, tra cui la molecola sperimentale ad azione analgesica valutata nel progetto di questa tesi. Tale collaborazione ha permesso di studiare l'eventuale azione analgesica del CR4056 (noto ligando dei recettori imidazolinici), in un modello *in vivo* di neuropatia dolorosa indotta da bortezomib. La scelta di tale modello è stata effettuata in quanto capace di riprodurre adeguatamente la sintomatologia clinica presente nei pazienti trattati con bortezomib, in cui spesso si osserva l'insorgenza di una neuropatia periferica dolorosa. Attualmente non sono conosciuti farmaci in grado di prevenire o curare i sintomi dolorosi associati a bortezomib, sebbene cure parziali sono fornite da antidepressivi, anticonvulsivanti o anestetici locali. Recenti studi hanno rivelato come farmaci implicati con i recettori imidazolinici siano in grado di modulare il dolore neuropatico. Nello specifico, CR4056 è in grado di revertire il dolore infiammatorio cronico indotto dall'adiuvante completo di Freud, e di agire sul dolore neurogenico indotto dalla capsaicina. L'azione analgesica di CR4056 è stata inoltre valutata anche in due modelli di dolore neuropatico associati alla neuropatia diabetica e alla fibromialgia. Nonostante i recettori imidazolinici non siano ancora stati caratterizzati a livello molecolare, studi farmacologici hanno dimostrato l'azione inibitoria delle monoamino ossidasi (MAO), mediata dai ligandi di tali recettori. Risulta quindi importante sottolineare come le monoamino ossidasi, responsabili del catabolismo delle monoamine, siano implicate nel controllo del dolore neuropatico.

L'interesse ad identificare un effetto analgesico del ligando del recettore imidazolinici I2, CR4056, in un modello di neuropatia dolorosa, ci ha condotti all'identificazione di una dose efficace del farmaco, ed alla sua valutazione quando somministrato in trattamento preventivo e/o terapeutico.

Il procedere del lavoro si è quindi articolato in vari aspetti:

- A.** Una fase di studio *in vivo* dell'effetto analgesico di diverse concentrazioni del composto CR4056 al fine di individuare la dose analgesica efficace sia in un regime di trattamento preventivo che curativo.
- B.** Una fase di valutazione *in vitro* di interferenza tra l'azione antineoplastica del bortezomib e l'azione analgesica di CR4056.

C. Una fase di caratterizzazione di un meccanismo noto di neurotossicità indotta da bortezomib a seguito di una diversa regolazione dell'attività del proteasoma nel modello *acuto* (singola somministrazione) e *cronico* (8 settimane di trattamento); e uno studio di un nuovo potenziale meccanismo di neurotossicità correlato alla polimerizzazione dell' $\alpha$ -tubulina acetilata, analizzato nel nervo sciatico di ratto trattato per 8 settimane.

Nella fase di studio in vivo (**A**) è stato indagato l'effetto analgesico del composto CR4056 in un modello di neuropatia dolorosa già pubblicato dal nostro laboratorio, che ha previsto la somministrazione di bortezomib (0,2 mg/kg) tre volte a settimana per 8 settimane. Grazie a tale modello è stato possibile valutare, una volta insorto il dolore neuropatico, la capacità e persistenza dell'attività analgesica di CR4056, testando diverse dosi e tempistiche di somministrazione (Esperimento**1** e **2**). Tali studi hanno permesso di individuare la dose analgesica efficace per tutto il periodo di trattamento, senza instaurare tolleranza. Mantenendo tale dosaggio anche nello studio combinato di co-somministrazione di bortezomib e CR4056, è stato possibile valutare sia la condizione di efficacia terapeutica che preventiva dell'analgesico in studio (Esperimento**3**). In tutti i protocolli sperimentali eseguiti, è stata valutata sia la tossicità generale dei trattamenti farmacologici, che la neurotossicità mediante la valutazione della velocità di conduzione del segnale (VDC) lungo il nervo caudale dell'animale, e l'analisi delle alterazioni morfologiche del nervo sciatico e gangli della radice dorsale (DRG) prelevati al termine di tutti gli esperimenti. Infine l'utilizzo di test comportamentali hanno permesso di valutare l'insorgenza dello stato allodinico in seguito a trattamento con bortezomib, osservando una diversa risposta ad uno stimolo meccanico tra gli animali trattati e i controlli. Dai risultati ottenuti dagli esperimenti**1** e **2** è stato possibile determinare i 6 mg/kg somministrati giornalmente per due/tre settimane (rispettivamente) come la dose analgesica efficace, in grado di revertire l'allodinia insorta in seguito a trattamento cronico con bortezomib al termine della Fase1. Valutazioni neurofisiologiche hanno invece evidenziato come il CR4056 non sia in grado di agire a livello della neurotossicità periferica, in quanto rilevazioni delle VDC effettuate alla fine della Fase2 di ciascun protocollo sperimentale, mostrano una differenza ancora statisticamente significativa tra il gruppo degli animali trattati con CR4056 e gli animali controllo. Il paragone con degli analgesici noti, come la buprenorfina e la gabapentina, ha evidenziato come il primo farmaco sia attivo solo dopo il primo giorno di trattamento, mentre il secondo ha mostrato un lieve effetto analgesico fino al terzo giorno di trattamento seppur senza significatività. Le dosi maggiori di CR4056 (20-60 mg/kg) sono risultate efficaci subito dopo l'inizio della

somministrazione ma hanno perso la loro capacità analgesica ancor prima del settimo giorno, mostrando un effetto di tolleranza. Le dosi minori (0,6-2 mg /kg) hanno invece mostrato un effetto significativo durante le rilevazioni del primo e quarto giorno, mentre solo la dose CR4056 6mg/kg è stata in grado di mantenere un'attività analgesica prolungata fino al 21°giorno di trattamento. Nell'esperimento<sup>3</sup>, utilizzando la dose di 6 mg/kg indicata dai due esperimenti precedenti, è stata confermata l'efficacia curativa del CR4056, ma soprattutto è stato possibile valutare il regime di trattamento preventivo, co-somministrando il bortezomib e il CR4056 dall'inizio dello studio. L'azione analgesica preventiva è stata confermata al termine delle 6 settimane di trattamento (periodo di rilevazione del dolore neuropatico) con una differenza significativa tra gli animali trattati con bortezomib e quelli in cotrattamento bortezomib/CR4056 dall'inizio dell'esperimento, che persiste fino al termine delle dieci settimane complessive dell'esperimento. Non meno importante, risulta essere la conferma che l'inizio del trattamento con CR4056 nei gruppi di animali trattati con solo bortezomib per sei e otto settimane, è in grado di revertire immediatamente l'allodinia presente per tutta la Fase2 dello studio.

La parte di studi *in vitro* (**B**) ha previsto una prima fase di valutazione dell'inibizione della crescita cellulare indotta da bortezomib, al fine di ottenere la concentrazione di inibizione del 50% della crescita cellulare ( $IC_{50}$ ) da utilizzare nella fase successiva di studio di non interferenza tra il CR4056 e l'attività antitumorale del bortezomib. L'inibizione della crescita cellulare causata dalla somministrazione di bortezomib è stata studiata utilizzando il saggio MTT e tre concentrazioni crescenti di bortezomib (0.05-250 nM). Da questi risultati è stato possibile estrapolare che il bortezomib induce un'inibizione concentrazione-dipendente della crescita cellulare in tutte le linee cellulari testate. Circa la valutazione dell'eventuale interferenza tra il CR4056 e bortezomib, sono stati messi a punto studi in cui le linee di NSCLC e di mieloma multiplo sono state trattate con BTZ e CR4056 da soli o in co-trattamento per 72h. Le diverse linee cellulari sono state esposte alla concentrazione  $IC_{50}$  di bortezomib da solo o in co-trattamento con tre concentrazioni crescenti di CR4056 (3, 10 e 30 $\mu$ M). Questo studio ha dimostrato che il co-trattamento con CR4056 nelle linee RPMI8226 e H929 a tutte le concentrazioni utilizzate, non è in grado di indurre alcuna differenza significativa nella sopravvivenza cellulare rispetto al trattamento con solo bortezomib.

Contrariamente, lo studio effettuato nelle linee cellulari A549 e H460 ha dimostrato che le cellule co-trattate con bortezomib e la dose maggiore di CR4056 (30  $\mu$ M), risultano significativamente diminuite nella sopravvivenza cellulare rispetto a quelle trattate solo con

bortezomb. Tale tossicità risulta però attribuibile all'elevata quantità di DMSO utilizzato per sciogliere la dose maggiore di CR4056, la quale di per sé mostra una significativa riduzione della sopravvivenza cellulare.

Lo studio inerente i meccanismi di neurotossicità (C) ha previsto l'analisi di due differenti meccanismi indotta da bortezomib, mediante l'analisi dell'attività del proteasoma, meccanismo d'azione principale del farmaco stesso, e valutazione della polimerizzazione e presenza di marker di stabilità dei microtubuli.

Secondo i risultati ottenuti è stato possibile vedere nei PBMC degli animali trattati con bortezomib, dei valori di inibizione del proteasoma 20S maggiori del 90% rispetto agli animali controllo sia nella tipologia di trattamento *acuto* che *cronico*. Contrariamente, sono stati osservati diversi tempi di recovery tra il trattamento in *acuto* e quello *cronico*, probabilmente dovuti ad una condizione dose-cumulativa nell'organo target del bortezomib. Inoltre anche a livello del nervo sciatico è stato possibile osservare una elevata inibizione del proteasoma > dell'80% al termine delle 8 settimane di trattamento, verosimilmente correlata all'alterazione morfologica riscontrata del nervo sciatico. A livello dei DRG, è stata invece riscontrata una bassa inibizione del proteasoma, presumibilmente associabile ad una minore compromissione del ganglio. Nel cervello, infine, sono stati rilevati bassi valori di inibizione del proteasoma a conferma della scarsa capacità del chemoterapico di attraversare la barriera ematoencefalica.

Gli esperimenti di immunoblotting sul nervo sciatico di animali trattati per 8 settimane con bortezomib, hanno evidenziato l'implicazione del meccanismo di stabilizzazione dei microtubuli nello sviluppo della neuropatia periferica, effettuando un paragone con altri chemioterapici noti per il loro meccanismo principale di neurotossicità a carico dei microtubuli quali epotilone B e paclitaxel. Successivamente è stata effettuata una valutazione quantitativa della percentuale di polimerizzazione della  $\alpha$ -tubulina acetilata (noto marker di stabilità dei microtubuli), che è stata utile per rilevare l'aumento del 30% di tale valore, in animali trattati con bortezomib rispetto ai controlli.

Questo lavoro è stato in grado di dimostrare l'efficacia analgesica del CR4056 in un modello di neuropatia dolorosa indotta da bortezomib, individuando i 6 mg/kg come il dosaggio migliore per la valutazione del suo utilizzo in regime terapeutico e preventivo.

Inoltre ha confermato a livello cellulare la non interferenza del CR4056 con l'attività antineoplastica del bortezomib. Grazie allo studio dei meccanismi di neurotossicità indotti dal

chemioterapico, questi risultati hanno confermato l'andamento dell'attività del proteasoma in fase *acuta* come riportato nella pratica clinica, approfondendo lo studio con la valutazione dell'inibizione *cronica* del proteasoma. Infine è stato in grado di verificare l'effetto della somministrazione di bortezomib a livello molecolare, osservando l'aumento della  $\alpha$ -tubulina acetilata nella frazione polimerizzata di nervi sciatici degli animali trattati con il chemioterapico rispetto agli animali controllo.

Tali risultati non appaiono importanti solo per il singolo studio dell'analgésico in questione, ma permettono di comprendere la tematica della neurotossicità indotta da bortezomib così da permettere l'identificazione di specifici target su cui sviluppare successivi analgesici e farmaci neuroprotettori. La possibilità inoltre di valutare il regime preventivo del CR4056, ci permetterà in futuro di valutare la possibilità di fornire l'analgésico in soggetti maggiormente predisposti allo sviluppo di dolore neuropatico da bortezomib, al fine di evitare fenomeni di allodinia debilitante per la qualità di vita dei pazienti.

# INTRODUZIONE

## 1. CLASSIFICAZIONE DELLE NEUROPATIE PERIFERICHE

Con il termine *neuropatia periferica* si intende una patologia che si sviluppa a carico del Sistema nervoso Periferico (SNP), ovvero di quel insieme di strutture nervose nelle quali i neuroni ed i loro prolungamenti periferici interagiscono con le cellule periferiche satelliti o cellule di Schwann. Poiché attualmente non è ancora disponibile una soddisfacente classificazione delle neuropatie, è possibile fare riferimento ad una prima suddivisione clinica basata sulla distribuzione del deficit neurologico periferico, distinguendo in: mononeuropatie, multineuropatie, e polineuropatie.

Le *mononeuropatie* o neuropatie focali, si riferiscono ad un danno focalizzato di un singolo tronco nervoso, limitando la sintomatologia al territorio di innervazione del nervo leso; sono spesso conseguenza di una lesione traumatica, di una compressione locale o di processi infiammatori o ischemici.

Le *multineuropatie* o mononeuropatie multiple, si caratterizzano per l'interessamento multifocale, simultaneo o in tempi successivi, di due o più nervi periferici non contigui.

Le *polineuropatie*, infine, sono caratterizzate da un deficit bilaterale e simmetrico di nervi periferici, generalmente dovute a fattori ereditari o ad agenti eziologici che agiscono diffusamente sul SNP.

In mancanza di precisi criteri generali, è possibile classificare le neuropatie del SNP in base ai fattori eziopatologici più evidenti, di seguito vengono riportate le categorie maggiormente rappresentative:

**NEUROPATIE GENETICHE** la cui insorgenza è legata a disordini di tipo ereditario, e recentemente identificabili attraverso impiego della genetica molecolare, che ha permesso l'identificazione di numerosi geni responsabili di specifici quadri clinici. Tali tipologie di neuropatie possono essere ulteriormente classificate in

Forme sensitivo-motorie: tra cui la malattia di Charcot-Marie-Tooth (di tipo I e II) caratterizzate da un deficit periferico distale, e di Dejerine-Sottas (di tipo III) abitualmente associata a mutazioni puntiformi nei geni per due proteine mieliniche, la PMP-22 (DSD A) e la P0 (DSD B) (Chance and Reilly, 1994);

Forme motorie pure caratterizzate da progressiva atrofia muscolare neurogena, in assenza di disturbi sensitivi;

Forme ereditarie sensitive (NES) o sensitivo-autonomiche caratterizzate da preminente degenerazione o atrofia del 1° neurone sensitivo e si caratterizzano per un selettivo deficit delle sensibilità superficiali

#### **NEUROPATIE ASSOCIATE A MALATTIE SISTEMICHE**

Neuropatia diabetica con sintomatologia prevalentemente a carico dei neuroni sensitivi, caratterizzata da iperglicemia che risulta essere la principale causa del danno nervoso, unitamente a disturbi del metabolismo proteico e lipidico.

Neuropatie associate a neoplasia determinate da un'infiltrazione diretta da parte delle cellule tumorali o compressione tumorale di uno o più nervi periferici ("neuropatia paraneoplastica") (Henson and Urich, 1982), o indotte in seguito a trattamento con chemioterapici.

Deficit nutrizionali e deficit di vitamine tra cui B12, B1, B6 e E che possono causare polineuropatie dovute a degenerazione assonale. Le avitaminosi sono disturbi legati ad un regime dietetico inadeguato o a problemi di assorbimento dell'apparato gastro-intestinale (Singleton et al., 2005).

**NEUROPATIE INFETTIVE E AUTOIMMUNITARIE** Neuropatie infettive sia motorie che sensitive possono essere causate sia da agenti infettivi virali quali ad esempio il virus dell'Herpes Zoster, dell'HIV o del Citomegalovirus; sia da infezioni batteriche come la malattia di Lyme, la lebbra e la difterite, spesso associate ad una polineuropatia dolorosa, che si manifesta spesso entro poche settimane dopo l'infezione.

Le neuropatie autoimmuni, invece, derivano da situazioni infiammatorie evocate dal sistema immunitario, spesso dovute alla produzione di anticorpi specifici per antigeni presenti sui neuroni periferici. Alcuni esempi sono la Sindrome di Guillain-Barrè (GBS) legata ad infezioni batteriche o virali che inducono la produzione di anticorpi che generano demielinizzazione (Kuwabara, 2004) e la polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica (CIDP) nella quale la reazione autoimmunitaria colpisce la guaina di mielina o addirittura l'assone.

**NEUROPATIE TOSSICHE** causate da:

Alcool dovuta ad un'azione tossica diretta dell'etanolo, oltre che alle carenze alimentari e vitaminiche proprie dell'alcolismo cronico

Metalli pesanti quali ad esempio il piombo, capace di determinare una neuropatia motoria; l'arsenico e il mercurio che causano invece una neuropatia sensitiva (Monforte et al., 1995)

Farmaci tra cui: composti antineoplastici (quali cisplatino, vincristina), antimicotici (cloroquina, isoniazide), cardiovascolari (amiodarone, perexilina), e altri farmaci.

## **2. NEUROPATIA INDOTTA DA CHEMIOTERAPICI**

CIPN (chemotherapy-induced peripheral neuropathy) si presenta come una neuropatia tossica che si instaura a seguito di un danno diretto sul SNP, ad opera del trattamento con un chemioterapico. Tale condizione, spesso, risulta essere invalidante per la qualità di vita del paziente, al punto da richiedere la sospensione del trattamento farmacologico o la riduzione della dose somministrata, relativamente alle diverse tempistiche di insorgenza degli effetti neurotossici. Alcuni dei farmaci antitumorali causano al nervo dei lievi danni, che assumono rilevanza solo quando combinati con altri farmaci neurotossici o in pazienti con altre comorbidità che predispongono o causano neuropatia. Il riconoscimento della CIPN può essere valutato mediante un'indagine clinica e documentato in modo quantitativo mediante tecniche strumentali, quali ad esempio l'elettroencefalografia (Eng). La problematica maggiore si evidenzia nell'individuare la gravità della neuropatia, in quanto a volte la percezione riportata del paziente mostra delle discrepanze con l'analisi clinica. Negli ultimi anni è stata consolidata una scala di riferimento comune a tutti gli studi sulla CIPN con lo scopo di uniformare lo spettro d'indagine ed essere in grado di effettuare delle comparazioni (Cavaletti et al., 2003). A seconda delle differenti categorie di farmaci antineoplastici presenti in clinica, è possibile riscontrare diversi tipi di lesioni a carico del SNP. Nello specifico ritroviamo:

- ✓ Farmaci platino-derivati (agenti alchilanti) capaci di indurre principalmente un danno a carico del corpo cellulare del neurone sensitivo (neuropatia pura sensitiva), interferendo con la sopravvivenza e con il trasporto di sostanze utili alla sopravvivenza del neurone stesso. Un esempio è dato dal cisplatino, il quale si accumula nei neuroni sensitivi dei gangli dorsali, formando addotti sul DNA causa di apoptosi, e generando una CIPN sensitiva severa e irreversibile (McDonald and Windebank, 2002)

- ✓ Farmaci anti-microtubulinici (taxani, alcaloidi della vinca, epotiloni) associati ad una lesione dell'assone (neuropatia sensitiva-motoria), che interferiscono con il fisiologico processo dei microtubuli cellulari, alterando il corretto fenomeno di migrazione cellulare, organizzazione citoscheletrica e trasporto intracellulare delle macromolecole
- ✓ Farmaci inibitori del proteasoma (bortezomib) rappresentano una classe di farmaci di nuova generazione, aventi come target terapeutico la modulazione del metabolismo proteico, fenomeno il cui squilibrio funzionale può portare a carcinogenesi. L'inibizione del sistema ubiquitina-proteasoma che si occupa della degradazione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nell'apoptosi regolano la morte della cellula maligna. Il danno neuropatico indotto da tali farmaci risulta a carico dei neuroni sensitivi del ganglio e dei nervi periferici, inducendo principalmente una neuropatia di tipo sensitiva (Cavaletti et al., 2007).

### **3. BORTEZOMIB**

#### **3.1 Inibitori del proteasoma**

Il proteasoma è un complesso enzimatico intracellulare adibito alla degradazione delle proteine ubiquitinate, in grado di regolare i livelli proteici interni alla cellula. Dal momento che possiede questo importante ruolo nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, regolando i livelli di molte proteine necessarie per le normali funzioni cellulari, non risulta inattesa la sua rilevante azione terapeutica (Ruschak et al., 2011). Studi preclinici effettuati in differenti modelli murini mostrano come recenti inibitori del proteasoma posseggano un'importante efficacia clinica nel trattamento del mieloma multiplo e sono tuttora in esame per il loro utilizzo nella terapia di altre patologie (Chauhan et al., 2010). Inoltre, studi *in vitro* mostrano come gli inibitori del proteasoma siano in grado di indurre la morte cellulare di cellule tumorali in maniera più selettiva rispetto le cellule sane (Voorhees et al., 2003). Sebbene le basi biologiche di tale fenomeno non siano ancora state pienamente descritte, è possibile vagliare alcune ipotesi (Kisselev and Goldberg, 2001; Voorhees et al., 2003) tra cui:

- maggiore sensibilità delle cellule in rapida proliferazione
- migliore internalizzazione dei farmaci all'interno della cellula tumorale
- minore efficacia e rapidità nel metabolizzare gli inibitori del proteasoma

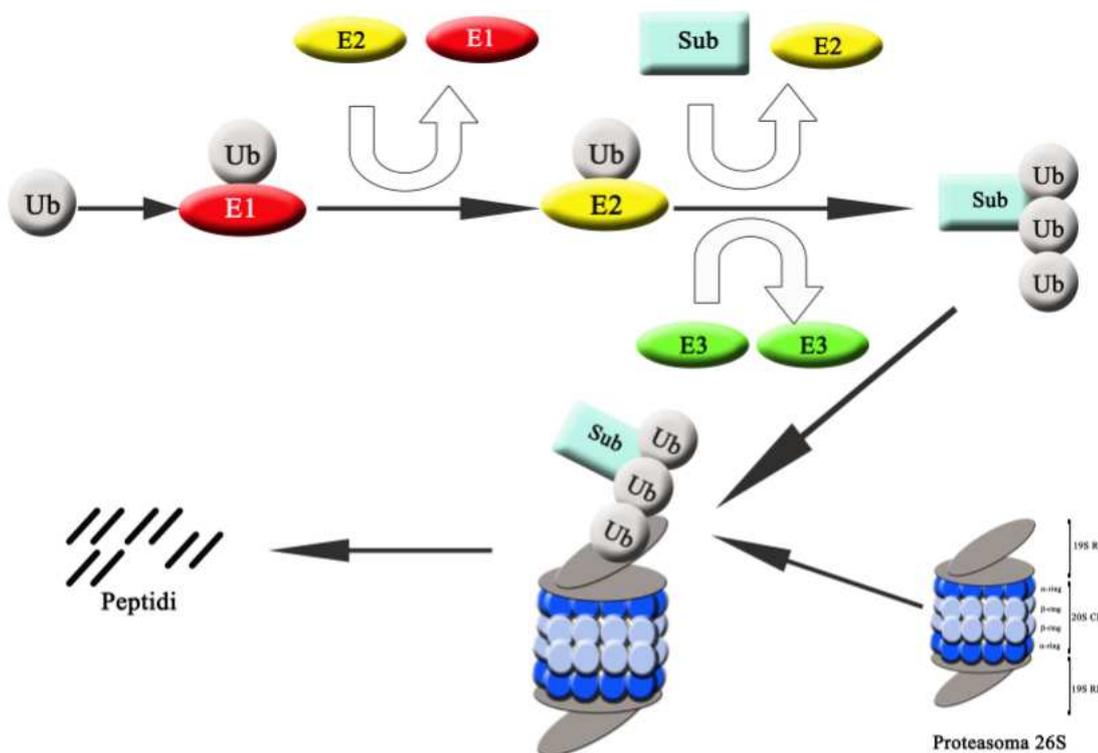
Altre teorie focalizzano l'attenzione sulle diverse funzioni del sistema ubiquitina-proteasoma durante la trasformazione maligna della cellula (Li and Dou, 2000).

Il 26S proteasoma è un complesso cilindrico di 2.5 MDa composto da 44 polipeptidi (Adams, 2003), costituito da una sub-unità principale 20S in cui risiede il centro catalitico che idrolizza il substrato peptidico, e da due complessi regolatori 19S responsabili per il riconoscimento, la deubiquitinazione e il trasloco nel core 20S del substrato.

Prima della degradazione, la proteina bersaglio viene marcata su uno specifico residuo di lisina (K48) con una catena poliubiquitina. Tale processo si articola come di seguito descritto (Figura 1):

- attivazione dell'ubiquitina mediante l'enzima E1(enzima di attivazione);
- trasferimento dell'ubiquitina attivata al residuo cisteinico del sito attivo dell'enzima E2 (enzima transferasi), con formazione di un tioestere;
- catalizzazione del legame c-terminale dell'ubiquitina ad un residuo di lisina ad opera dell' enzima E3 (enzima ubiquitina-ligasi)

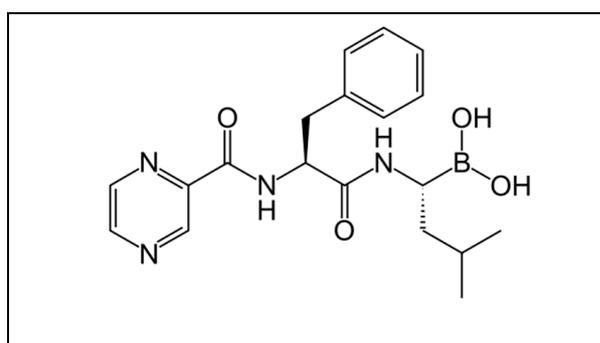
Tale substrato è infine riconosciuto e degradato dal proteasoma in piccoli peptidi (Kropff et al., 2006). Se la degradazione proteica viene interrotta, si genera un accumulo di proteine cellulari che altera lo svolgimento di funzioni importanti per la sopravvivenza cellulare (Mitsiades et al., 2002).



**Figura 1:** Processo di degradazione proteica, E1 enzima di attivazione; E1 enzima transferasi; E1 enzima ubiquitina-ligasi; CP= regione core; RP= regione regolatoria; Ub= ubiquitina)

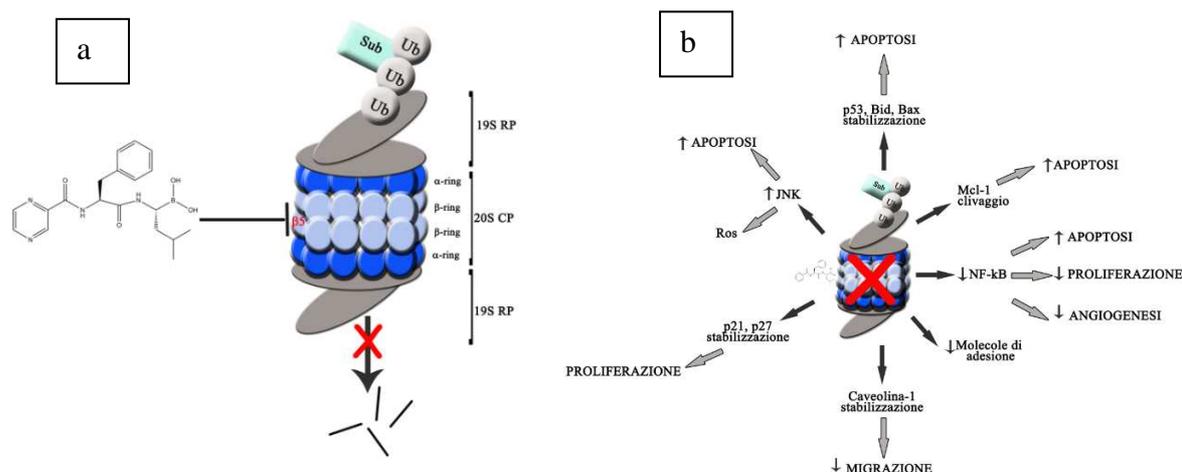
### 3.2 Farmacodinamica di Bortezomib

Il bortezomib (Velcade) è il primo ed unico inibitore del proteasoma approvato nel 2003 dalla Food and Drug Administration per il trattamento della forma recidiva e refrattaria del mieloma multiplo, e recentemente utilizzato per la forma recidiva del linfoma a cellule del mantello (Richardson et al., 2003; Fisher et al., 2006; Kane et al., 2007). Inoltre è in grado di aumentare l'attività di molti agenti chemioterapici in modelli di mieloma multiplo, leucemia acuta, tumore al polmone e pancreatico (Boccardo et al., 2005). Infine riesce ad oltrepassare o revertire la chemioresistenza e aumentare la sensibilità di specifici agenti antitumorali, inclusi doxorubicina, mitoxantrone e dexametasone (Mitsiades et al., 2003).



**Figura 2:** Formula di struttura di bortezomib

Bortezomib è un inibitore competitivo dell'enzima del proteasoma che lega in maniera reversibile il sito chimotripsinico del proteasoma nella subunità  $\beta 5$  della subunità principale 20S (Figura 3a) formando addotti tetraedrici che appaiono essere sufficienti per bloccare la proteolisi delle proteine ubiquitinate.



**Figura 3:** a) Sito d'azione di bortezomib CP= regione core; RP= regione regolatoria; Ub= ubiquitina; sub = substrato) b) Pathway cellulare di proteine coinvolte nell'inibizione da parte di bortezomib

L'inibizione del proteasoma esplicita la sua attività antitumorale attraverso differenti meccanismi, tra cui agire come segnale d'arresto della progressione del ciclo cellulare, l'induzione di apoptosi, inibizione della proliferazione e dell'attività anti-angiogenica (Boccadoro et al., 2005)(Figura 3b). Nello specifico ostacolando il processo di degradazione proteica, si provoca l'accumulo di diverse proteine regolatrici importanti, come l'inibitore IκB associato alla molecola NFκB ( nuclear factor-kappa beta), il gene di soppressione tumorale p53, gli inibitori della chinasi ciclo-dipendenti p21 e p27, e le proteine proapoptotica Bax (Almond and Cohen, 2002) e NOXA (Chen et al., 2011). Durante questo processo vengono quindi alterate varie vie di signaling, tra cui principalmente il *pathway* di NFκB. Nel caso specifico delle cellule di mieloma, l'azione di bortezomib è quella di inibire la proliferazione di tali cellule, indurre l'apoptosi e impedire la crescita tumorale paracrina, mediante l'alterazione dell'interazione delle cellule stromali e delle citochine secrete in maniera NFκB dipendente (Cavo, 2006). Si ottiene mediante :

- induzione dell'apoptosi mediante blocco dell'attivazione di NFκB;
- una diminuzione dell'aderenza delle cellule di mieloma alle cellule stromali del midollo osseo mediante la down regolazione dell'espressione delle molecole di adesione sulle cellule di mieloma;
- inibizione della secrezione di citochine, quali IL-6;
- diminuzione dell'attività angiogenica.

Da diversi studi effettuati su cellule tumorali, sono stati ipotizzati altri meccanismi di apoptosi, tra cui l'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico (Fribley et al., 2004; Nawrocki et al., 2005), la regolazione da parte dai mitocondri (Pei et al., 2004), l'attivazione delle heat shock protein (Mitsiades et al., 2006) e delle caspasi 8 e 3 (Chauhan and Anderson, 2003).

### **3.3 Farmacocinetica di Bortezomib**

Dopo una singola somministrazione in bolo per via endovenosa, la concentrazione plasmatica del farmaco a livello vascolare declina in maniera bifasica con una rapida fase di distribuzione nei tessuti (emivita inferiore ai 10-15 minuti), seguita da una fase terminale di eliminazione di oltre 40 ore (Pekol et al., 2005). La fase di distribuzione ai tessuti non coinvolge alcuni organi come annessi encefalici che non sono raggiunti dal farmaco (in quanto protetti dalla barriera ematoencefalica) e testicolare (Velcade report, 2004). In una caratterizzazione di un modello murino mediante marcatura del bortezomib con il [C<sup>14</sup>], è stato possibile studiare la distribuzione del farmaco agli organi, osservando una lenta eliminazione della radioattività

nel 65-85% della dose totale dopo 6 giorni dalla somministrazione (Adams et al., 1999). L'inibizione massima del proteasoma avviene entro un 1h con recupero dell'azione proteolitica entro 72-96 h dalla somministrazione (Schwartz and Davidson, 2004). Le vie di eliminazione valutate *in vitro*, dimostrano che il bortezomib è primariamente metabolizzato da una reazione di deboronazione ossidativa a uno dei due enantiomeri inattivi che vengono successivamente processati ed eliminati dal rene e nella bile (Schwartz and Davidson, 2004). Altri studi dimostrano, infine, che il bortezomib funge da substrato per molti isoenzimi del citocromo P450 (CYP3A4 e CYP 2C19), i quali risultano essere i principali enzimi responsabili del metabolismo del farmaco (Kane et al., 2003).

### **3.4 Studi clinici**

I primi studi circa la selettiva attività antineoplastica ed efficacia del bortezomib sono stati effettuati dall'Istituto Nazionale del Cancro nel 1995 mediante analisi precliniche effettuate *in vitro* su 60 diverse linee cellulari derivate da tumori multipli (Adams et al., 1999) e in seguito conformate da modelli di *xenotrapianto* in topi nudi, iniettati con tumori del colon, prostata umana e cancro al polmone (Teicher et al., 1999).

Successivi studi di fase I hanno dimostrato l'efficacia di bortezomib nel mieloma multiplo aprendo rapidamente la strada a trial di fase II e III rivolti a dimostrare la tollerabilità e l'attività di bortezomib come singolo agente nella malattia in forma recidiva e refrattaria (Aghajanian et al., 2002; Orłowski et al., 2002). Lo schema di trattamento utilizzato raccomandava 1,3 mg/m<sup>2</sup> dell'area di superficie corporea da somministrare 2 volte la settimana, per 2 settimane (nei giorni 1, 4, 8 e 11), seguita da un periodo di sospensione del trattamento di 10 giorni (giorni 12-21). Fra la somministrazione di due dosi consecutive di farmaco devono trascorrere almeno 72 ore per permettere il recupero delle funzioni del proteasoma nei tessuti sani (Aghajanian et al., 2002). Gli studi di fase II SUMMIT (Study of Uncontrolled Multiple Myeloma Managed with Proteasoma Inhibition Therapy) e CREST (Clinical Response and Efficacy Study of Bortezomib and the Treatment of Relapsing Multiple Myeloma) hanno fornito la prima dimostrazione che il bortezomib costituiva una efficace terapia di salvataggio per circa un terzo/la metà dei pazienti con mieloma multiplo e suggeriva l'esistenza di una relazione dose-risposta *in vivo* (Richardson et al., 2003).

Sulla base di questi favorevoli risultati il bortezomib ricevette nel 2003 la rapida approvazione per uso clinico nelle fasi avanzate di mieloma multiplo da parte della FDA (Food and Drug Administration) americana e successiva approvazione da parte dell'EMA (European Medicines Agency) nel 2004. L'uso consentito fu inizialmente verso pazienti con mieloma

multiplo che avessero ricevuto almeno due precedenti linee di terapia e che avessero malattia progressiva durante il loro ultimo trattamento. A seguito di questi studi fu iniziato un nuovo studio di fase III APEX (Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions) che comparava il bortezomib come agente singolo verso Desametasone ad alte dosi nei pazienti con mieloma multiplo recidivato, dimostrandone la superiorità in termini di remissioni parziali e di tempo di sopravvivenza (Richardson et al., 2005). Successivi studi furono sviluppati con lo scopo di combinare l'effetto antineoplastico di bortezomib ad altri agenti chemioterapici. Un esempio è dato dallo studio in prima linea di bortezomib e melfalan/prednisone (trial di fase III VISTA), in cui l'effetto sinergico di bortezomib risultava molto più efficace in termini di tempi rapidi di miglioramento e aumento della soglia di sopravvivenza (San Miguel et al., 2008). Ancor più recentemente bortezomib è stato usato sempre come farmaco di prima linea per il mieloma, sia come singolo agente che in combinazione con altre standard ed emergenti terapie. Sulla base di questi incoraggianti risultati bortezomib è stato associato a desametasone e lenalidomide (Richardson et al., 2010). In questo studio di fase II, 100% dei pazienti rispondeva al trattamento farmacologico, e ben il 57% di essi presentava una risposta totale. Altri studi combinati con bortezomib sono tuttora in atto, tra i più recenti troviamo melfalan, prednisone e talidomide oppure desametasone, ciclosforamide e lenalidomide (Kumar et al., 2010; Palumbo et al., 2010).

Il profilo di tossicità di bortezomib è stato ben caratterizzato da diversi studi, e riportando vari effetti collaterali, tra cui nausea, diarrea, trombocitopenia, fatica e neuropatia periferica (Jagannath et al., 2004; Lonial et al., 2005). La neuropatia periferica (prettamente sensitiva), che costituisce il fattore dose-limitante nell'impiego clinico del farmaco, si presenta in circa un terzo dei pazienti ed è spesso associata ad una condizione dolorosa. Tale condizione si appare essere un effetto collaterale dose-cumulativo che diventa rilevante dall'inizio del 5° ciclo di trattamento (Cavaletti and Nobile-Orazio, 2007). In caso di severa neuropatia, è richiesta la modifica della dose utilizzata o addirittura l'interruzione del trattamento stesso (Tabella 1). Infine, la condizione neuropatica è in grado di regredire in una buona percentuale di pazienti trattati, sebbene siano necessari alcuni mesi (Richardson et al., 2006). Da letteratura emerge inoltre un' importante condizione di dolore neuropatico che si associa alla presenza di neuropatia indotta da bortezomib (Cavaletti and Nobile-Orazio, 2007). Tale sintomo appare raramente riportato come totalmente disabilitante per il paziente, ma comunque rilevante e limitante.

Severità della neuropatia	Aggiustamento della posologia
<i>Grado 1</i> (parestesia, debolezza e/o perdita di riflessi) senza dolore o perdita di funzionalità	Nessun intervento
<i>Grado 1 con dolore o Grado 2</i> (interferenza con la funzionalità, ma non con lo svolgimento delle attività quotidiane)	Riduzione a 1,0 mg/m <sup>2</sup>
<i>Grado 2 con dolore o Grado 3</i> (interferenza con lo svolgimento delle attività quotidiane)	Sospensione del trattamento con bortezomib fino alla risoluzione della sintomatologia. Una volta eliminata la tossicità, riprendere la somministrazione riducendo la dose a 0,7 mg/m <sup>2</sup> e modificando lo schema terapeutico ad una somministrazione settimanale
<i>Grado 4</i> (neuropatia disabilitante o neuropatia motoria che mette in pericolo la vita o che porta a paralisi) e/o grave neuropatia autonoma	Interruzione del trattamento con bortezomib

**Tabella 1:** Modifiche delle dosi raccomandate in caso di dolore neuropatico e/o di neuropatia sensoriale periferica correlato alla somministrazione di bortezomib (indicazioni fornite da Millennium Pharmaceuticals)

### 3.5 Modelli *in vivo* di neuropatia periferica da bortezomib

Al fine di meglio caratterizzare gli effetti tossici del bortezomib sul sistema nervoso periferico, negli ultimi anni sono stati messi a punto specifici modelli animali in grado di riprodurre efficacemente i danni riscontrati nella pratica clinica. Grazie ai modelli di neuropatia dolorosa ottenuti, è stato possibile effettuare un preliminare studio di un farmaco analgesico attualmente in fase sperimentale, mentre successivi studi di neuroprotezione saranno effettuati successivamente. Il primo modello di neuropatia è stato sviluppato in ratti Wistar femmine nel 2007 dal gruppo di Cavaletti e colleghi (Cavaletti et al., 2007). Gli animali sono stati trattati per via endovenosa con bortezomib 0.08, 0.5, 0.20 e 0.30 mg/kg per 2 o 3 volte la settimana, per 4 settimane. Il trattamento ha determinato la riduzione della velocità di conduzione (VDC) dell'impulso nervoso in modo dose-dipendente già dopo 2 settimane di somministrazione. A livello morfologico è stata osservata una demielinizzazione del nervo sciatico. Il *target preferenziale di bortezomib* sembra infatti colpire le cellule di Schwann nelle fibre nervose periferiche e le cellule satelliti nel ganglio della radice dorsale (DRG). Il successivo modello è stato sviluppato dal gruppo di Meregalli e colleghi, nel 2010 (Meregalli et al., 2010). Le somministrazioni sono state effettuate per 8 settimane alla dose di 0.15 e 0.20 mg/kg 3 volte a settimane, seguite da un periodo di osservazione di 4 settimane. I

dati ottenuti sono risultati parzialmente simili al modello precedente del 2007, evidenziando una severa riduzione delle VDC negli animali trattati con bortezomib ed una evidente assonopatia nelle fibre mieliniche e amieliniche del nervo sciatico. Tuttavia non sono state evidenziati danni a carico dei DRG contrariamente a quanto avvenuto nel modello precedente. Tale esito, probabilmente è motivabile secondo l'ipotesi dell'esistenza di alcuni meccanismi compensatori messi in atto dalla cellula per contrastare la cronica inibizione del proteasoma ad opera di bortezomib (Fuchs et al., 2008). Infine, ma non meno importante, è stato possibile caratterizzare per la prima volta in fase preclinica, la sintomatologia dolorosa della neuropatia periferica indotta da bortezomib, mediante l'ausilio di test comportamentali (Meregalli et al., 2010).

Nel 2009 un altro modello di citotossicità è stato riprodotto ad opera di Casafont e colleghi, con lo scopo di caratterizzare le alterazioni nucleari nei neuroni dei DRG indotte da trattamento con bortezomib (Casafont et al., 2010). In questo studio il farmaco è stato somministrato via endovenosa in ratto Sprague-Dawley testando in primis una singola dose in acuto di 0.5 mg/kg, e successivamente riproducendo un modello cronico in cui bortezomib è stato fornito con dosi ripetute di 0.34 mg/kg 3 volte a settimana per 1 o 2 settimane. I risultati ottenuti utilizzando tale modello mostrano un possibile meccanismo addizionale di neurotossicità, dato da alterazioni della riorganizzazione della polyA RNA, con una severa disfunzione del processo nucleare, del trasporto e inibizione della traslazione dell' mRNA.

Solo recentemente è stato sviluppato il primo modello in topo ad opera del gruppo di Bruna e colleghi (2010) con lo scopo di analizzare le alterazioni elettrofisiologiche, funzionali ed istologiche nel modello *in vivo*. Topi femmina Swiss 0F1 sono stati trattati con ripetute somministrazioni sottocutanee alla dose di 1 mg/kg due volte a settimana per 6 settimane, seguiti da 4 settimane di washout. Questo modello è stato in grado di evidenziare lo sviluppo di una neuropatia assonale, e solo secondariamente la presenza di alterazioni demielinizzanti. Test comportamentali e valutazioni istopatologiche hanno rivelato l'aumento di dolore negli animali trattati con bortezomib, in accordo con le alterazioni funzionali delle fibre amieliniche (Bruna et al., 2010).

Infine è stato sviluppato un recente modello in topo ad opera di Carozzi e colleghi, in previsione di uno studio combinato dell'attività antineoplastica e della neurotossicità di bortezomib, nello stesso contesto animale. Questo studio ha previsto l'utilizzo di vari chemioterapici, quali cisplatino, paclitaxel e bortezomib in topi balb/c. Nello specifico bortezomib è stato somministrato alla dose di 0.4 e 0.8 mg/kg 2 volte a settimana per 4 settimane. I risultati neurofisiologici hanno dimostrato come la somministrazione di

bortezomib sia in grado di indurre una più severa riduzione della VDC caudale rispetto alla misura della VDC digitale, in cui solo la dose alta di bortezomib causa una significativa riduzione delle VDC. Lo studio istopatologico ha rivelato, infine, una degenerazione assonale nel nervo sciatico e dei neuroni sensoriali e cellule satelliti dei DRG (Carozzi et al., 2010).

### **3.6 Dolore neuropatico indotto da bortezomib**

La neuropatia sensitiva dolorosa correlata alla somministrazione di bortezomib in clinica, rappresenta il fattore limitante per la vita dei pazienti affetti da mieloma multiplo. Molti pazienti riferiscono di un dolore con intensità da moderata a severa, con un valore di media della scala VAS (Scala Analogica Visiva). Valutazioni quantitative sensitive (QST: Quantitative Sensory Test) hanno permesso di evidenziare condizioni di dolore neuropatico causate da disfunzioni in tutte e tre i maggiori tipi di fibre (A $\beta$ , A $\delta$ , e C) del nervo sensitivo (Cata et al., 2007). Nello specifico, il dolore neuropatico risulta una condizione cronica che affligge milioni di persone nel mondo. E' caratterizzato da anomalie sensoriali, quali un'insorgenza spontanea o/e sensazione di calore intermittente, un'esagerata risposta agli stimoli nocivi ed una sensazione dolorosa in risposta a stimoli innocui. Il dolore neuropatico è descritto dai pazienti come "formicolio, scossa elettrica, ...." I fattori caratterizzanti sono l'allodinia e l'iperalgisia. La prima viene descritta come una sensazione dolorosa in seguito ad uno stimolo generalmente non doloroso, mentre la seconda è definita come un'incrementata sensibilità a uno stimolo normalmente doloroso. Poiché i meccanismi di induzione e mantenimento del dolore neuropatico risultano di difficile approccio e caratterizzazione, non è sorprendente il fatto che attualmente i farmaci conosciuti risultino inefficaci e producano, invece, indesiderati effetti collaterali. La comprensione dei meccanismi molecolari del dolore neuropatico potrebbe permettere un miglioramento delle conoscenze circa i trattamenti attualmente in uso. Il meccanismo principale di sensitizzazione del neurone in seguito al danno del nervo periferico è caratterizzato da un abbassamento della soglia per l'attivazione del potenziale d'azione e un'augmentata risposta agli stimoli dati. Oltre a tale meccanismo è risaputa l'implicazione di cambiamenti nell'espressione ed funzione dei recettori, enzimi, e canali ionici voltaggio dipendenti, nei nervi periferici, neuroni dei DRG, e sinapsi nel pathway nocicettivo nel sistema nervoso centrale (Scholz and Woolf, 2007; Reichling and Levine, 2009). In seguito al danno al nervo, i neuroni dei DRG risultano danneggiati e diventano più eccitabili, esibendo un'attività spontanea anormale (Devor, 2009; Wu et al., 2001), in grado di contribuire ad indurre e modulare il dolore.

Nello specifico, in seguito ad un danno al nervo periferico nei modelli animali si osserva una down-regolazione della maggior parte dei canali del sodio voltaggio dipendenti (Wang et al., 2011) escludendo un ruolo nell'induzione del dolore; contrariamente a quanto accade nei pazienti in cui somministrando dei bloccanti dei canali del sodio si inibisce una varietà di sindromi neuropatiche dolorose (Priest and Kaczorowsky, 2007).

Attualmente per la cura del dolore neuropatico il trattamento predominante consiste nell'utilizzo degli antidepressivi triciclici (TCA's), gli anticonvulsivanti (es: gabapentina, o carbamazepine) e gli anestetici locali (lidocaina). I TCA agiscono principalmente inibendo il re-uptake della serotonina e della norepinefrina entro le corna dorsali; gli anticonvulsivanti, invece, sono implicati nella stabilizzazione delle membrane.

Ad esempio Gabapentina aumenta i livelli extracellulari dell'acido gaba-amino butirrico (GABA), causandone il rilascio dalle cellule gliali. Per i farmaci che invece agiscono come anestetici locali, è ipotizzabile che perpetuino il loro effetto analgesico bloccando i canali del sodio.

#### **4. MODELLI PRECLINICI DI DOLORE NEUROPATICO DA CHEMIOTERAPICO**

La valutazione del dolore neuropatico negli esseri umani risulta di difficile approccio a causa della troppa invasività nelle pratiche di indagine, che sono in grado di indurre danni irreversibile. Per questo motivi si è resa necessaria la validazione e facile riproducibilità dei modelli animali di dolore neuropatico volti alla comprensione dei meccanismi implicati nella genesi del dolore e la valutazione dei potenziali analgesici per il trattamento di tale sintomatologia. In letteratura sono riportati differenti modelli animali di neuropatia dolorosa indotta da chemioterapici distinti a seconda dei diversi farmaci utilizzati, tra cui derivati dei platini, i taxani, e alcaloidi della vinca. Un esempio di tabella riassuntiva è presente di seguito, dove mostrati a titolo rappresentativo le molteplici combinazioni di modelli animali già sviluppati (Tabella 2).

	ANIMALI	SCHEDULA	DURATA	MS	DC
<b>VINCRISTINA</b>					
	Ratti maschi SD, 250-300gr	0.1mg/kg7d, 5d/wk	12d	IV	1
	Ratti maschi SD, 180-200gr	0.075mg/kg/d	10d	IV	0.75
	Ratti maschi SD, 300-400gr	0.1mg/kg/d	14d	IV per infusione	1.4
	Ratti maschi SD, 160-180gr	0.15mg/kg/2d	10d	IV	0.75
	Ratti maschi SD, 200-300gr	0.05mg/kg/d	10	IP	0.5
	Ratti maschi SD, 250-300gr	0.1mg/kg7d, 5d/wk	12d	IP	1
	Topi maschi CD1, 30-35gr	1.7mg/kg, 2wk	10wk	IP	34
	Topi maschi C57BL/6 6w	0.1mg/kg x1	14d	IP	0.1
	Topi maschi ICR, 22-30gr	0.1mg/kg/d	14d	IP	1.4
	Topi maschi ICR, 20gr	0.125mg/kg, 2/wk	6wk	IP	1.5
<b>PACLITAXEL</b>					
	Ratti femmine Wistar , 250gr	8mg/kg/wk; 16 mg/kg/wk	5wk	IP	40; 80
	Ratti femmine SD, 320-450gr	18mg/kg/d 0 e d 3	4d	IV	36
	Ratti maschi SD, 180-200gr	16mg/kg/wk; 32mg/kgx1	5wk	IP	80;32
	Ratti maschi SD, adulti	2mg/kg/2 d	7d	IP	8
	Ratti maschi SD, 280-300gr	1mg/kg/d, 5 d/wk	2wk	IP	10
	Topi femmine C57BL/6, 8wk	60mg/kg/2 d	7d	IV	180
	Topi	10mg/kg x 1	1d	IP	10
	Topi maschi C57BL/6, 6wk	5mg/kg x 1	14d	IP	5
<b>DOCETAXEL</b>					
	Ratti maschi Fisher, adulti	10mg/kg, 1/qw	4wk	IV	40
<b>CISPLATINO</b>					
	Ratti femmine Swiss, 10wk	2mg/kg, 2/wk	4.5wk	IP	18
	Ratti maschi SD, 150-175gr	2 o 1mg/kg/3d	4wk	IP	15
	Ratti maschi SD, 150-175gr	3mg/kg, 1/wk	5wk	IP	15
	Ratti maschi Wistar, 280gr	2mg/kg, 1/wk	5wk	IP	10
	Ratti maschi SD, 175-225gr	0.5mg/kg/d	3d	IP	1.5
	Ratti maschi SD, 220-250gr	2mg/kg x 1	5d	IV	2
	Topi femmine Swiss, 10wk	5mg/kg, 1wk	8wk	IP	40
	Topi maschi CD1, adulti	6mg/kg ogni3 wk	15	SC	30
	Topi maschi C57BL/6, 14wk	2.3mg/kg, 5 d/5 d rest/5d	2wk	IP	23
<b>OXALIPLATINO</b>					
	Ratti maschi SD, 175-200gr	2mg/kg, 2/wk	4wk	IV	16
	Ratti maschi SD, 175-200gr	6mg/kg x 1	30hr	IP	6
	Ratti maschi SD, 220-250gr	2mg/kg x 1	5d	IV	2
	Topi maschi C57BL/6, 6wk	3mg/kg x 1	10d	IP	3
	Topi maschi C57BL/6, 14wk	3mg/kg, 5 d/5 d rest/5d	2wk	IP	30

**Tabella 2:** modelli animali di neuropatia dolorosa da Vincristina/ Paclitaxel / Docetaxel/ Cisplatino/ Oxaliplatino; DC dose cumulativa (mg/kg/animale); MS modalità di somministrazione; d giorno; hr ora; IP intraperitoneale; IV intravenosa; SC sottocutanea; wk settimana

Per quanto riguarda invece lo studio del modello di dolore neuropatico da bortezomib è possibile fare riferimento all'articolo di Meregalli et al., 2010, in cui il modello viene ben caratterizzato sotto l'aspetto elettrofisiologico, istologico e comportamentale. L'utilizzo di tale modello ha permesso lo studio di un farmaco analgesico in fase sperimentale (CR4056) che risulta essere il tema principale di questa tesi.

## 5. RECETTORI I<sub>2</sub> IMIDAZOLINICI

### 5.1 Descrizione e localizzazione dei recettori I<sub>2</sub>

Due decenni di studi circa l'indagine sulla funzionalità e la natura molecolare dei recettori imidazolinici non sono stati sufficienti per stabilire l'effettivo ruolo degli stessi. I siti di legame delle imidazoline, conosciuti come recettori delle imidazoline (IRs), sono ampiamente distribuiti nelle cellule del sistema nervoso centrale (CNS) e periferico (PNS), nel fegato, rene e cuore (Gentili et al., 2006). Negli ultimi anni, vari studi hanno portato all'identificazione di tre classi di tali recettori: *I1* (recettori imidazolinici che mediano l'azione simpato-inibitoria nel diminuire la pressione del sangue), *I2* (recettori che sono un importante sito di legame allosterico per le monoamino ossidasi –MAOs-) e l' *I3* (recettore che lega le secrezioni d'insulina delle cellule  $\beta$  del pancreas). Nonostante i molti studi effettuati al fine di meglio caratterizzare tali recettori, solo nel caso della classe *I1* è stato possibile individuare la funzione dello stesso, implicato nell'attività ipotensiva *clonidina-like*. I *I2Rs* sono localizzati principalmente esternamente alle membrane dei mitocondri dei tessuti periferici e centrali (Tesson and Parini, 1991), e si dividono in *I2a* e *I2b* a seconda del loro grado di affinità con l'amiloride, alto o basso, rispettivamente (Parini et al., 1996). Contrariamente lo studio molecolare dei recettori di classe *I2* presenta ancora molti punti sconosciuti, seppur esistono molte evidenze sperimentali circa la loro capacità di modulare a livello funzionale l'attività delle MAOs, enzimi mitocondriali implicati nella deaminazione ossidativa dei neurotrasmettitori (Raddatz et al., 2000 e Eglen et al., 1998). Risulta importante sottolineare che grazie agli studi preliminari di Vega e colleghi, è stata dimostrata la presenza di enzimi relativi al metabolismo delle catecolamine (MAO) in una sottopopolazione di neuroni sensoriali primari nei gangli della radice dorsale (DRG) (Vega et al., 1991). Risulta quindi probabile un'azione diretta dei ligandi del recettore *I2* con i siti di legame del recettore stesso, localizzati sulle monoamine ossidasi (Cata et al., 2006; Adams et al., 1999). Infine, risulta ormai consolidato in letteratura la presenza dei *I2Rs* nelle aree cerebrali implicate nella percezione e nella risposta agli stimoli dolorosi (Ruggiero et al., 1998).

L'importanza fisiologica dei ligandi dei recettori imidazolinici risulta sufficiente per spiegare la probabile implicazione di *I2R* in diverse patologie (Kennedy et al., 2010; Lenz, 2003). Infatti, recentemente è stato possibile studiare come i recettori di classe *I1* e *I2* mostrino un ruolo importante nella proliferazione cellulare, regolazione del grasso corporeo,

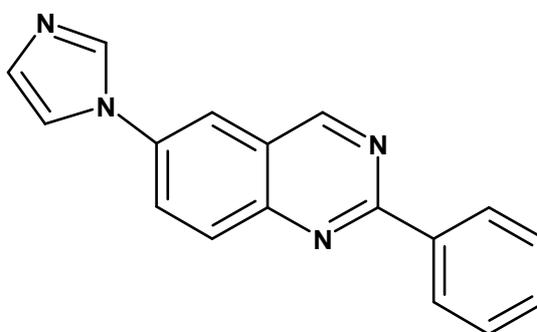
infiammazione e alcune malattie psichiatriche come la depressione. Altre analisi, inoltre, sono stati in grado di evidenziare l'efficacia di alcuni agenti affini per le imidazoline, nel campo dei tumori, dello stress, dell'adesione cellulare, oltre che nel dolore neuropatico e infiammatorio (Head and Mayron, 2006).

## 5.2 Recettori I<sub>2</sub> e dolore neuropatico

La neuropatia periferica dolorosa risulta essere un noto effetto collaterale dose-limitante associato ai trattamenti con chemioterapici (Aley and Levine, 2002), come vinca alcaloidi, taxani, e composti platini derivati. Nonostante i noti progressi nello sviluppo di nuovi farmaci analgesici, è sempre più viva la necessità di identificare agenti terapeutici in grado di bloccare le anormali sensazioni di dolore, senza intaccare la regolarità della trasmissione del segnale doloroso. Recenti studi sono stati effettuati circa l'interazione di alcuni ligandi endogeni dei recettori I<sub>2</sub> con il sistema degli oppioidi. In particolare è stato dimostrato in roditori, come l'azione dell'*Agmatina*, un agonista endogeno dei recettori delle imidazoline, sia in grado di modulare effetto analgesico della morfina, bloccandone anche lo sviluppo di tolleranza (Lione et al., 1998). L'implicazione del pathway noradrenergico potrebbe avere una rilevanza importante nel controllo della sensibilizzazione centrale attraverso i nocicettori spinale.

## 5.3 CR4056: nuovo ligando del recettore I<sub>2</sub>

In un recente studio condotto dal gruppo di ricerca di Ferrari e colleghi (2011), è stato possibile caratterizzare l'effetto farmacologico di un nuovo ligando di I<sub>2</sub>R (CR4056) e testare l'ipotesi che questo composto sia in grado di indurre un effetto analgesico in due differenti modelli sperimentali di dolore (Ferrari et al., 2011).



**Figura 4:** Formula di struttura chimica del CR4056 [2-phenyl-6-(1H-imidazol-1-yl)] quinazoline, con formula molecolare C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub> e peso molecolare di 272.30).

Dallo studio preliminare condotto dalla ditta farmaceutica RottapharmS.p.A, Monza (MB) si evince come il valore di affinità di legame ( $IC_{50}$ ) di CR4056 con i recettori  $I_2$  imidazolinici ( $596 \pm 76$  nM), ottenuto mediante l'inibizione con il radioligando specifico [ $^3H$ ]2-BFI, risulti coerente con altri composti presenti in letteratura. Successivamente è stato dimostrato mediante studi di affinità e funzionalità con i siti di MAO, che CR4056 è in grado di inibire sia il legame che l'attività enzimatica di MAO-A in maniera molto più significativa rispetto l'enzima MAO-B.

Studi di farmacologia sono stati effettuati circa l'attività analgesica di CR4056 mediante l'utilizzo di due modelli animali: il dolore neurogenico indotto da caspaicina e il dolore acuto indotto dal freddo. Tali test hanno dimostrato come l'interazione diretta con i siti  $I_2$  risulti un essere una fondamentale necessità per consentirne l'attività analgesica; inoltre grazie al primo modello citato è stato possibile notare una sinergia tra CR4056 e la morfina, possibile in quanto CR4056 non presenta affinità per i recettori oppioidi (Ferrari et al., 2011). Nonostante l'effetto di CR4056 sui livelli di catecolamine a livello centrale, CR4056 non induce cambiamenti del comportamento generale degli animali, sulla loro attività di locomozione, e sulla coordinazione motoria, verificato mediante test comportamentali quali Irwin, Rotarod e open-field test (dati non pubblicati). Grazie a studi di farmacocinetica inoltre è stato possibile valutare un rapido assorbimento del farmaco dopo la somministrazione orale del farmaco, mostrandone un completo assorbimento e un'efficace attraversamento della barriera ematoencefalica, in accordo con l'effetto analgesico noto a livello centrale.

Inoltre, in seguito ad un singolo trattamento orale in ratti Wistar femmine con un dosaggio di 20 mg/kg, è stato possibile rilevare un significativo aumento dei livelli di norepinefrina (NE) nel cervello e solo una tendenza di aumento di tale catecolamina nel midollo spinale, mentre il trattamento cronico con CR4056 di quattro giorni successivi ha indotta un aumento significativo di NE in entrambi i tessuti. Tale risultato ha permesso di confermare i dati presenti in letteratura circa il ruolo della NE nel controllo spinale e soprasspinale della modulazione del dolore (Jasmin et al., 2003; Bannister et al., 2009).

## 6. CHEMIOTERAPICI ANTITUBULINICI

Gli agenti antitubulinici sono prevalentemente molecole di origine naturale, derivati da piante ed organismi marini. I primi composti di origine vegetale, utilizzati efficacemente in clinica, furono gli *alcaloidi della vinca* estratti da *Catharanthus roseus* a partire dagli anni '50. Nei decenni successivi è stata messa in risalto anche l'azione dei *taxani*, una classe di molecole provenienti da estratti di *Taxus brevifolia*.

La scoperta di un target farmacologico nella cura dei tumori, quale la tubulina, ha dato il via alla ricerca di nuove molecole aventi lo stesso bersaglio d'azione. Tali molecole sono state genericamente classificate come agenti stabilizzanti i microtubuli; tra questi i più promettenti sono la discodermolide, la eleuterobina e gli epotiloni. In particolare questi ultimi hanno dimostrato *in vitro* di essere maggiormente competitivi rispetto al paclitaxel dimostrando elevata affinità per la tubulina e suggerendo l'esistenza di un comune sito di legame sul bersaglio (Ojima et al., 1999).

Il meccanismo d'azione degli antitubulinici consiste nella loro capacità di interferire con i microtubuli, coinvolti nella costruzione del fuso mitotico durante la fase M del ciclo cellulare, rallentando notevolmente la crescita tumorale. In ogni caso, sebbene nelle cellule proliferanti questa sia la loro principale funzione i microtubuli possono essere implicati anche in altre funzioni cellulari come la migrazione, l'emissione del cono di crescita neuronale ed il trasporto assonale di macromolecole.

### 6.1 Struttura dei microtubuli

La struttura cellulare del citoscheletro è costituita principalmente da:

- *filamenti di actina*, costituiti da due subunità diverse che interagiscono formando una serie di fasci paralleli di sostegno meccanico per la membrana cellulare, necessari soprattutto nelle divisioni cellulari
- *microtubuli*, costituiti dall'assemblaggio di subunità  $\alpha$  e  $\beta$  e implicati in numerosi e importanti processi quali: il trasporto intracellulare di macromolecole, la segregazione cromosomica durante la divisione cellulare, il mantenimento della morfologia cellulare, il differenziamento e l'apoptosi (Manfredi and Horwitz, 1984; Wang et al., 1999; Jordan and Wilson, 2004).
- *filamenti intermedi*, costituiti da subunità fibrose che si uniscono a formare una struttura a cordone, agendo da supporto strutturale, soprattutto nelle cellule sottoposte a resistenza meccanica

I primi due componenti del citoscheletro presentano una dinamicità nel fenomeno di associazione e dissociazione delle subunità di proteine globulari che li costituiscono. Nella struttura del citoscheletro sono inoltre presenti altre specie proteiche accessorie in grado di legare i filamenti tra loro, e strutture di movimento ameboide o delle ciglie, come la membrana plasmatica.

## **6.2 Funzionalità biologica e formazione dei microtubuli**

I microtubuli presentano un meccanismo di polimerizzazione e depolimerizzazione necessario per il mantenimento della dinamicità degli stessi, sfruttando l'energia ottenuta dall'idrolisi di GTP (Jordan and Wilson, 2004). Tale meccanismo prevede una fase di *enucleazione* ed *elongazione* durante i quali la formazione di un corto nucleo è seguita dall'aggiunta all'estremità positiva di dimeri di tubulina con legami non covalenti. Evidenze pregresse hanno dimostrato la polarità intrinseca dei microtubuli, dovuta alla disposizione della tubulina. Infatti le subunità della tubulina risultano orientate tutte nella stessa direzione dirette verso la stessa estremità del microtubulo, determinando così una differenza strutturale e chimica tra le due estremità. Da recenti studi *in vitro* è stato dimostrato che una bassa concentrazione di tubulina libera è in grado di indurre un lento accorciamento di entrambe le subunità positiva e negativa, che rallenta ulteriormente (fino al punto di equilibrio dinamico) una volta che la concentrazione di tubulina viene incrementata. Andamento contrario, invece, viene evidenziato se le concentrazioni di tubulina libera sono elevate; infatti in questo caso si ha una formazione spontanea dei microtubuli senza il bisogno di alcuna proteina iniziatrice quale la tubulina  $\gamma$ , come invece avviene fisiologicamente nella cellula a partire dal centrosoma. La cellula quindi mantenendo bassa la concentrazione di tubulina, è in grado di modulare la dinamicità tipica dei microtubuli, regolamentandone la formazione. Il fenomeno di polimerizzazione all'interno della cellula viene organizzato da strutture adibite, quali i *centri di organizzazione dei microtubuli*, in grado di fungere da base per il loro allungamento. Il principale centro conosciuto è il centrosoma, costituito dai centrioli (una coppia di cilindretti cavi) la cui parete è formata da nove triplette di microtubuli. Dai centrioli si organizzano quindi i microtubuli che danno origine al fuso mitotico, necessario per indirizzare i cromosomi ai due poli della cellula in divisione.

Il meccanismo di dinamicità risulta infine regolato anche da altre proteine associate ai microtubuli, tra cui: le proteine associate ai microtubuli (MAPs) che convertono la rete instabile di microtubuli in una ossatura relativamente permanente, e la presenza di proteine che incapsulano l'estremità crescente della tubulina impedendone la depolimerizzazione.

### 6.3 Meccanismo d'azione dei farmaci antitubulinici

I farmaci antitubulinici sono riconosciuti tali, in quanto in grado di modulare l'equilibrio di polimerizzazione della tubulina, stabilizzando o meno la formazione dei microtubuli e regolandone il ciclo cellulare. Dal momento che il corretto movimento dei cromosomi e l'appropriata segregazione nelle cellule figlie richiede una costante dinamicità, la mitosi risulta un processo altamente sensibile all'azione dei farmaci attivi sui microtubuli.

In letteratura sono attualmente presenti principalmente due classi di farmaci antitubulinici:

- farmaci in grado di prevenire la depolimerizzazione della tubulina (taxani ed epotiloni)
- farmaci in grado di prevenire la polimerizzazione della tubulina (vincristina) (Wang et al., 1999).

In entrambi i casi, la disorganizzazione dei microtubuli comporta l'induzione dell'apoptosi in cellule tumorali attraverso la fosforilazione e quindi inattivazione di bcl-2 (Haldar et al., 1995).

Le conseguenze che gli agenti antitubulinici producono sulla funzione cellulare sono complessi in quanto coinvolgono differenti pathway apoptotici di trasduzione del segnale, tra cui: c-Raf-1/Ras/Bcl-2, p53/p21WAF1/CIP1, Protein chinasi A e MAPK/p34cdc2-ciclina A e B kinasi. Inoltre la destrutturazione dei microtubuli causata dagli agenti antitubulinici si concretizza nell'induzione del *tumor-soppressore* p53, nell'inibizione delle chinasi ciclina-dipendenti, nella attivazione e inattivazione di diverse protein chinasi associate direttamente o indirettamente con la fosforilazione di bcl-2 (Basu and Haldar, 1998).

## MATERIALI E METODI

### 1. STUDI *IN VIVO*: modello animale

#### 1.1 SVILUPPO DEL MODELLO ANIMALE

Per gli studi *in vivo* sono stati utilizzati ratti Wistar femmine (fornitore Harlan Italia, Corezzana, Italia) del peso corporeo iniziale compreso tra i 195 ed i 200 g. La scelta del ceppo e del sesso è stata fatta in accordo con dati già presenti in letteratura riguardanti i modelli animali di neuropatia periferica insorta a seguito di trattamenti cronici con bortezomib (Cavaletti et al., 2007; Meregalli et al., 2010).

Per l'intero periodo della sperimentazione gli animali vengono stabulati 3 per gabbia, in opportuni locali di stabulazione caratterizzati da un ciclo di luce-buio artificiale di 12 ore e da temperatura e umidità di  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $55\pm 10\%$  rispettivamente che vengono mantenute controllate e costanti. Per tutta la durata dell'esperimento gli animali dispongono di cibo ed acqua *ab libitum* e giornalmente viene valutato lo stato di salute e benessere dell'animale.

Le procedure di trattamento e cura degli animali sono state messe a punto in conformità con la legislazione nazionale (D.L. n. 116, *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana*, suppl. 40, Feb. 18, 1992) e le disposizioni e le linee guida internazionali (direttiva del Concilio CEE 86/609, OJ L 358, 1, Dec.12, 1987; *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, U.S. National Research Council, 1996).

#### 1.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI

Il bortezomib (venduto da LC Laboratories, Woburn, MA) è una polvere pura, priva di eccipienti, che viene conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; la buprenorfina (Temgesic ® 0.3mg/ml) è venduta sotto forma di soluzione iniettabile mentre il CR4056 e la gabapentina (entrambe polveri) sono gentilmente fornite dalla ditta farmaceutica Rottapharm-Madaus (Monza, Italia).

Per gli studi *in vitro* sia il bortezomib che il CR4056 vengono preparati immediatamente prima dell'uso sciogliendoli in DMSO e diluendoli nel medium di cultura.

Per i diversi esperimenti *in vivo* la soluzione iniettabile di bortezomib viene preparata fresca al momento dell'utilizzo attraverso la risospensione graduale della polvere con 5% Tween 80 e, successivamente con 5% etanolo 100%. A questa soluzione, mantenuta in ghiaccio, viene aggiunta lentamente una soluzione fisiologica fredda di NaCl 0.9% immediatamente prima della somministrazione.

Il bortezomib viene somministrato per via endovenosa, nella vena caudale dell'animale mediante previo riscaldamento della coda in un bagnetto termostato a 42°C al fine di vasodilatare la vena e renderla turgida e visibile all'operatore.

Il CR4056, risospeso in 5% metilcellulosa e miscelato mediante l'impiego di un potter, viene somministrato giornalmente per via orale attraverso l'utilizzo di un catetere alloggiato su una siringa da insulina. Sia la gabapentina che le buprenorfina sono entrambe sciolte in acqua iniettabile sterile, e somministrate oralmente la gabapentina e per via sottocutanea la buprenorfina.

### **1.3 MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE**

Nell'esperimento1 (studio pilota di dose-finding) le dosi di bortezomib, buprenorfina e CR4056 sono selezionate sulla base di precedenti studi già presenti in letteratura (Meregalli et al., 2010; Canta et al., 2009a, Ferrari et al., 2011) mentre nell'esperimento2 le tre dosi di CR4056 sono state ricavate a seguito dei risultati ottenuti dall'esperimento di dose-finding. La dose di gabapentina è stata scelta da dati di letteratura (Kusunose et al., 2010). Infine per l'esperimento3, è stata utilizzata un'unica dose di 0,6 mg/kg individuata dai due esperimenti precedenti, in quanto ritenuta opportuna per consentire una corretta valutazione dell'effetto terapeutico e preventivo dell'analgescico CR4056.

#### **1.3.1 Esperimento 1**

Come rappresentato nel flow-chart riportato in Fig. 5A, l'esperimento1, per il quale sono stati impiegati 70 ratti Wistar femmina, consta di due fasi della durata di 8 e 2 settimane rispettivamente. All'inizio della Fase1 gli animali sono stati randomizzati in due gruppi: un gruppo di animali di controllo non trattati (CTRL, n=20) e un gruppo trattato per via endovenosa con bortezomib alla dose di 0.2mg/kg 3 volte la settimana per 8 settimane (BTZ, n=50). Al termine della Fase1, il trattamento con bortezomib è stato interrotto e gli animali sono stati ri-randomizzati in gruppi omogenei sulla base dei risultati ottenuti con il Dynamic test. I 20 animali di controllo, che non sono stati trattati con bortezomib durante la Fase1, sono stati divisi in un gruppo di controllo (CTRL, n=10) e un gruppo che inizia il trattamento orale con CR4056 alla dose di 60mg/kg (CR4056 60, n=10).

Gli animali che erano stati trattati con bortezomib invece vengono divisi in 5 sotto-gruppi: 3 gruppi iniziano il trattamento orale con CR4056 alle dosi di 6, 20 o 60mg/kg rispettivamente (BTZ+CR4056 6; BTZ+CR4056 20; BTZ+CR4056 60, n=10 per ciascun gruppo), 1 gruppo inizia il trattamento sottocutaneo con buprenorfina alla dose di 28,8 µg/kg (BTZ+Bupre,

n=10) e il restante gruppo non riceve più alcun farmaco (BTZ-fu, n=10). Sia il CR4056 che la buprenorfina vengono somministrate giornalmente per l'intera durata della Fase2.

### **1.3.2 Esperimento 2**

Come rappresentato nel flow-chart riportato in Fig. 5B, l'esperimento2, per il quale sono stati impiegati 72 ratti Wistar femmina, consta di due fasi della durata di 8 e 3 settimane rispettivamente, seguite da una settimana di follow-up. All'inizio della Fase1 gli animali sono stati randomizzati in due gruppi: un gruppo di animali di controllo non trattati (CTRL, n=12) e un gruppo trattato per via endovenosa con bortezomib alla dose di 0.2mg/kg 3 volte la settimana per 8 settimane (BTZ, n=60). Al termine della Fase1, il trattamento con bortezomib è stato interrotto e gli animali sono stati ri-randomizzati in gruppi omogenei sulla base dei risultati ottenuti con il Dynamic test. I 12 animali di controllo della fase 1 continuano a non essere trattati (CTRL, n=12) mentre gli animali che erano stati trattati con bortezomib vengono divisi in 5 sotto-gruppi: 3 gruppi iniziano il trattamento orale con CR4056 alle dosi di 0.6, 2 o 6 mg/kg rispettivamente (BTZ+CR4056 0.6; BTZ+CR4056 2; BTZ+CR4056 6, n=12 per ciascun gruppo), 1 gruppo inizia il trattamento orale con gabapentina alla dose di 100 mg/kg (BTZ+Gaba, n=12) e il restante gruppo non riceve più alcun farmaco (BTZ-fu, n=10). Sia il CR4056 che la gabapentina vengono somministrate giornalmente per l'intera durata della Fase2.

### **1.3.3 Esperimento 3**

Come rappresentato nel flow-chart riportato in Fig. 5C, l'esperimento3, per il quale sono stati impiegati 76 ratti Wistar femmina, consta di due fasi della durata di 6 e 4 settimane rispettivamente. All'inizio della Fase1 gli animali sono stati randomizzati in quattro gruppi: un gruppo di animali di controllo non trattati (CTRL, n=10), un gruppo trattato per via endovenosa con bortezomib alla dose di 0.2mg/kg 3 volte la settimana (BTZ, n=36), un gruppo trattato per via orale con CR4056 alla dose giornaliera di 6mg/kg (CR4056, n=10), un gruppo co-trattato per via endovenosa con bortezomib alla dose di 0.2mg/kg 3 volte la settimana e CR4056 alla dose giornaliera di 6mg/kg (BTZ+CR4056, n=10). Al termine della Fase1 gli animali sono stati ri-randomizzati in gruppi omogenei sulla base dei risultati ottenuti con il Dynamic test. Al termine delle 8 settimane sperimentali, sono stati sacrificati: n=4 animali CTRL, n=6 animali trattati con BTZ, n=4 animali trattati con CR4056, n=10 animali co-trattati. Gli animali rimasti invece proseguono fino alla decima settimana: CTRL (n=6) proseguono senza alcun trattamento, BTZ (n=10) proseguono la somministrazione con bortezomib 0.2mg/kg 3 volte la settimana, CR4056 (n= 6) proseguono a prendere CR4056, BTZ+CR4056 (n=10) proseguono il cotrattamento.



#### **1.4 METODI DI VALUTAZIONE**

Per tutti gli esperimenti, durante il periodo di trattamento e al termine di questo sono stati valutati diversi parametri che sono indice di una tossicità generale (quali mortalità, peso corporeo, analisi ematologiche ed ematochimiche) e di neurotossicità periferica associata alla comparsa di dolore neuropatico (quali velocità di conduzione nervosa, analisi istopatologica del nervo sciatico e gangli della radice dorsale DRG, test comportamentali) indotti dal trattamento cronico con bortezomib.

##### **1.4.1 TOSSICITA' GENERALE E PESO CORPOREO**

La valutazione giornaliera del benessere dell'animale e la variazione dell'incremento del peso corporeo durante il periodo di trattamento vengono impiegati per stimare la tossicità generale indotta dal farmaco. La variazione ponderale di ogni animale viene effettuata all'inizio della sperimentazione e bisettimanalmente. La bilancia impiegata (Adventurer SL, Ohaus, Pine Brook, NJ, USA) fornisce il peso dell'animale con un'accuratezza pari al decimo di grammo.

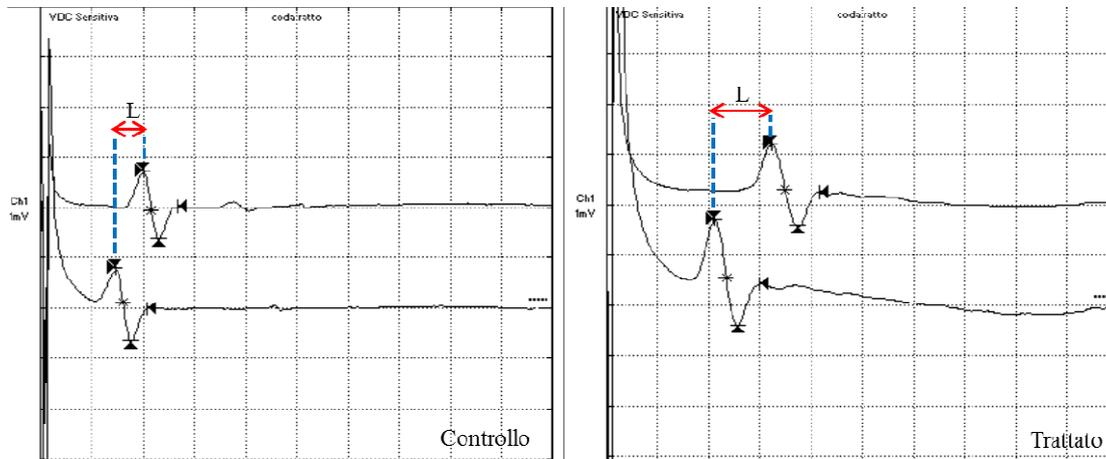
##### **1.4.2 NEUROTOSSICITA': VELOCITA' DI CONDUZIONE NERVOSA**

La valutazione della velocità di conduzione nervosa è utilizzata nella gran parte degli studi di neurotossicità come indicatore dell'azione tossica del farmaco in esame a livello del sistema nervoso periferico. In letteratura, diversi studi riportano infatti un decremento della velocità di conduzione in ratti trattati con diversi chemioterapici tra i quali il bortezomib stesso (Cavaletti et al., 2007). I vantaggi dell'impiego di questa metodica è che non risulta essere invasiva, non necessita l'utilizzo di anestesia in quanto non è una procedura dolorosa per l'animale e soprattutto può essere ripetuta nel tempo durante l'intero studio senza danneggiare la coda dell'animale.

La misurazione, effettuata in condizioni standard in ambiente a temperatura e umidità controllate (  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidità del  $55\pm 10\%$  ), viene eseguita lungo il fascio di nervi caudali della coda dell'animale, mediante l'utilizzo di elettrodi ad anello rispettivamente di registrazione e stimolazione. Tale misura viene valutata determinando la differenza della latenza dei potenziali d'azione evocati, a seguito di una stimolazione dell'intensità di 80mA e della durata di 100msec, registrati impiegando una coppia di elettrodi posizionati sulla parte distale della coda.

L'elettrodo stimolatore è posizionato a 10 cm (base della coda) e a 5cm rispettivamente dagli elettrodi di registrazione localizzati prossimalmente. La latenza, ossia il tempo che il nervo caudale impiega per condurre lo stimolo nervoso tra le due posizioni di stimolazione

(calcolato come differenza tra i due picchi del potenziale d'azione) viene utilizzato per calcolare la velocità di conduzione del nervo stesso, attraverso l'apparecchiatura ed il software MytoII (EBN Neuro, Firenze). Vedi Fig. 6



**Figura 6:** Misurazione della velocità di conduzione nervosa lungo il fascio di nervi caudali.

Esempio di misurazione della latenza (L) e d'onda picco a picco del nervo caudale in un ratto di controllo e in un ratto trattato con chemioterapico. A seguito del trattamento con il chemioterapico si osserva un aumento della latenza associata ad una riduzione della velocità di conduzione.

#### **1.4.3 NEUROTOSSICITA': ANALISI MORFOLOGICA DEL NERVO SCIATICO E DEI GANGLI DELLA RADICE DORSALE (DRG)**

Al termine dello studio, gli animali vengono sacrificati mediante inalazione di CO<sub>2</sub> seguita da dislocazione cervicale e vengono prelevati campioni di nervo sciatico e i DRG L4-L5. I nervi sciatici vengono fissati per immersione utilizzando una soluzione di glutaraldeide al 3% mentre i DRG in una soluzione composta da paraformaldeide 4% e glutaraldeide 3%, entrambe preparate in tampone fosfato 0,12M e pH 7.4.

Dopo 3h di fissazione sia i campioni di nervi che di DRG vengono lavati in tampone fosfato e post-fissati in una soluzione di tetrossido di osmio 1% in tampone cacodilato 0,12M.

In seguito, i campioni vengono sottoposti ad una disidratazione progressiva per immersione in etanolo a concentrazioni crescenti e inclusi in resina epossidica.

Al termine del processamento, mediante l'utilizzo di un microtomo (Leica RM2265) si ottengono delle sezioni semifini di nervo e/o di DRG dello spessore di 1,5µm che vengono successivamente colorate con blu di toluidina per l'osservazione al microscopio ottico Nikon Coolscope (Nikon Instruments, Calenzano, Italia).

#### **1.4.4 TEST COMPORTAMENTALI: DYNAMIC E PLANTAR TEST**

Al fine di valutare nei nostri modelli sperimentali la comparsa di dolore neuropatico sotto forma di allodinia e algesia, è stato impiegato il Dynamic Aesthesiometer Test (modello 37400, Ugo Basile Biological Instruments, Comerio, Varese, Italia) e Plantar test (modello 37370, Ugo Basile Biological Instruments, Comerio, Varese, Italia). Il Dynamic test si basa su una stimolazione meccanica non dolorosa sotto forma di pressione esercitata da un filamento metallico di 0,5mm di diametro; tale filamento esercita una pressione crescente (intensità di stimolo) in un dato intervallo di tempo (rampa) che vengono impostate dall'operatore all'inizio di ogni nuovo protocollo sperimentale. Nello specifico, nei diversi esperimenti descritti è stata scelta un'intensità di stimolo pari a 50gr che vengono raggiunti in 20sec. Il plantar test, invece, si basa su di uno stimolo doloroso con una fonte termica che irradia con un'intensità costante di 40 IR.

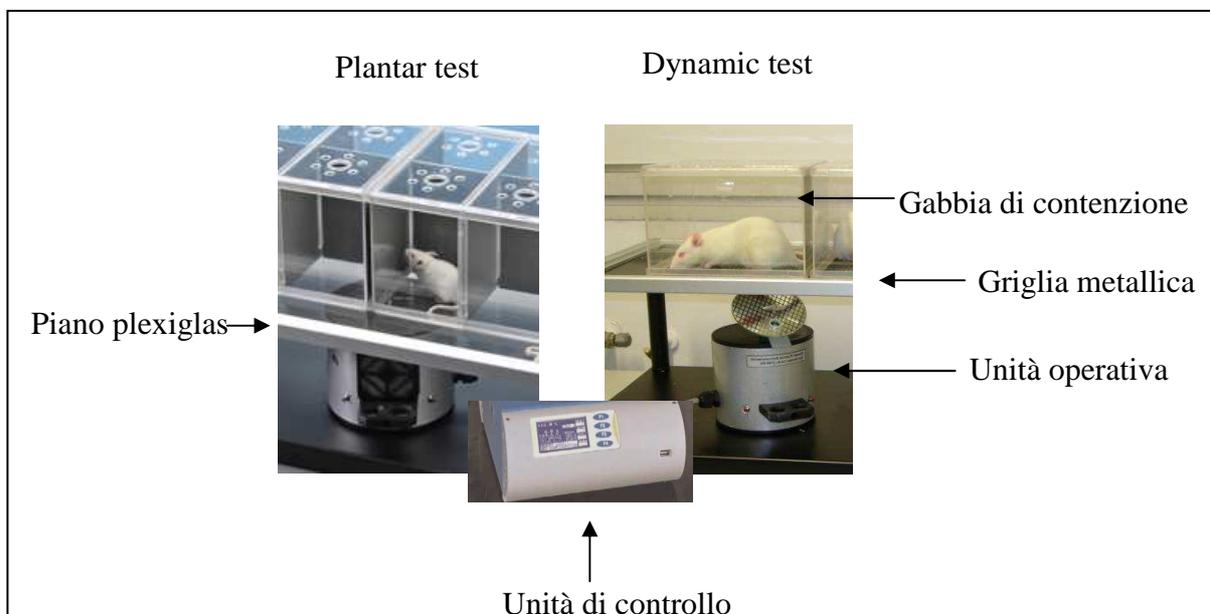
Nell'esperimento<sup>1</sup> il Dynamic test è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento degli animali con bortezomib (valori basali) e successivamente dopo 8 settimane di trattamento (Fase1). Durante la Fase2 il test è stato ripetuto dopo 1,3,7 e 14 giorni di trattamento con CR4056 e buprenorfina. Mentre il plantar test, è stato effettuato solo nel primo esperimento, al termine delle 8 settimane di bortezomib e dopo 7 giorni di trattamento con il CR4056. Nell'esperimento<sup>2</sup>, durante la Fase1, il dynamic test è stato eseguito al basale e alla fine delle 8 settimane di trattamento con bortezomib, mentre durante la Fase2 è stato ripetuto dopo 1,4,14 e 21 giorni di trattamento con CR4056, gabapentina e al termine del periodo di follow-up. Nell'esperimento<sup>3</sup>, durante la Fase1, il dynamic test è stato eseguito al basale e alla fine delle 8 settimane di trattamento con bortezomib mentre durante la Fase2 è stato ripetuto dopo 1,4,14, 21 e 28 giorni di trattamento con CR4056.

In tutti e tre gli esperimenti il dynamic test viene eseguito 1 ora dopo il trattamento con CR4056 e 30 minuti dopo la somministrazione di gabapentina e buprenorfina. Mentre il plantar test è stato effettuato 1h dopo il dynamic test.

Al basale, prima di effettuare i test comportamentali, gli animali vengono sottoposti ad un periodo di training di tre giorni durante i quali vengono alloggiati all'interno di opportune gabbie di contenzione senza ricevere alcuna stimolazione e lasciati ambientare per un periodo di 10 minuti al giorno. Questo training è necessario per far abituare l'animale allo strumento, alla presenza e manipolazione dell'operatore al fine di non creare situazioni di stress per l'animale e per minimizzare l'errore nella lettura delle misure durante la fase di test.

Il giorno delle misurazioni, l'unità operativa che supporta il filamento (dynamic) o la fonte di calore (plantar), viene posizionata rispettivamente sotto una griglia o piano di plexiglas satinato, sul quale vengono sistemati gli animali per lo studio, ciascuno alloggiato in un'opportuna gabbia di contenzione. Dopo un periodo di acclimatamento di circa 10 minuti, lo stimolo viene posizionato sotto la superficie plantare della zampa posteriore dell'animale. Nel caso del dynamic test, l'unità di controllo dello strumento rileva i grammi di risposta dell'animale allo stimolo esercitata dal filamento metallico; il plantar, invece, registra il tempo che intercorre tra l'inizio dello stimolo doloroso e il momento in cui l'animale toglie la zampa dalla fonte di calore. Nel caso del dynamic la stimolazione viene effettuata su entrambe le zampe posteriori dell'animale, alternativamente per un totale di tre letture per zampa facendo intercorrere un tempo di 2 minuti tra una lettura e quella successiva, mentre per il plantar vengono sempre rilevate sei misure, ma solo quattro sono utilizzate per il valore medio. Il valore ottenuto calcolato come media di tutte le misure effettuate per il singolo animale rappresenta il tempo/grammi di risposta allo stimolo.

Il dispositivo è dotato di un meccanismo di protezione automatica che previene una esposizione potenzialmente istolesiva al test; inoltre, tutte le procedure vengono eseguite da un singolo operatore, in condizioni di sicurezza per gli animali impostando un periodo di cut-off di 30 sec per il dynamic test e di 20 sec per il plantar.



**Figura 7: Strumentazione del Dynamic e Plantar Test**

#### **1.4.5 EMATOLOGIA ED EMATOCHIMICA**

Da tutti gli animali controllo e trattati a fine trattamento è stata effettuata la raccolta dei campioni di sangue dall'aorta addominale previa anestesia. I parametri ematologici tra cui l'ematocrito, vengono determinati su campioni di sangue intero analizzati con lo strumento PENTRA 60 C+ (Horiba ABX). L'analisi di ematochimica è stata effettuata mediante sistema automatico MIRA PLUS (Horiba ABX) su siero ottenuto previa centrifugazione del campione di sangue a 2500 g per 15 minuti a 14 ° C.

I metodi impiegati per la valutazione dei diversi parametri sono stati:

- Creatinina: metodo cinetico Jaffé al picrato alcalino senza deproteinizzazione
- Urea: metodo enzimatico UV Ureasi-GLDH
- ALT: metodo UV ottimizzato secondo IFCC senza piridossalfosfato
- AST: metodo UV ottimizzato secondo IFCC senza piridossalfosfato

#### **1.5 ANALISI STATISTICHE**

Alla fine delle analisi *in vivo*, i dati raccolti sono stati comparati tra loro e su di essi sono stati svolti test statistici mediante “ANOVA test” e Tukey's Multiple Comparison Test, fissando una soglia di significatività a  $p < 0.05$ , e validando la significatività dei risultati ottenuti attraverso il software Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, Ca, USA).

## **2. STUDI *IN VITRO*: LINEE CELLULARI**

Le linee cellulari tumorali umane impiegate per i nostri studi sono: la linea NCI-H460 (H460) del tumore al polmone a cellule piccole (NSCLC), la linea di adenocarcinoma A549 e due linee di mieloma multiplo RPMI8226 e H929.

Le linee H460 e A549 sono mantenute in cultura come “monolayer” a una temperatura di 37°C in un ambiente contenente il 5% di CO<sub>2</sub>, e conservate in fiasche da 75cm<sup>2</sup> (Corning, New York, NY) nel terreno di crescita RPMI contenente L-glutamina 2mM e addizionato di FBS10%, penicillina e streptomicina.

La linea RPMI8226 viene mantenuta in cultura in sospensione nel terreno di crescita RPMI contenente L-glutamina 2mM e addizionato di FBS10%, penicillina e streptomicina.

La linea H929 viene anch'essa mantenuta in cultura in sospensione nel terreno di crescita RPMI contenente L-glutamina 2mM ma addizionato di FBS10%, streptomicina, 1.5g/l di bicarbonato di sodio, HEPES 10mM, sodio piruvato 1mM e 2-mercaptoetanololo 0.05mM.

### **2.1 REAGENTI CHIMICI**

L'RPMI-1640, la penicillina (100U/ml), la streptomicina (100µg/ml) e l' HEPES, sono stati acquistati da Euroclone (Pero, Italia), il siero bovino fetale (FBS) da Hyclone (Logan, UT), il sodio bicarbonato e il 2-mercaptoetanololo da GIBCO (Carlsbad, CA) il sodio piruvato da Lonza (Verviers, Belgio). I restanti reagenti chimici sono stati acquistati da Sigma (St.Louis, MO).

### **2.2 COLTURE ORGANOTIPICHE DEI GANGLI DELLE RADICI DORSALI**

In seguito a studi già precedentemente effettuati circa la neurotossicità indotta da bortezomib (e non riportati in questo lavoro), si sono resi necessari ulteriori test volti allo studio di un eventuale presenza di citotossicità indotta dal CR4056. A tal fine sono state allestite colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali e testate con un range di valori tra i 10-30 µM. Le dosi testate sono state suggerite dal gruppo Rottapharm, che hanno già effettuato precedenti studi su altre linee cellulari. Per l'allestimento di tali colture i DRG sono stati prelevati in condizioni di sterilità da embrioni di ratti Sprague Dawley al 15° giorno e piastrati su dish collagenate del diametro di 35 mm. I DRG sono poi stati incubati per due ore a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub> in terreno AN2 contenente MEM addizionato con Calf Bovine Serum al 10%, 50 mg/ml di Acido Ascorbico, 1.4 mM di L-Glutamina e Glucosio allo 0.6%. A tale terreno

sono poi stati aggiunti Nerve Growth Factor (NGF) e Floroauridine (Fudr) rispettivamente alle concentrazioni di 5 ng/ml e 10<sup>-5</sup> M con la funzione di rimuovere le cellule di supporto (Scuteri et al., 2006). Al termine delle due ore, per studiare gli effetti neurotossici del CR4056 sull'allungamento del neurite, i DRG sono stati trattati con differenti concentrazioni del farmaco per 24 e 48 ore usando i DRG trattati con il solo terreno AN2 addizionato con NGF come controllo.

I DRG sono stati fotografati attraverso un microscopio a contrasto di fase 24 e 48 ore dopo l'aggiunta del farmaco e la neurotossicità è stata valutata misurando la lunghezza del neurite maggiore in ciascun DRG attraverso il software ImageJ (NIH, Bethesda, Md, USA). La variazione della lunghezza del neurite, comparata a quella controllo tramite una griglia di calibrazione fotografata nelle stesse condizioni, viene espressa come percentuale del decremento rispetto alla lunghezza dei neuriti delle colture controllo. Sui risultati ottenuti è stata svolta un'analisi della varianza (ANOVA), su cui è stato poi svolto il Test di Tukey come post-test, con il software Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, Ca, USA).

### **2.3 SAGGIO DI CITOTOSSICITA'**

L'inibizione della crescita cellulare nelle diverse linee tumorali indotta da BTZ, è stata studiata utilizzando il saggio MTT [3-(4,5-Dimetiltiazolo-2-yl)-2,5-difeniltetrazolo bromide]. Per tale saggio, le cellule sono state piastrate in "multiwells" da 96 pozzetti (Corning, New York, NY) alla concentrazione di 3000 cellule per piastra per le linee A549 e H460 e ad una concentrazione di 20000 cellule per piastra per RPMI 8226 e H929.

Dopo 24h, le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di BTZ (0.05-250 nM) per 72h al termine delle quali sono state incubate con MTT ad una concentrazione finale di 0.5mg/ml. I cristalli di formazan formati vengono poi disciolti in dimetilsolfossido (DMSO) per le linee A549 e H460 o in HCl 1N isopropanolo per le linee RPMI 8226 e H929 ed è stata poi valutata la densità ottica a 540nm.

L'inibizione della crescita viene valutata come percentuale dell'assorbanza del controllo (cellule trattate con il veicolo) rispetto all'assorbanza prima dell'aggiunta di BTZ.

La concentrazione di inibizione del 50% della crescita cellulare (IC<sub>50</sub>) è stata calcolata mediante l'utilizzo del programma GraphPad Prism 3 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

#### **2.4 STUDIO DI NON-INTERFERENZA**

Al fine di valutare se il trattamento con CR4056 potesse interferire con l'azione antitumorale del BTZ, sono stati messi a punto studi di non-interferenza in cui le linee di NSCLC e di mieloma multiplo sono state co-trattate con BTZ e CR4056 da soli o in co-trattamento per 72h. Le diverse linee cellulari sono state esposte alla concentrazione IC<sub>50</sub> di BTZ (ottenuta dal saggio di citotossicità precedentemente descritto) da solo o in co-trattamento con tre concentrazioni crescenti di CR4056 (3, 10 e 30μM). Inoltre, le cellule sono state trattate anche con CR4056 alle tre diverse dosi da solo o con la dose alta di veicolo (DMSO).

L'inibizione della crescita cellulare è stata poi testata mediante l'impiego del saggio MTT descritto nel paragrafo precedente.

#### **2.5 ANALISI STATISTICHE**

Alla fine delle analisi *in vitro*, i dati raccolti sono stati comparati tra loro e su di essi sono stati svolti test statistici mediante "ANOVA test" e Tukey's Multiple Comparison Test, fissando una soglia di significatività a  $p < 0.05$ , e validando la significatività dei risultati ottenuti attraverso il software Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, Ca, USA).

### 3. EFFETTO FARMACODINAMICO DI BORTEZOMIB SULL'ATTIVITA' DEL PROTEASOMA

Bortezomib è stato somministrato nei ratti Wistar femmine con una dose di 0.2 mg/kg (iv). Il prelievo di sangue periferico per la valutazione dell'attività del proteasoma, circa 500 µl per animale) è stato effettuato sia in una condizione di trattamento *acuto* (1h, 24h e 48h dal singolo trattamento), sia successivamente alla 6<sup>a</sup> settimana, e al termine del trattamento *cronico* di 8 settimane (1h, 24h e 48h dall'ultima somministrazione). Una volta ottenuto il sangue mediante un prelievo dall'aorta degli animali anestetizzati con ketamina/xilazina, sono stati isolati i PBMC (peripheral blood mononuclear cell) da sangue intero secondo la metodologia sotto descritta.

#### 3.1 ISOLAMENTO PBMC DA SANGUE INTERO

La procedura di isolamento dei PBMC è basata sul principio di stratificazione su Ficoll-Paque® Plus (Euroclone, Pero, Italia) ovvero sfruttando un gradiente di densità. I tre strati che si vengono a formare presentano: plasma (come primo strato), PBMC (nell'interfase), e cellule rosse del sangue (sul fondo).

- La quantità di sangue al momento del prelievo deve essere riposta in una provetta contenente un anticoagulante
- La quantità di sangue (circa 500 µl) deve essere diluita 1:1 (v/v) con soluzione salina 0,9% (v/v)
- Stratificare la soluzione ottenuta su 3 ml di Ficoll-Paque® (mantenendo circa un rapporto di 2:1 di sangue: Ficoll-Paque)
- Centrifugare a 500g per 30 minuti *senza break* a 20°C e dopo aver rimosso il primo anello ottenuto della stratificazione, recuperare l'anello di linfomonociti in sospensione
- Effettuare un lavaggio con 5 ml di PBS 1Xfreddo
- Centrifugare a 483g per 10 minuti *con break* a 4 °C
- Decantare il surnatante, mentre il pellet viene risospeso in 1 ml di PBS freddo
- La sospensione deve essere trasferita in eppendorf da 1,5 ml e centrifugata a 6500g per 10 minuti *con break* a 4 °C
- Aspirare il surnatante e congelare il pellet (contenente i PBMC) a -80°C

### 3.2 LISI DEI PBMC ED ESTRAZIONE PROTEICA

- Scongellare il pellet di PBMC ed aggiungere ad ogni campione 250 µl di lysis buffer
- Risospendere il pellet
- Sonicare 1 minuto in ghiaccio per disgregare le cellule
- Valutare mediante la camera Burket l'effettiva lisi delle cellule
- Centrifugare a 17000g x 15 minuti a 4°C
- Congelare il surnatante a -80°C

<u>LYSIS BUFFER</u>	[Cfinale]	[Ciniziale]
HEPES (ph 7.5)	1M	50mM
EDTA	5mM	0.5 M
NaCl	150 mM	3M
Triton	100%	1%

**Tabella 3:** Composizione lysis buffer per estrazione proteica

### 3.3 ESTRAZIONE PROTEICA DA TESSUTO PERIFERICO

Contemporaneamente sono stati effettuati prelievi di organi periferici da animali perfusi con fisiologica al fine di pulire da contaminazioni ematiche i tessuti prelevati. La valutazione dell'attività del proteasoma è stata effettuata a carico del nervo sciatico, dei DRG e del cervello, dopo 1 h dall'ultima somministrazione al termine delle 8 settimane. Tali tessuti una volta prelevati sono stati congelati a -80°C.

- Pesare il campione ancora congelato
- Preparare il lysis buffer in ghiaccio
- Frammentare il campione nel mortaio in azoto liquido
- Omogenare nel plotter in ghiaccio aggiungendo 10 µl di lysis buffer/mg di campione
- Sonicare 10 secondi
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti 4°C
- Congelare il surnatante a -80°C

<b><u>LYSIS BUFFER</u></b>	[Cfinale]	[Ciniziale]
Glicerolo	10%	100%
Tris-HCl ph 7.5	25 mM	1M
Triton X-100	1%	10%
EDTA pH8	5mM	0,5 M
EGTA pH8	1mM	0,1 M
H <sub>2</sub> O	-	-

**Tabella 4: Composizione lysis buffer per estrazione proteica**

### **3.4 SAGGIO DI ATTIVITA DEL PROTEASOMA**

La quantità di proteine contenute nei campione è stata determinata mediante la metodica di *Bradford*. Ad un'aliquota dei campioni (4µl) sono stati aggiunti acqua bidistillata ed una soluzione di *Coomassie Reagent*. Le miscele così ottenute sono state incubate per 5min a temperatura ambiente e analizzate allo spettrofotometro per i valori di assorbanza ad una lunghezza d'onda di 595nm. Il *Comassie Reagent*, infatti, venuto in contatto con le proteine in un ambiente acido, ha determinato una variazione dell'assorbimento delle stesse da 465 a 595nm. Poiché la curva di risposta colorimetrica del *Comassie Reagent* non è lineare rispetto all'incremento della concentrazione proteica, è stato necessario costruire una curva standard utilizzando quantità note di una proteina di riferimento (*Bovin Serum Albumin*, BSA). La quantità di proteine contenute nell'aliquota dei campioni in esame, è stata quindi determinata attraverso il confronto tra la propria assorbanza e l'assorbanza dei campioni contenenti quantità note di BSA.

La valutazione del saggio di attività intracellulare del proteasoma è stato effettuato mediante l'uso del CHEMICON's Proteasoma Activity Assay Kit, un metodo semplice e conveniente per la misurazione dell'attività del proteasoma in grado di riconoscere il substrato LLVY (Meng L. et al, 1999). Il saggio infatti si basa sulla rilevazione del fluoroforo 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) rilasciato dopo il clivaggio del substrato marcato LLVY-AMC. La fluorescenza liberata del gruppo AMC è stata quantificata usando il filtro del fluorimetro a 355/460 nm.

Per lo svolgimento del saggio sono stati utilizzati:

- *10X Assay Buffer* costituito da 250 nM HEPES ph 7.5, 5mM EDTA, 0.5% NP-40, e 0.01% SDS (w/v), da cui è stato possibile ottenere l'1X necessario per la preparazione del substrato
- *Proteasome substrate Suc-LLVY-AMC*, il quale è stato preparato diluendo la soluzione madre 1:20 in 1X Assay Buffer.

Una volta ottenuta la quantizzazione proteica mediante il metodo Bradford sia dell'estratto proteico dei PBMC che dello sciatico, DRG e cervello, sono stati prelevati da ogni singolo campione i  $\mu$ l necessari al fine di avere una concentrazione/campione di 40  $\mu$ g (valore X). Durante il caricamento di una multiwell da 96 pozzetti, ogni singolo campione è stato preparato in duplicato e il mix dei componenti richiesti è stato effettuato direttamente nei singoli pozzetti.

Di seguito è riportato un esempio di tabella tipo di caricamento:

	Nome del campione	<u>10XAssay Buffer</u>	$\mu$ l campione (40 $\mu$ g)	H <sub>2</sub> O	substrato	Volum e totale
A1	CTRL n	10 $\mu$ l	X	(80-X) $\mu$ l	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l
A2	CTRL n duplicato	10 $\mu$ l	X	(80-X) $\mu$ l	10 $\mu$ l	100 $\mu$ l

**Tabella 5: Esempio di una linea di caricamento dei pozzetti per il saggio di inibizione del proteasoma**

I campioni sono stati incubati con il substrato per 2 h a 37°C e letti con il filtro 355/460 nm

Per determinare il grado di inibizione del proteasoma:

$$[100 * (1 - (\text{attività del proteasoma}))] \%$$

Attività del proteasoma: (valore medio degli animali trattati con bortezomib) – (valore medio del substrato)/(animali controllo- valore del solo substrato)

Ogni dato sperimentale è la media di tre indipendenti e distinti esperimenti.

Per ogni punto sperimentale per ogni singolo esperimento, il numero campioni analizzati  $\geq 5$

## **4. VALUTAZIONE DELLA FORMA POLIMERIZZATA DELL' $\alpha$ - TUBULINA ACETILATA**

Per le analisi molecolari eseguite in questa parte dello studio è stato prelevato, al momento del sacrificio, il nervo sciatico sia dagli animali di controllo che dagli animali trattati con bortezomib.

### **4.1 ANALISI DI ESPRESSIONE : WESTERN BLOT**

Al momento del sacrificio, il nervo sciatico prelevato da animali di controllo e da animali affetti da neuropatia periferica, è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo. L'estratto proteico ottenuto a partire da questo materiale è stato utilizzato per saggiare l'espressione delle proteine di nostro interesse mediante immunoblotting.

Qui di seguito sono descritte tutte le fasi dell'analisi di espressione, dall'estrazione delle proteine fino all'analisi densitometrica delle bande di espressione ottenute con l'analisi di immunoblotting.

### **4.2 ESTRATTO DA NERVO SCIATICO**

#### **4.2.1 Estrazione proteica**

- Pesare il campione ancora congelato
- Preparare il lysis buffer in ghiaccio (vedi tabella).
- Frammentare il campione nel mortaio in azoto liquido
- Omogenare nel plotter in ghiaccio aggiungendo 10  $\mu$ l di lysis buffer/mg di campione
- Sonicare 10 secondi
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti 4°C
- Recuperare il surnatante (che contiene tubulina in forma libera)
- Al pellet (che contiene tubulina in forma polimerizzata) aggiungere una uguale soluzione lisante addizionata con Sodio Deossicolato 0.5 % in grado di stabilizzare i legami deboli formati dalla tubulina.
- Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti 4°C
- Congelare il surnatante a -80°C

<b><u>LYSIS BUFFER</u></b>	[Cfinale]	[Ciniziale]
Glicerolo	10%	100%
Tris-HCl ph 7.5	25 mM	1M
Triton X-100	1%	10%
EDTA pH8	5mM	0,5 M
EGTA pH8	1mM	0,1 M
H <sub>2</sub> O	-	-
<b>INIBITORI DI ENZIMI</b>		
Sodio ortovanadato	10 mM	92mg/ml
PMSF	4 mM	0.1 M
Aprotinina	1%	1%
Sodio Pirofosfato	20mM	0.1M

**Tabella 6:** Composizione lysis buffer per estrazione proteica

#### 4.2.2 Determinazione della concentrazione proteica

Per la determinazione della concentrazione proteica Vedi paragrafo 3.2.2

#### 4.2.3 Separazione elettroforetica e trasferimento proteico

Con l'impiego di un gel di poliaccrilammide (SDS-PAGE=SDS PoliAccrilammide Gel Electrophoresis), le proteine sono state separate in base al loro peso molecolare, in condizioni di corsa denaturanti.

La soluzione di acrilammide (Euroclone, Pero, Italia) utilizzata per la preparazione dei gel contiene acrilammide/bis-acrilammide in un rapporto di 37,5:1. Il gel utilizzato per la separazione elettroforetica delle proteine è composto di due parti: una porzione inferiore, il *running gel*, ed una porzione superiore, lo *stacking gel*. Il primo contiene 13 % v/v della soluzione di acrilammide/ bis-acrilammide sopra descritta, SDS 1%, Ammonio Persolfato 1%, TEMED 0.4%, Tris-HCl pH 8.8 (375mM) ed acqua bidistillata; la seconda il 5% v/v della soluzione madre di acrilammide, SDS 1%, Ammonio Persolfato 1%, TEMED 0.1%, Tris-HCl 6.8 (125mM) ed acqua bidistillata.

Aliquote degli estratti proteici (50µg di pellet e 10µg di surnatante per l'esperimento Fase1; e 50µg di pellet e 50µg di surnatante per l'esperimento Fase2) sono state risospese in Laemmli Buffer 5x (β-Mercaptoetanololo 5%, Tris HCl pH 6.8 400mM, SDS 10%, Glicerolo 50%, Blue di Bomofenolo 0.5%) in modo da ottenere un rapporto campione/Laemmli Buffer di 5:1. I campioni così preparati sono stati scaldati a 95°C per 5min per denaturare le proteine e caricati in pozzetti creati nello *stacking gel*. Le proteine migrano nel gel dal polo negativo verso il polo positivo dell'apparato elettroforetico grazie alla presenza di un Buffer di corsa (Trisma base 30g/L, Glicina 144g/L, SDS 10g/L) posto nella camera superiore ed inferiore dell'apparato di elettroforesi. La separazione elettroforetica prevede l'applicazione *overnight*.

Un marker costituito da un insieme di proteine di peso molecolare noto viene caricato come riferimento. Al termine della corsa elettroforetica le proteine presenti nel gel di acrilammide sono state trasferite su di un filtro di nitrocellulosa. Questo passaggio ha previsto l'allestimento di una sorta di "*sandwich*" costituito da due supporti di plastica tra i quali vengono collocati, nell'ordine, una spugnetta, un foglio di carta 3M, il filtro di nitrocellulosa, il gel contenente le proteine, un altro foglio di 3M ed una seconda spugnetta. Il "*sandwich*" così ottenuto è stato infine posto nella "camera di trasferimento" contenete circa 6 litri di Buffer di trasferimento (Trisma base 3.025g/L, Glicina 14.4g/L, Metanolo 200ml/L).

L'applicazione per 4 ore a 4°C di un campo elettrico ad un amperaggio costante di 500mA ha consentito che le proteine migrassero dal polo negativo verso quello positivo trasferendosi dal gel di acrilammide al filtro di nitrocellulosa.

#### **4.2.4 Immunoblotting**

I filtri di nitrocellulosa vengono incubati per un'ora in Blocking buffer, una soluzione costituita da PBS, Tween 20 0.10 % e BSA 3 %, per bloccare i siti aspecifici. Successivamente viene effettuata un'incubazione di 1h a RT in presenza dell'anticorpo primario anti acetylated-tubulin diluito 1:2000 nella soluzione di Blocking con BSA allo 0.1 %. Dopo ripetuti lavaggi in Washing buffer (PBS, Tween 20 0.1%), viene aggiunto l'anticorpo secondario anti-mouse in grado di riconoscere la specie in cui è stato prodotto l'anticorpo primario. Quest'ultimo viene diluito 1:2000 in Blocking Buffer con BSA al 0,1 % e incubato per 90 minuti. Infine si effettuano gli ultimi lavaggi con Washing buffer e si procede ad identificare la reazione antigene-anticorpo con la reazione di chemiluminescenza.

#### **4.2.5 ECL™**

*ECL™ Western blotting* è un kit che fornisce tutti i componenti necessari per rilevare la presenza del complesso antigene/anticorpo primario/anticorpo secondario

Una volta terminata la analisi di Immunoblotting, il filtro è stato incubato per 1 min con una soluzione contenente perossido di idrogeno, luminolo ed intensificatori chimici di luminescenza. La perossidasi di rafano, a cui sono coniugati gli anticorpi secondari, catalizza il rilascio di anioni superossido dalle molecole di perossido di idrogeno presenti nella soluzione e la conseguente ossidazione del luminoso, un substrato chemiluminescente che determina l'emissione di luce con una aumentata intensità grazie alla presenza degli intensificatori luminosi. Avvenuta la reazione di chemiluminescenza, il filtro è stato asciugato e collocato in una cassetta per lo sviluppo fotografico. La luce prodotta dal luminolo è in fatti in grado di impressionare una lastra autoradiografica e di consentire la visualizzazione delle proteine immunoreattive all'anticorpo primario impiegato nella specifica reazione. Il tempo d'esposizione del filtro alla lastra autoradiografica è stato da 1 a 3 secondi a causa della forte intensità della banda della tubulina.

#### **4.2.6 Valutazione densitometrica delle lastre**

Le lastre autoradiografiche vengono poste su di un apparecchio Transilluminatore a luce visibile e fotografate con una macchina fotografica digitale. Le immagini così acquisite vengono processate per l'analisi densitometrica.

L'analisi densitometrica viene automaticamente condotta dal software dopo che l'operatore ha correttamente delimitato l'area di interesse delle bande di espressione proteica che desidera analizzare. In questo modo è possibile quantificare nei diversi campioni l'intensità delle bande di espressione delle proteine target.

## RISULTATI

### ***1. STUDIO DELL'EFFETTO ANALGESICO DI CR4056 IN UN MODELLO IN VIVO DI DOLORE NEUROPATICO INDOTTO DA BORTEZOMIB***

Recenti studi hanno dimostrato l'insorgenza di una neuropatia periferica dolorosa associata all'utilizzo clinico di bortezomib in pazienti affetti da mieloma multiplo. Attualmente nessun farmaco in commercio è in grado realmente di prevenire o curare i sintomi dolorosi associati al trattamento con bortezomib. Studi recenti hanno indicato l'implicazione dei siti di legame dei recettori imidazolinici in molti differenti eventi, come la proliferazione cellulare, regolazione del grasso, neuroprotezione, infiammazione e dolore (Head and Mayrov, 2006; Li and Zhang, 2011). Inoltre, altri studi pre-clinici hanno dimostrato che CR4056, un nuovo ligando del recettore I2-imidazolinico, è in grado di alleviare la componente dolorosa presente in alcuni modelli animali di dolore (Ferrari et al., 2011).

Al fine di studiare e identificare l'efficace dose del composto analgesico CR4056 in un modello di neuropatia dolorosa indotta da bortezomib precedentemente caratterizzato (Meregalli et al, 2011), abbiamo condotto due studi consecutivi (esperimenti**1, 2**) nel modello animale proposto. Un volta individuata la dose efficace, abbiamo condotto uno studio di co-somministrazione di CR4056 e di bortezomib, per la valutazione di un protocollo di trattamento sia terapeutico che preventivo (esperimento**3**). In tutti i protocolli sperimentali, durante il periodo di trattamento sono stati valutati diversi parametri che vanno a valutare sia la tossicità generale del farmaco che la neurotossicità. Per quanto riguarda la tossicità generale è stata valutata la mortalità, lo stato di salute dell'animale giornaliero, la variazione ponderale di peso corporeo bisettimanale, ed è stata effettuata l'analisi ematologica ed ematochimica al termine del trattamento. Per quanto riguarda invece, la valutazione della neurotossicità periferica, sono stati analizzati i parametri inerenti la velocità di conduzione nervosa (VDC) lungo il nervo caudale dell'animale, ed eventuali alterazioni morfologiche a carico del nervo sciatico e del ganglio della radice dorsale (DRG). Inoltre l'analisi dell'efficacia analgesica del composto è stata valutata attraverso l'utilizzo del dynamic e plantar test, in grado di valutare l'allodinia e l'algisia, rispettivamente, dell'animale in studio. In ciascun protocollo sperimentale (esperimento**1, 2**) gli animali sono stati divisi in gruppo

CTRL (controllo) e BTZ (bortezomib) per la Fase1 di 8 settimane; mentre per la Fase2 gli animali sono stati randomizzati in sette e cinque gruppi. In ciascun esperimento, un gruppo di animali sani, non trattati, ha rappresentato il gruppo di animali CTRL. In entrambi gli esperimenti durante la Fase1, gli animali sono stati suddivisi in animali controllo e animali trattati con bortezomib (0.2 mg/kg, 3 volte a settimana, per 8 settimane). Mentre nella Fase2 gli animali sono stati somministrati con CR4056 a diverse dosi e tempi di trattamento:

- Nell'esperimento1: un gruppo di animali ha interrotto il bortezomib senza ricevere altri composti (**BTZ-fu**), uno trattato con CR4056 60 mg/kg (**BTZ+CR 60**), uno trattato con CR4056 20 mg/kg (**BTZ+CR 20**), uno trattato con CR4056 6 mg/kg (**BTZ+CR 6**), ed un ultimo con buprenorfina (**BTZ+Bupre**). In tale esperimento il CR4056 e la buprenorfina sono stati somministrati quotidianamente per 2 settimane.
- Nell'esperimento2: un gruppo di animali ha interrotto il bortezomib senza ricevere altri composti (**BTZ-fu**), uno trattato con CR4056 0,6 mg/kg (**BTZ+CR 0,6**), uno trattato con CR4056 2 mg/kg (**BTZ+CR 2**), uno trattato con CR4056 6 mg/kg (**BTZ+CR 6**), ed un ultimo con gabapentina (**BTZ+Gaba**). In tale esperimento il CR4056 e la gabapentina sono stati somministrati quotidianamente per 3 settimane.
- Nell'ultimo approccio sperimentale (esperimento3) durante la Fase1 (lunga 6 settimane), gli animali sono stati suddivisi in animali controllo (**CTRL**), animali trattati con bortezomib (**BTZ**, 0.2 mg/kg, 3 volte a settimana, per 6 settimane), animali trattati solo con CR4056 6 mg/kg (**CR**), animali co-trattati (**BTZ+CR**). Mentre per la Fase2 i gruppi hanno proseguito suddivisi in: **CTRL**, **CR**, **BTZ** e **BTZ+CR** e in aggiunta sono ottenuti i gruppi che hanno iniziato il co-trattamento solo in seguito dell'instaurarsi della neuropatia alla 6° **BTZ 6WS+(BTZ+CR) 4 ws** e 8° settimana (**BTZ 8 WS+(BTZ+CR) 2 ws**).

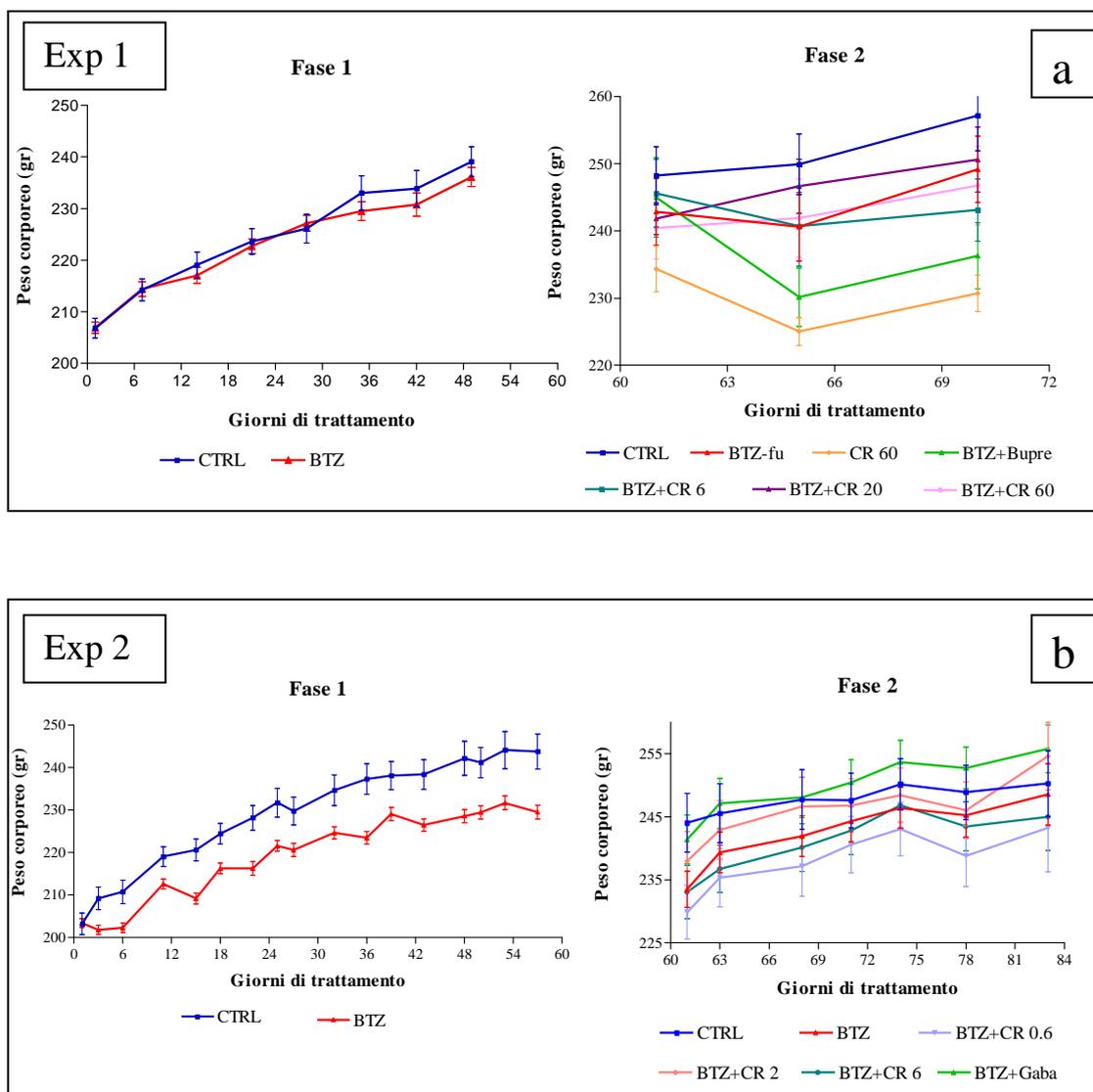
## **1.1 TOSSICITA' GENERALE: mortalità, osservazioni cliniche e peso corporeo**

Al fine di stimare la tossicità generale indotta da bortezomib e di CR4056, è stata valutata bi-settimanalmente la variazione del peso corporeo degli animali di controllo e degli animali trattati, oltre alla mortalità giornaliera. Gli animali utilizzati negli esperimenti **1, 2, 3** sono stati Wistar femmine con un peso a inizio trattamento di circa 175-200 gr. Considerazioni generali circa i diversi grafici che riportano la variazione media dei ratti utilizzati, permettono di asserire che gli animali di controllo (profilo blu) mostrano un incremento di peso corporeo continuo nel tempo, in quanto animali sani con libero accesso a cibo e acqua. Per quanto riguarda gli animali trattati con bortezomib 0,20 mg/Kg (profilo rosso) in tutti gli esperimenti si osserva un decremento di peso corporeo rispetto ai controlli, seppur non significativo.

### Esperimento 1 e 2

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati con bortezomib, né hanno mostrato sofferenza in seguito a somministrazione di CR4056.

La Fig. 8 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso di entrambi le Fasi 1 e 2 degli esperimenti **1** e **2**. La somministrazione di bortezomib risulta in genere ben tollerata, anche se quattro e due animali trattati con il farmaco sono morti e subito rimpiazzati con animali scorte, rispettivamente, durante la Fase 1 dell'esperimento **1** e **2**. Inoltre anche il CR4056 a tutte le dosi utilizzate nello studio, risulta essere ben tollerato in quanto non è stato riportato nessun morto durante il periodo di trattamento con tale analgesico. Nonostante una leggera diminuzione del peso corporeo degli animali trattati con bortezomib durante la Fase 1 dell'esperimento **2**, non è stata riscontrata nessuna variazione statisticamente significativa tra i vari gruppi degli animali trattati, rispetto agli animali controllo in nessuna fase dello studio.



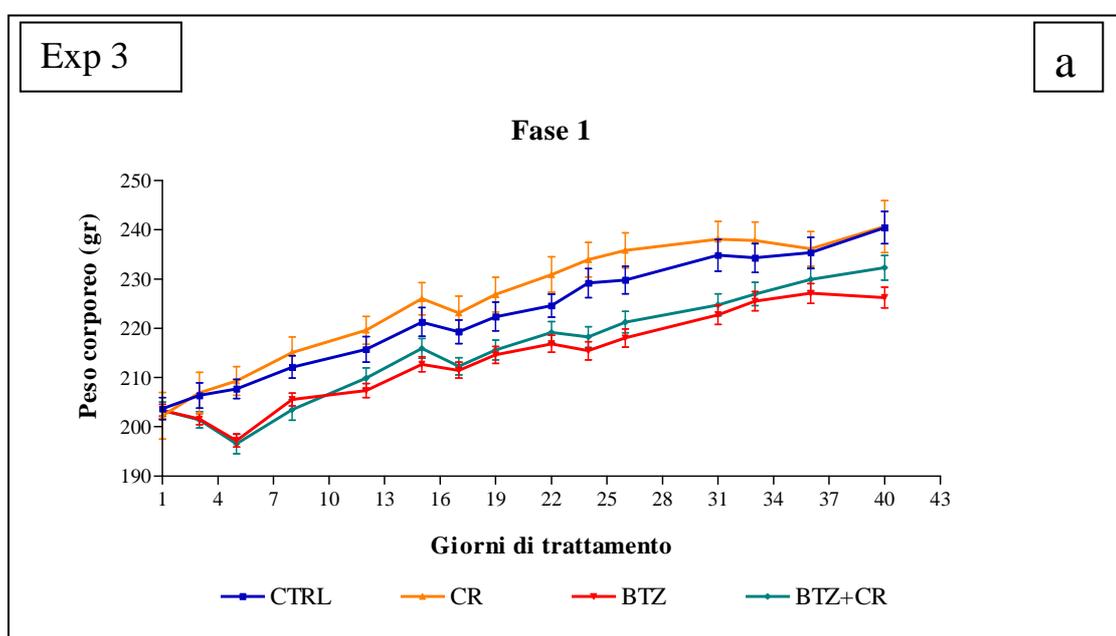
**Figura 8a,b:** Valutazione del peso corporeo nell'esperimento 1 e 2

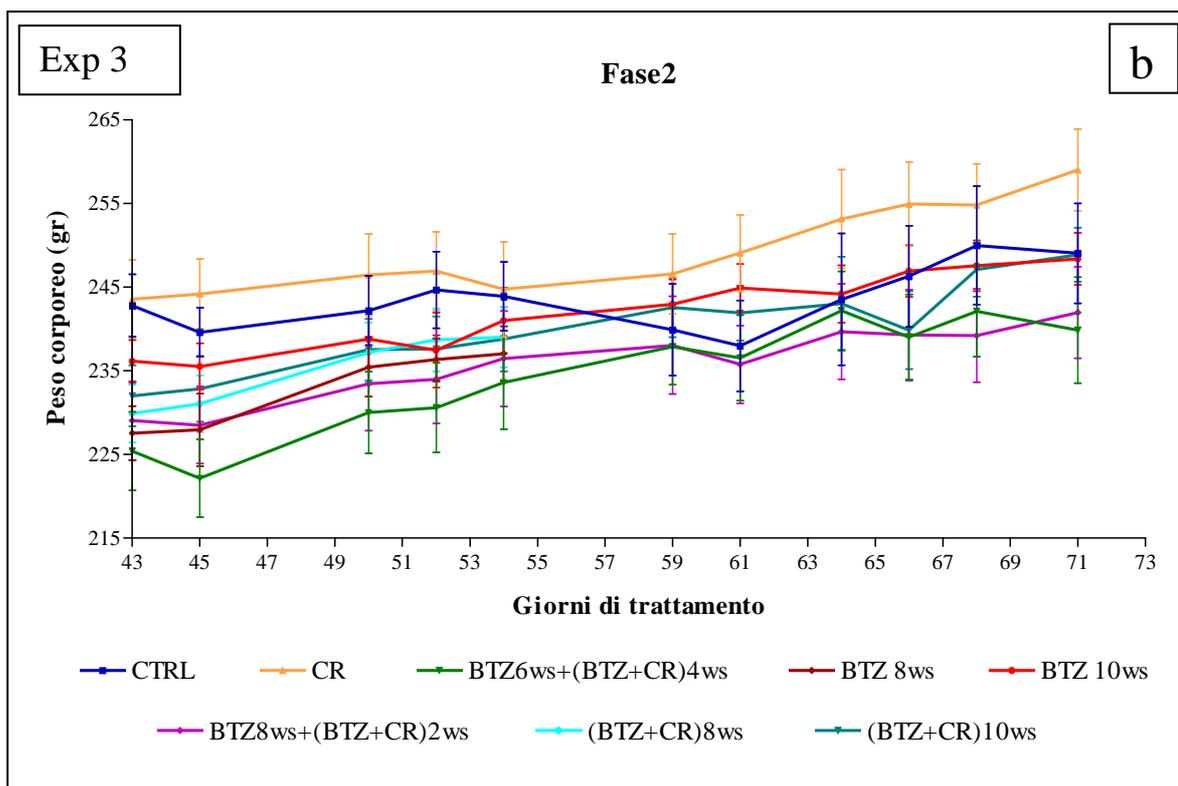
Andamento del peso corporeo nel corso della Fase1 e Fase2 dell'esperimento 1 (a) e 2 (b). (CTRL:controlli; BTZ:bortezomib; BTZ+CR 60-0.6: 8 settimane di bortezomib seguite da trattamento con CR4056; Bupre: buprenorfina; Gaba: gabapentina). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

### Esperimento 3

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati con bortezomib, ne hanno mostrato sofferenza in seguito a somministrazione e co-somministrazione di CR4056, anche se due animali sono morti in seguito alla prima somministrazione del farmaco, e sono stati rimpiazzati con degli animali di riserva.

La Fig. 9 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso dell' esperimento3. La somministrazione di bortezomib e CR4056 risulta in genere ben tollerata; non sono stati osservati cambiamenti statisticamente significativi tra i vari gruppi di trattamento e gli animali controllo in nessun tempo analizzato.





**Figura 9: Valutazione del peso corporeo nell'esperimento3**

Andamento del peso corporeo nel corso della Fase1 e Fase2 dell'esperimento3. (CTRL:controlli; BTZ 8/10 ws: animali trattati con bortezumib per 8/10 settimane; CR: animali trattati solo con analgesico; BTZ6 ws+(BTZ+CR)4 ws: animali trattati per 6 settimane con solo bortezumib e 4 settimane di cotrattamento BTZ-CR; BTZ8 ws+(BTZ+CR)2 ws: animali trattati per 8 settimane con solo bortezumib e 2 settimane di cotrattamento BTZ-CR; (BTZ+CR)8/10 ws; animali in cotrattamento per 8/10 settimane). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

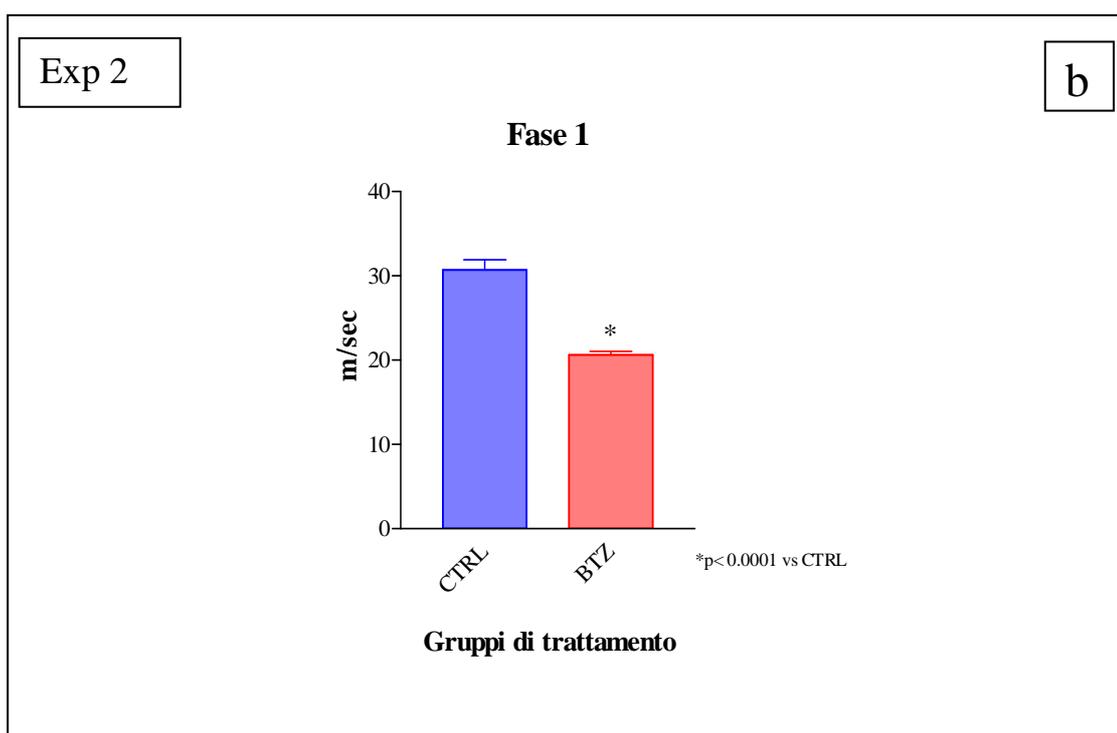
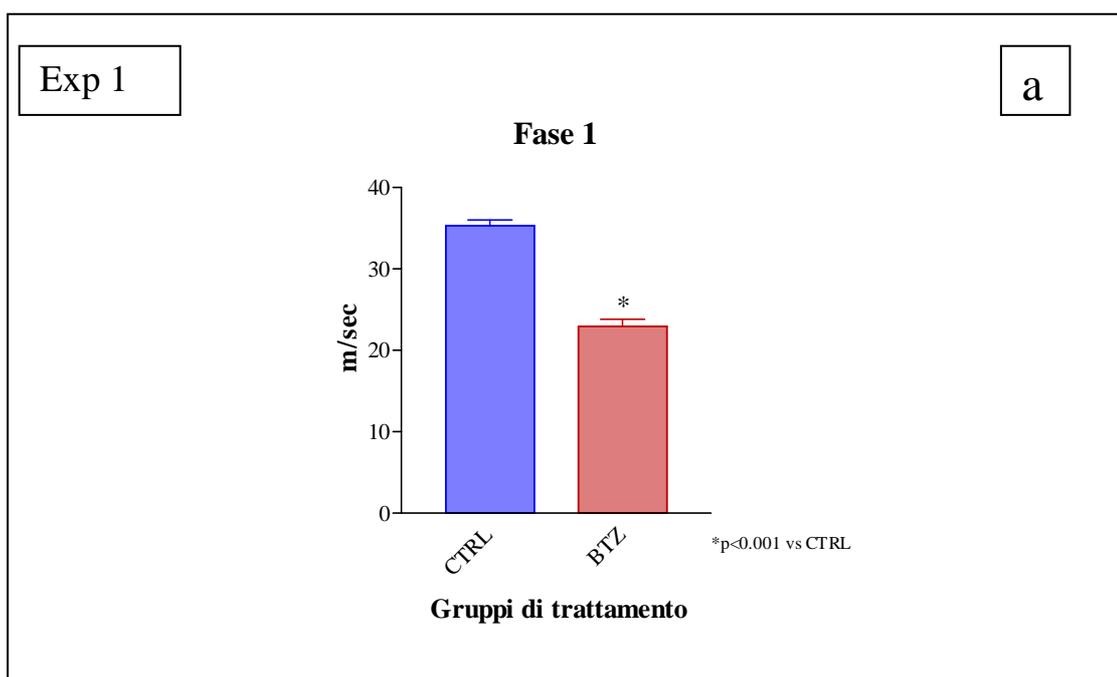
## 1.2 NEUROTOSSICITA': Velocita' di conduzione nervosa

In tutti i protocolli sperimentali, la misurazione della velocità di conduzione nervosa caudale (VDC) è stata eseguita all'inizio dei protocolli sperimentali, al termine della Fase1 e al termine dei trattamenti farmacologici (Fase2), nei 2/3 giorno successivi l'ultima somministrazione. Per l'esperimento3, inoltre, la VDC è stata rilevata anche in un altro punto sperimentale intermedio, le 8 settimane di trattamento. I valori di VDC iniziali sono risultati, in ciascun esperimento, omogenei e compresi tra 28 e 31 m/sec (dati non mostrati), come confermato da dati presenti in letteratura.

### Esperimento 1 e 2

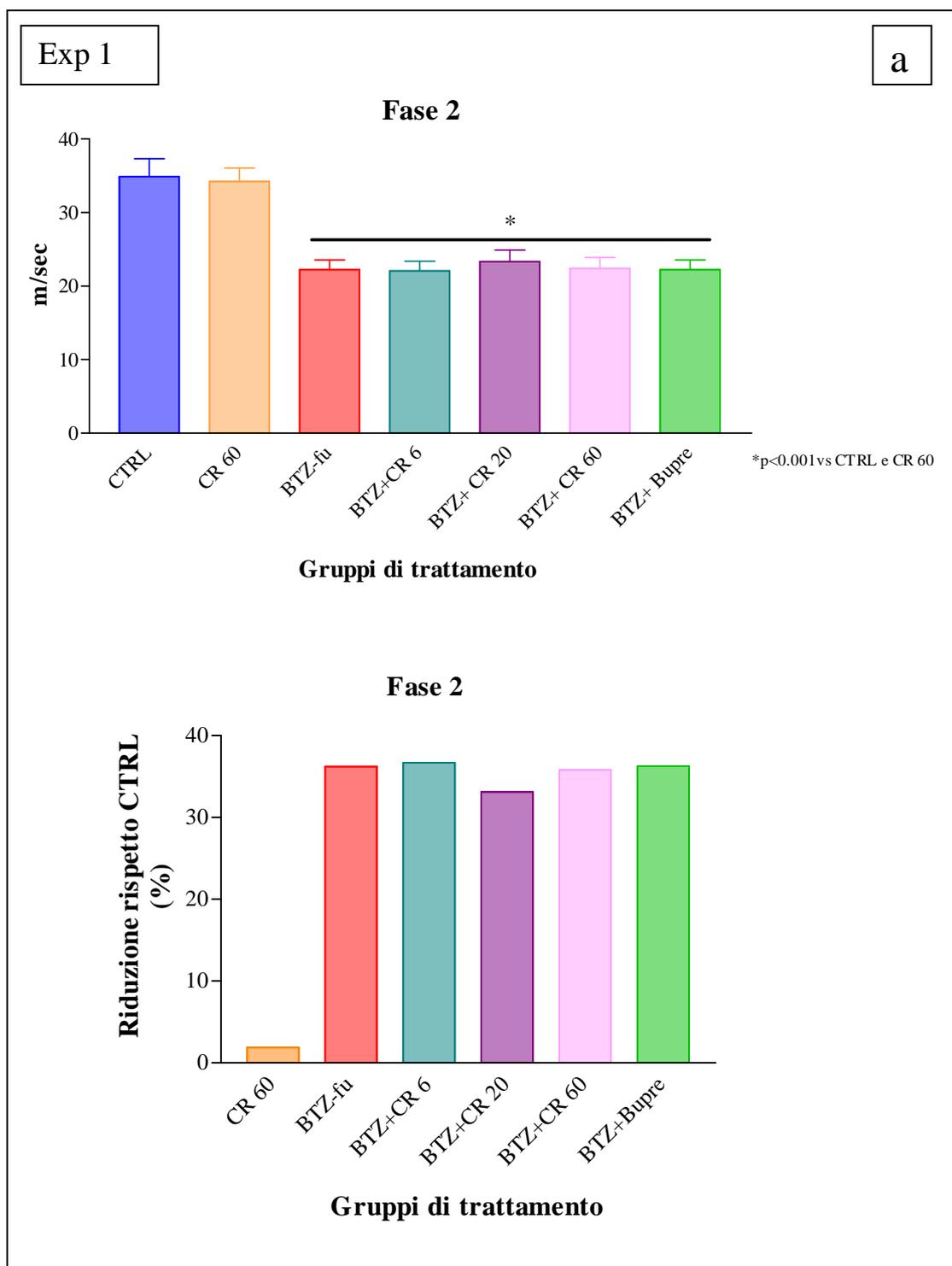
La Fig. 10a,b riporta i valori medi delle VDC ( $\pm$  deviazione standard) del gruppo bortezomib, rispetto ai controlli misurati al termine della Fase1 dell'esperimento 1 e 2, mentre la Fig. 11a,b riporta i valori medi delle VDC ( $\pm$  deviazione standard) di ciascun gruppo di animali e la riduzione percentuale della VDC dei diversi gruppi rispetto ai controlli misurati al termine della Fase2 dell'esperimento 1 e 2.

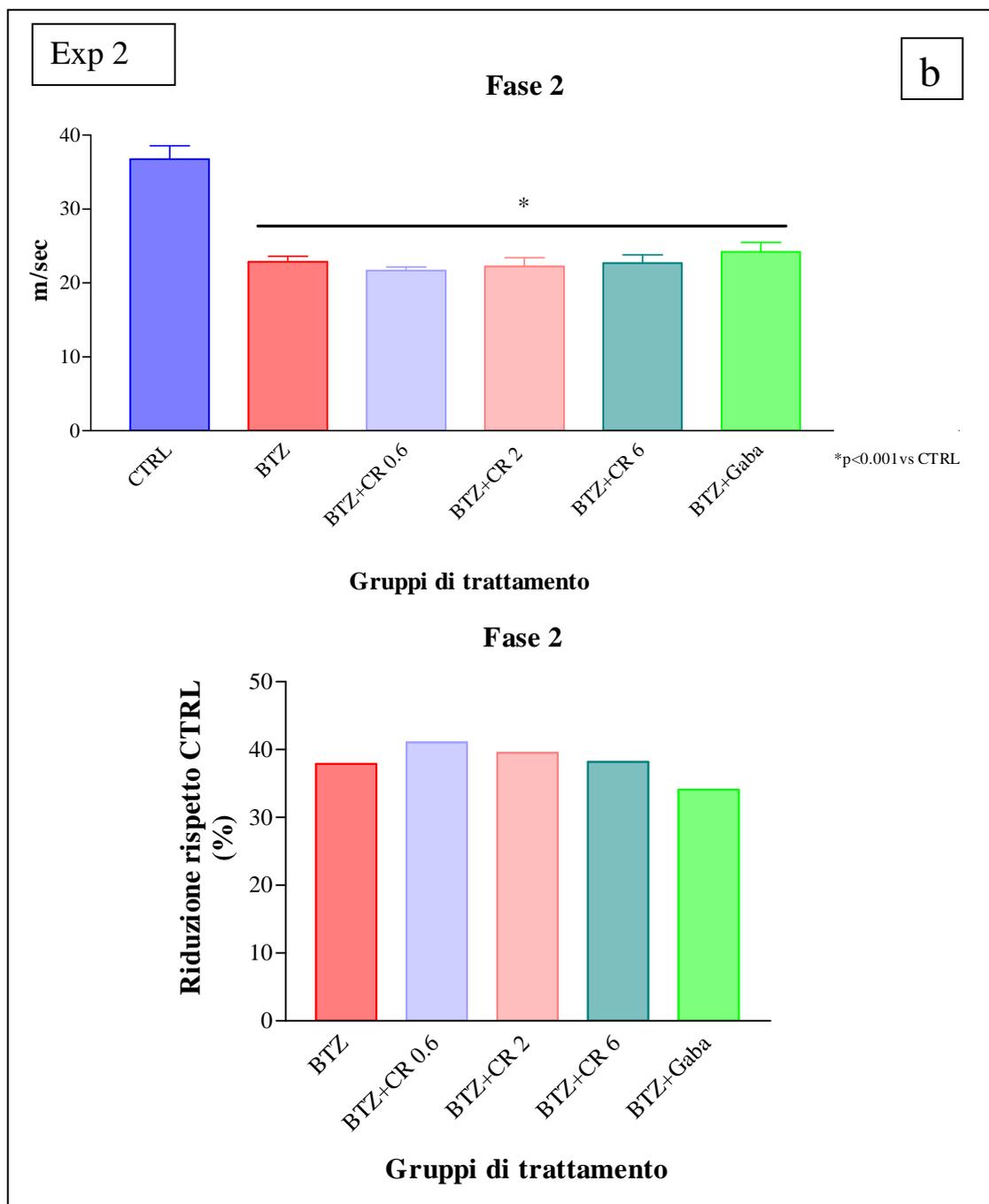
Gli animali trattati con bortezomib (istogramma rosso) in entrambi gli esperimenti al termine della Fase1, mostrano una riduzione statisticamente significativa delle VDC rispetto ai controlli ( $p < 0.001$  BTZ vs CTRL), ovvero dopo 8 settimane di trattamento con il chemioterapico, si evidenzia lo sviluppo di una neuropatia severa (Fig. 10a,b). Tale risultato è stato confermato anche al termine della Fase2 di entrambi gli esperimenti inoltre è stato verificato che il CR4056 a tutte le concentrazioni testate, la buprenorfina, e la gabapentina, non sono in grado di revertire la neuropatia periferica insorta a seguito del trattamento con bortezomib durante la Fase1 ( $p < 0.001$  vs CTRL;  $p < 0.001$  vs CR 60 nell'esperimento1) (Fig. 11a,b).



**Figura 10a,b:** Valutazione delle velocità di conduzione nervosa nella Fase1 dell'esperimento1 e 2

Andamento della velocità di conduzione (valori medi delle VDC  $\pm$  deviazione standard) dei diversi gruppi rispetto ai controlli, nel corso della Fase1 dell'esperimento1 (a) e 2 (b).(CTRL:controlli; BTZ:bortezomib)



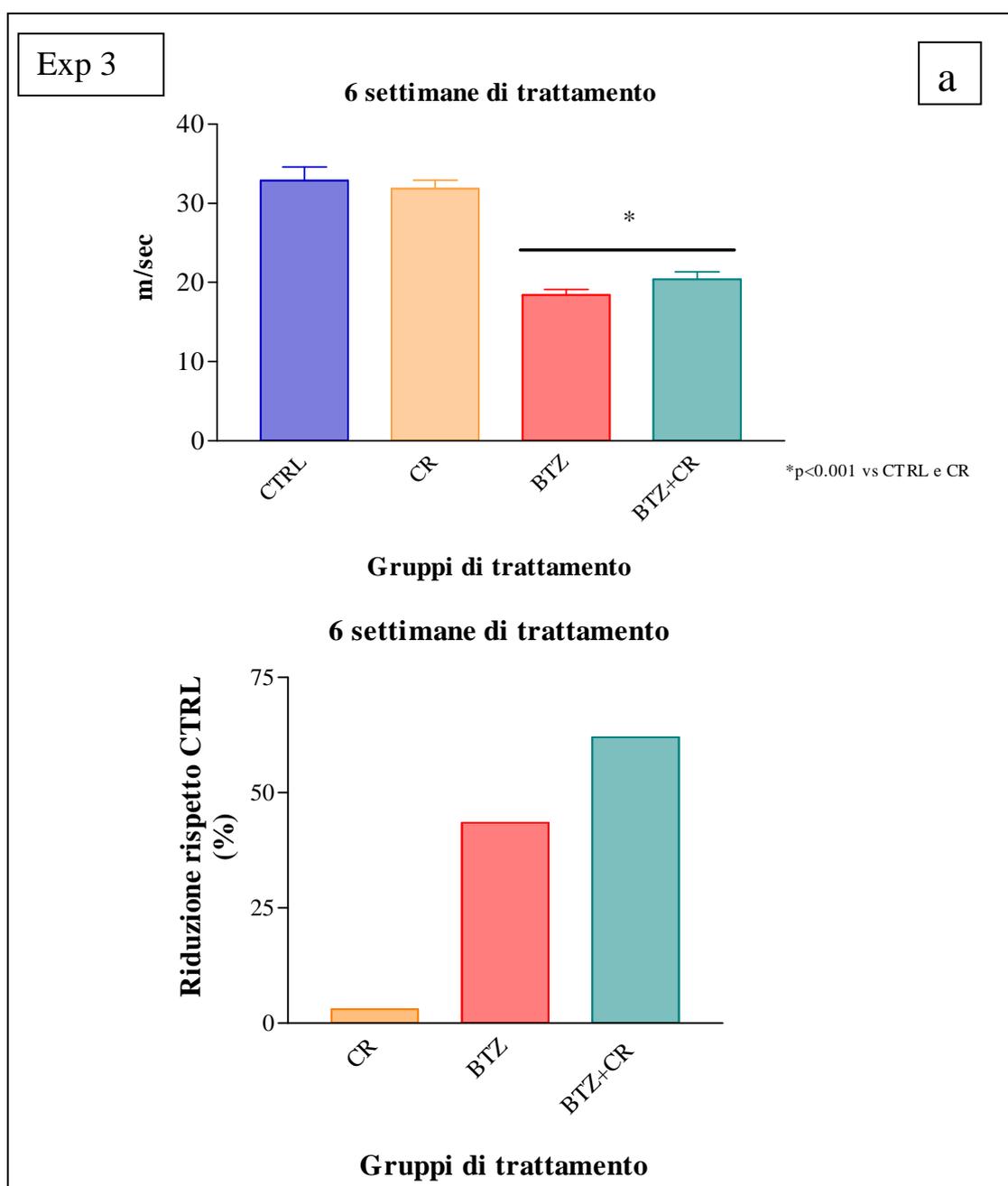


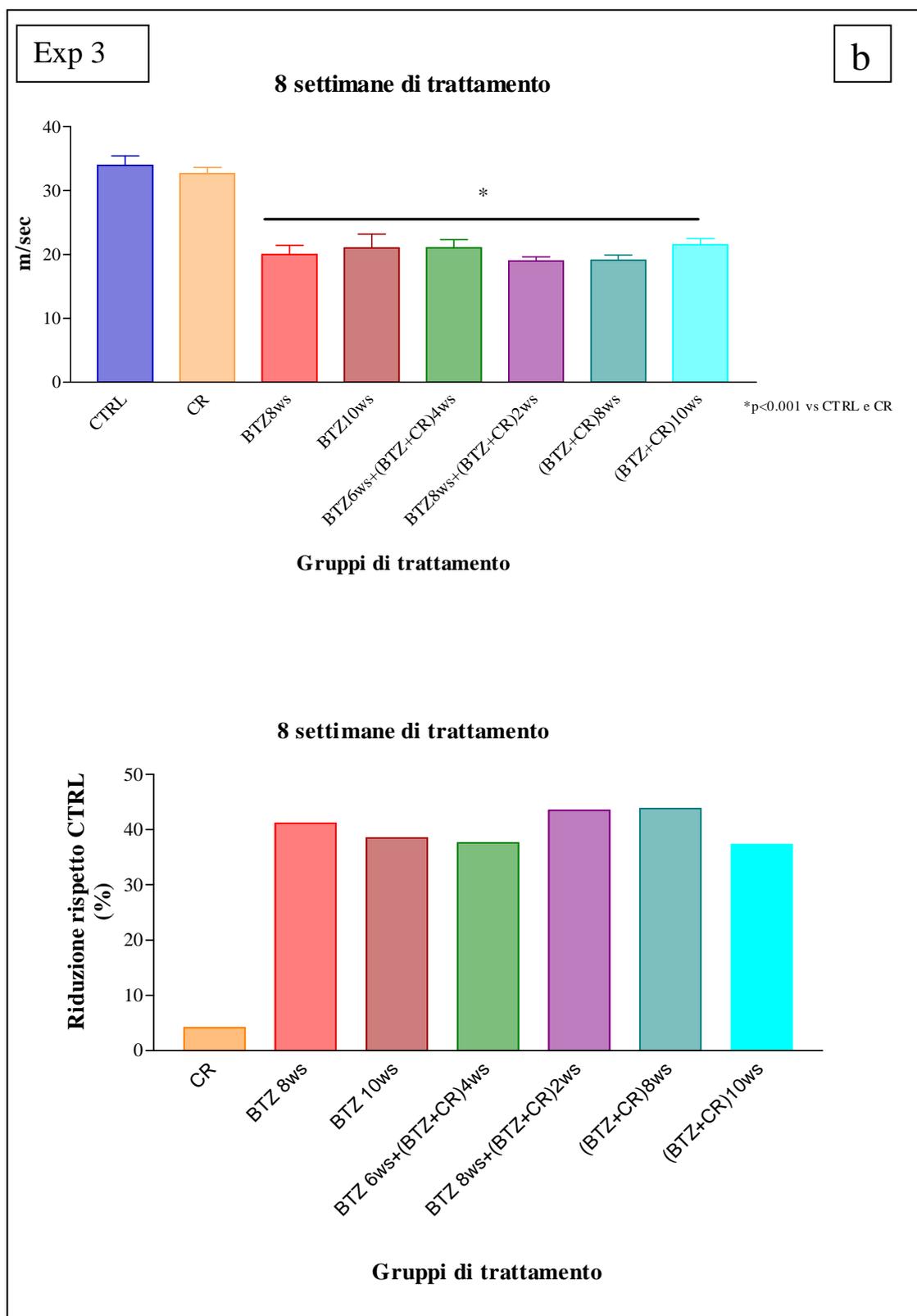
**Figura 11a,b:** Valutazione delle velocità di conduzione nervosa nella Fase2 dell'esperimento 1 e 2

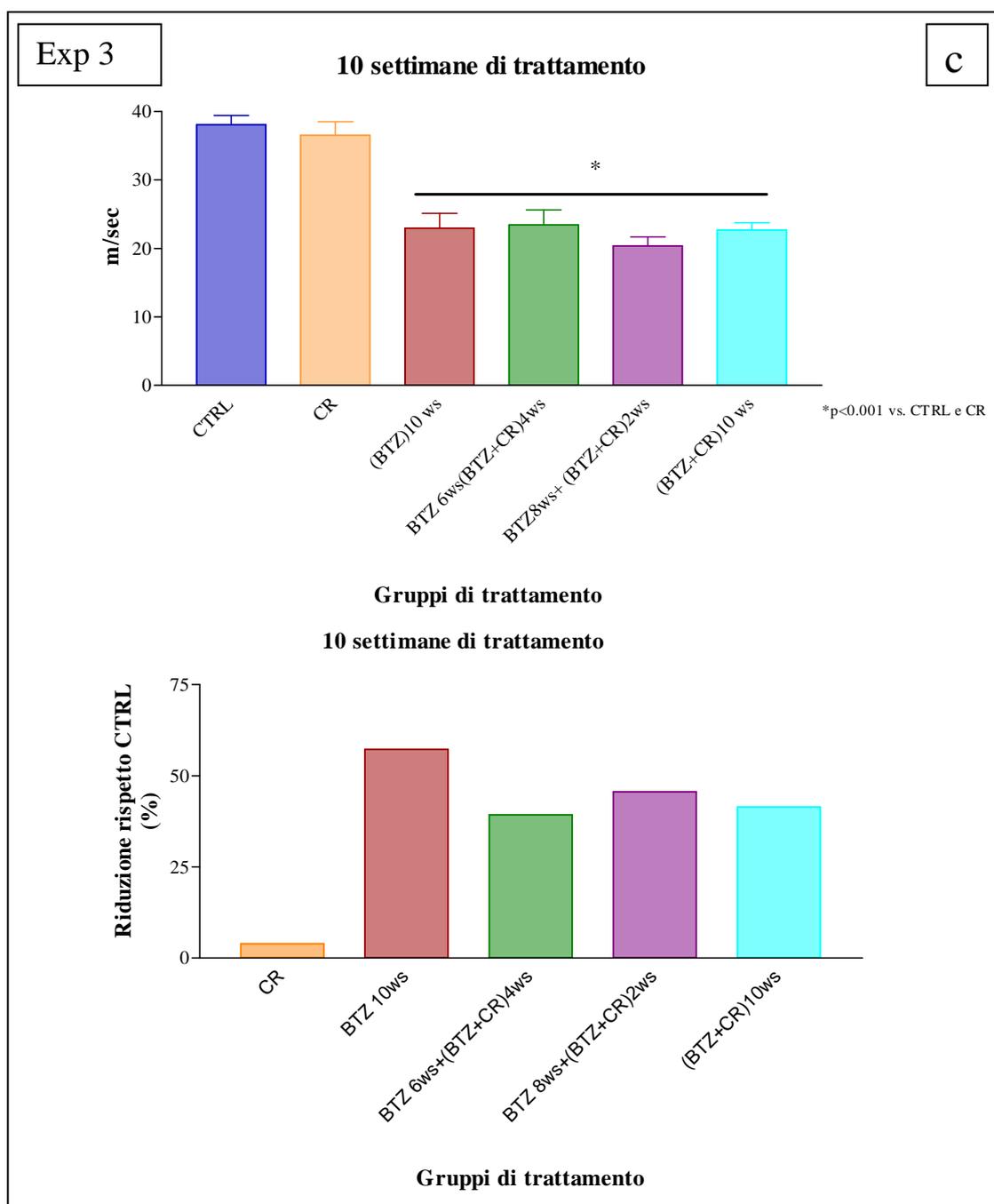
Andamento della velocità di conduzione (valori medi delle VDC  $\pm$  deviazione standard) e riduzione percentuale della VDC dei diversi gruppi rispetto ai controlli, nel corso della Fase2 dell'esperimento 1(a) e 2(b). (CTRL:controlli; BTZ:bortezomib; BTZ+CR 60-0.6: 8 settimane di bortezomib seguite da trattamento con CR4056; Bupre: buprenorfina; Gaba: gabapentina). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

Esperimento 3

La Fig. 12 mostra come gli animali trattati con bortezomib da solo (BTZ, istogramma rosso) e quelli in co-trattamento dall'inizio dell'esperimento (BTZ+CR, istogramma color petrolio) al termine della Fase1 (quindi dopo 6 settimane di trattamento) presentano una diminuzione del valore delle VDC statisticamente significativa rispetto agli animali controllo ( $p < 0.001$ ) e a quelli trattati solo con CR4056, differenza che si mantiene anche a fine delle 8 e 10 settimane (fine Fase2). La somministrazione di CR4056, infatti, non ha apportato nessun miglioramento alla condizione patologica di neuropatia indotta da bortezomib; non presenta quindi funzione di neuroprotezione.







**Figura 12a,b,c. Valutazione delle velocità di conduzione nervosa dell'esperimento3.**

Andamento della velocità di conduzione (valori medi delle VDC  $\pm$  deviazione standard) e riduzione percentuale della VDC dei diversi gruppi rispetto ai controlli, nel corso della Fase2 dell'esperimento3.(CTRL:controlli; BTZ 8/10 ws: animali trattati con bortezomib per 8/10 settimane; CR: animali trattati solo con analgesico; BTZ6 ws+(BTZ+CR)4 ws: animali trattati per 6 settimane con solo bortezomib e 4 settimane di cotrattamento BTZ-CR; BTZ8 ws+(BTZ+CR)2 ws: animali trattati per 8 settimane con solo bortezomib e 2 settimane di cotrattamento BTZ-CR; (BTZ+CR)8/10 ws; animali in cotrattamento per 8/10 settimane). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

### **1.3 NEUROTOSSICITA': Analisi morfologica del nervo sciatico e dei gangli della radice dorsale (DRG)**

#### Esperimento 1 e 2

##### *Nervo sciatico*

All'analisi di microscopia ottica, i nervi sciatici degli animali trattati con bortezomib e prelevati al termine di entrambi gli esperimenti, hanno mostrato un' assonopatia con un'occasionale e rara presenza di degenerazione della fibra mielinica. La somministrazione di CR4056 non sembra, in nessuno dei due esperimenti e quindi a nessuna dose testata, mostrare delle differenze significative attribuibili all'analgescico stesso, in nessuno dei gruppi trattati. Inoltre anche la somministrazione di buprenorfina e gabapentina non sono in grado di modificare le alterazioni patologiche indotte da bortezomib (dati non mostrati).

##### *DRG*

All'analisi di microscopia ottica, i gangli delle radici dorsali (DRG) degli animali trattati con bortezomib e prelevati al termine di entrambi gli esperimenti, hanno mostrato una lieve alterazione morfologica nelle cellule satelliti, con presenza di vacuoli nel citoplasma. Nessuna delle dosi di CR4056 testate ha mostrato alcun effetto sulla morfologia dei DRG. Inoltre, la somministrazione nè della gabapentina, nè della buprenorfina non ha dato alcun miglioramento delle alterazioni patologiche indotte da bortezomib.

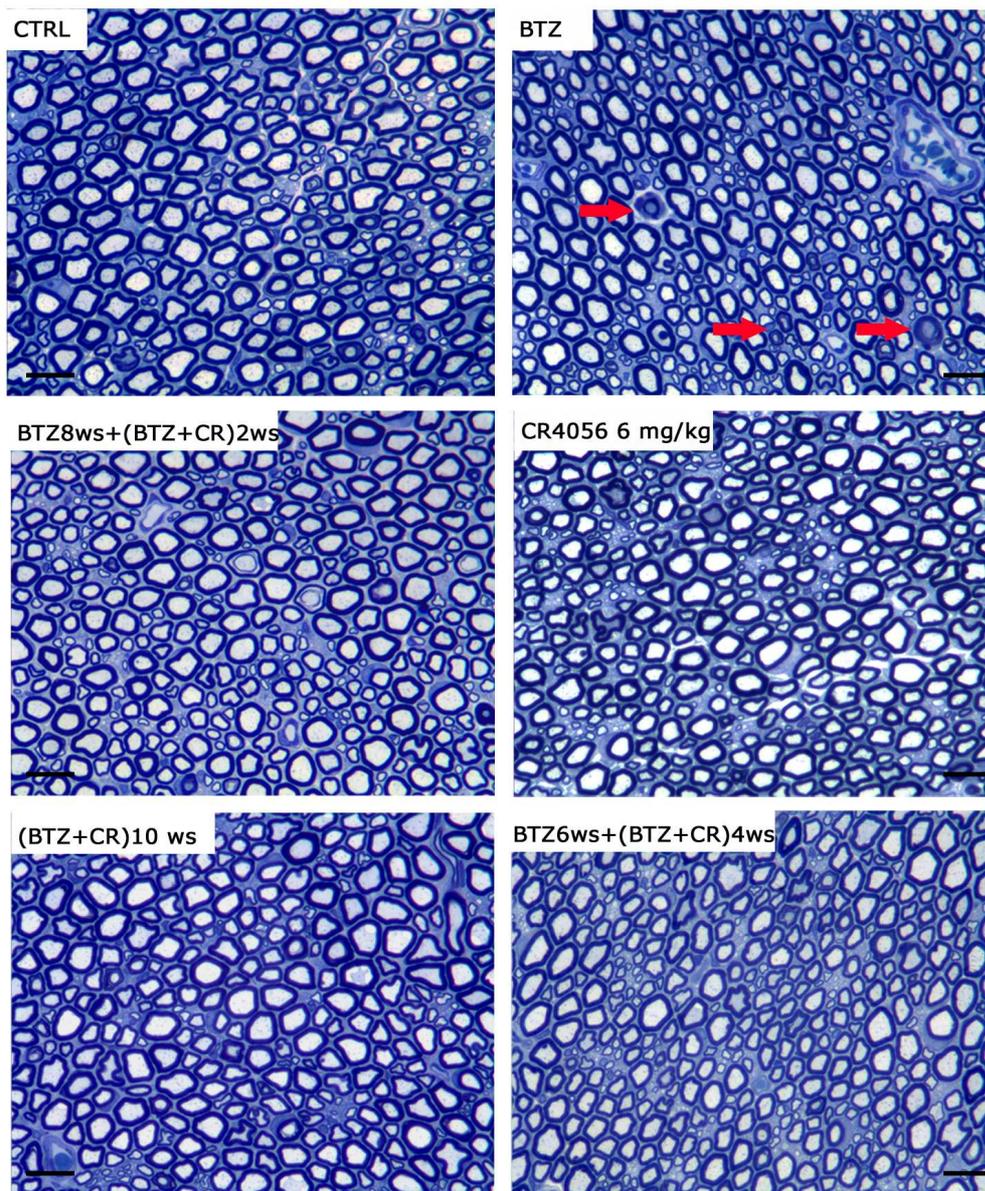
### Esperimento 3

#### *Nervo sciatico*

L'analisi di microscopia ottica effettuata sui nervi sciatici degli animali trattati con bortezomib e prelevati al termine del terzo esperimento, è stato occasionalmente osservato una lieve degenerazione della mielina nelle fibre mieliniche di grosso calibro, anche se la principale alterazione patologica risulta essere un'assonopatia (freccie rosse, Fig. 13). La co-somministrazione di CR4056 e bortezomib non sembra mostrare delle differenze significative attribuibili all'analgésico stesso, in nessuno dei gruppi trattati, né nel protocollo di trattamento preventivo né terapeutico (Fig. 13).

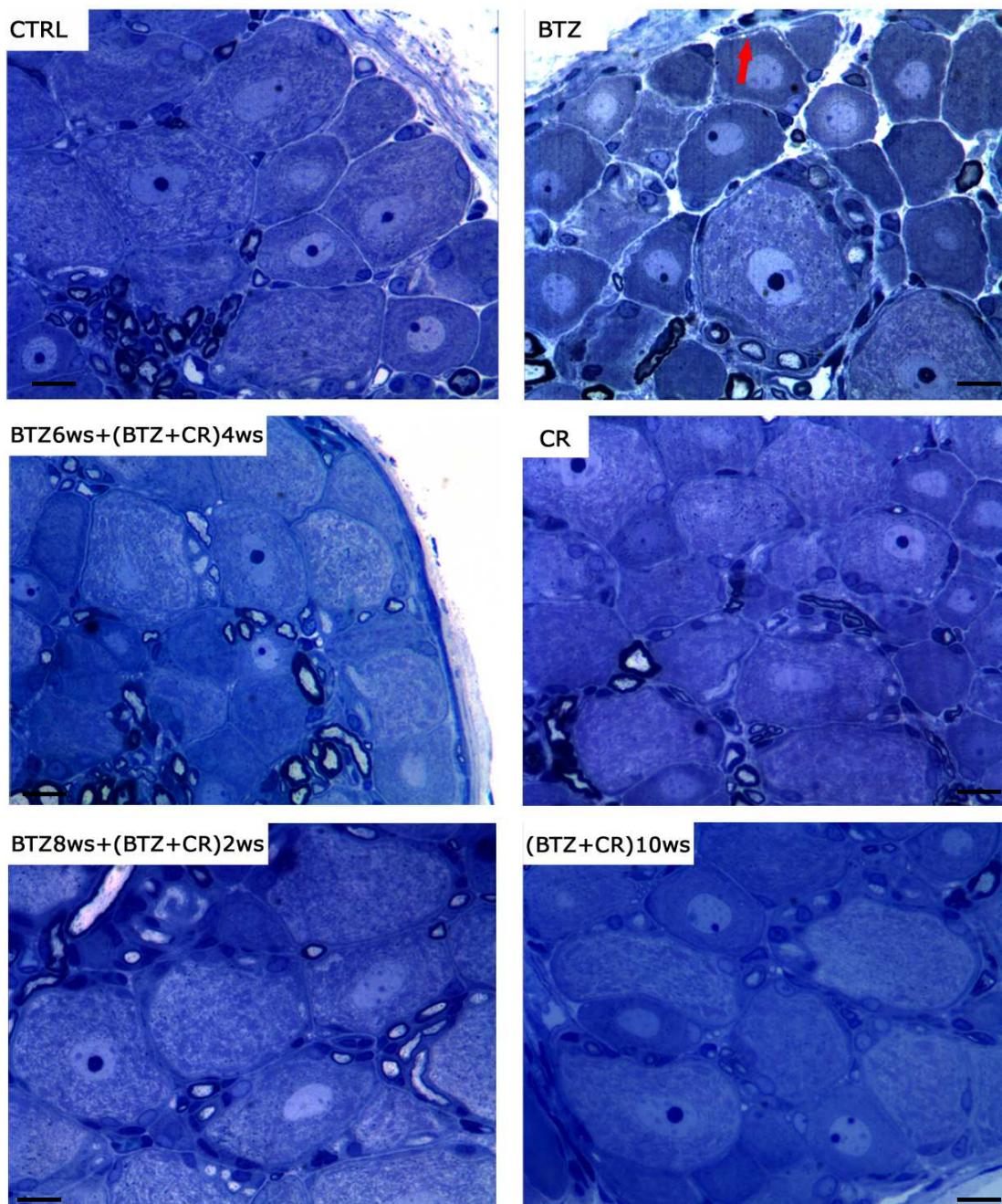
#### *DRG*

All'analisi di microscopia ottica, i campioni degli animali trattati con bortezomib confermano al termine del trattamento, all'assenza di alterazioni morfologiche nella maggior parte delle cellule satelliti dei DRG; infatti vi sono solo rare evidenze di vacuolizzazione nel citoplasma (freccia rossa). La co-somministrazione di bortezomib e CR4056 non ha mostrato alcun effetto morfologico né nella schema di trattamento preventivo né terapeutico (Fig. 14).



**Figura 13:** Tavola dei nervi sciatici dell'esperimento3. Microscopia ottica dei nervi prelevati dagli animali trattati e controllo, a fine esperimento. Nella figura si evidenzia una degenerazione assonale a carico degli animali trattati solo con BTZ (frece rosse), che si osserva anche negli animali in co-trattamento

CTRL:controlli; BTZ 8/10 ws: animali trattati con bortezomib per 8/10 settimane; CR: animali trattati solo con analgesico; BTZ6 ws+(BTZ+CR)4 ws: animali trattati per 6 settimane con solo bortezomib e 4 settimane di cotrattamento BTZ-CR; BTZ8 ws+(BTZ+CR)2 ws: animali trattati per 8 settimane con solo bortezomib e 2 settimane di cotrattamento BTZ-CR; (BTZ+CR)8/10 ws; animali trattati in cotrattamento per 8/10 settimane). (Barra cal: 25  $\mu$ m)



**Figura 14:** Tavola dei DRG dell'esperimento3. Microscopia ottica dei DRG prelevati dagli animali trattati e controllo, a fine esperimento. Nella figura si evidenzia una vacuolizzazione nel citoplasma a carico degli animali trattati solo con BTZ (frecche rosse) (CTRL:controlli; CR: trattamento solo con CR4056; BTZ:bortezomib; (BTZ+CR)10: co-trattamento BTZ/CR4056 dall'inizio dell'esperimento; BTZ6ws+(BTZ+CR) 4ws: 6 settimane di trattamento con bortezomib seguiti da 4 settimane di BTZ+CR4056; BTZ8ws+(BTZ+CR) 4ws: 8 settimane di trattamento con bortezomib seguiti da 2 settimane di BTZ+CR4056. (Barra cal: 50  $\mu$ m)

#### 1.4 TEST COMPORTAMENTALI: Dynamic e Plantar test

In tutti i protocolli sperimentali, la misurazione della soglia allodinicica e algica degli animali è stata valutata rispettivamente mediante il dynamic e plantar test. Il dynamic test è stato effettuato all'inizio dell'esperimento, al termine della Fase1 e in tempi stabiliti della Fase2 (giorni 1,3,7,14 per l'esperimento1 e giorni 1,4,14,21 per l'esperimento2) circa 1 h dall'ultima somministrazione di CR4056 e 30 minuti dopo il trattamento con gabapentina e buprenorfina. Per l'esperimento3 le tempistiche di valutazione sono state: inizio esperimento, fine 6° settimana (Fase1), e giorni 7,14,21,28 della Fase2. Il plantar test, invece, è stato effettuato solo nel primo esperimento al termine delle 8 settimane di trattamento con bortezomib e dopo 7 giorni di trattamento con CR4056. In seguito all'assenza di una differenza significativa tra gli animali controllo e trattati con bortezomib, è stato deciso di non ripetere tale test negli esperimenti successivi, per evitare ulteriore e inutile stress agli animali.

#### DYNAMIC TEST

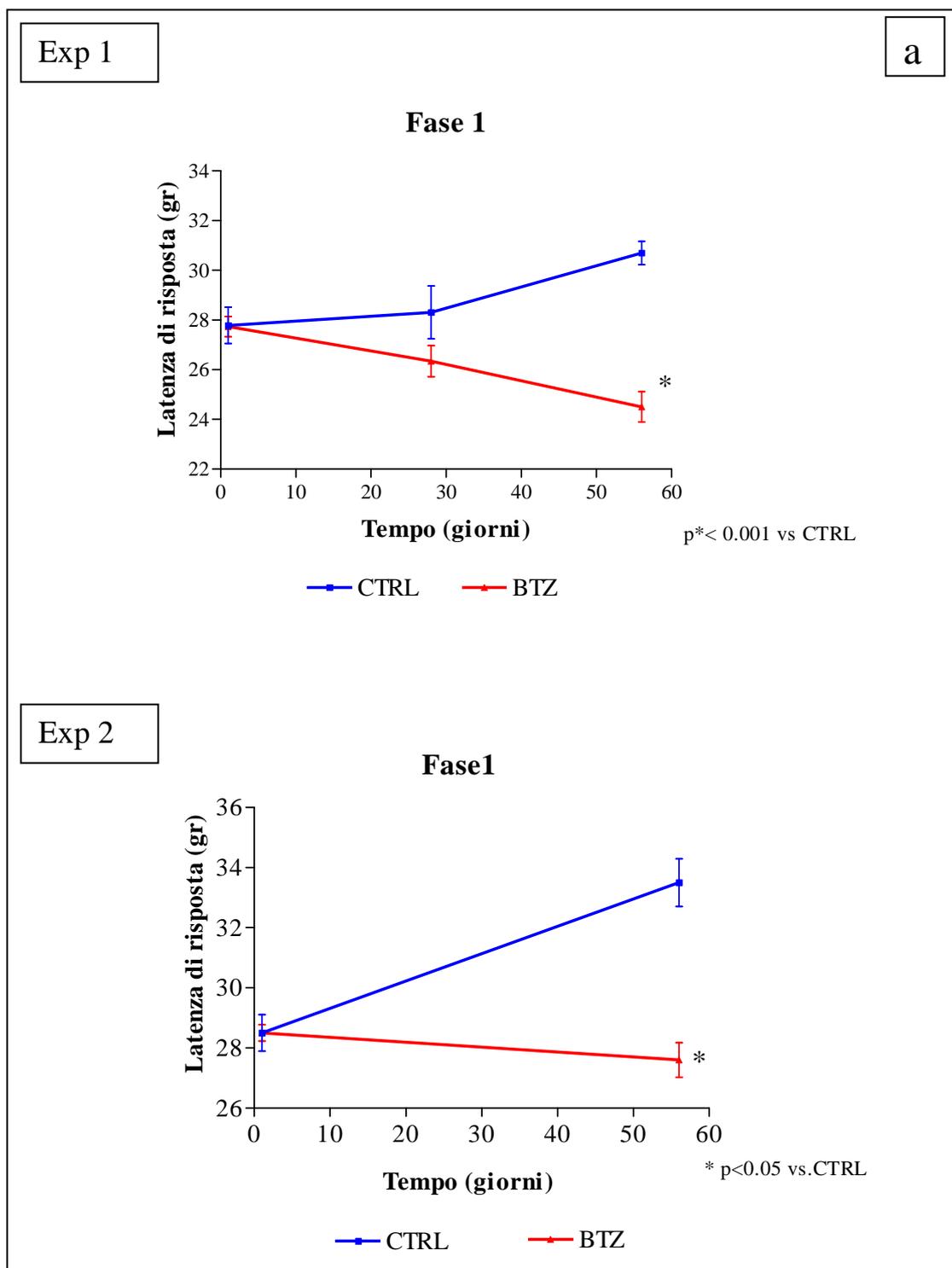
##### Esperimento 1 e 2

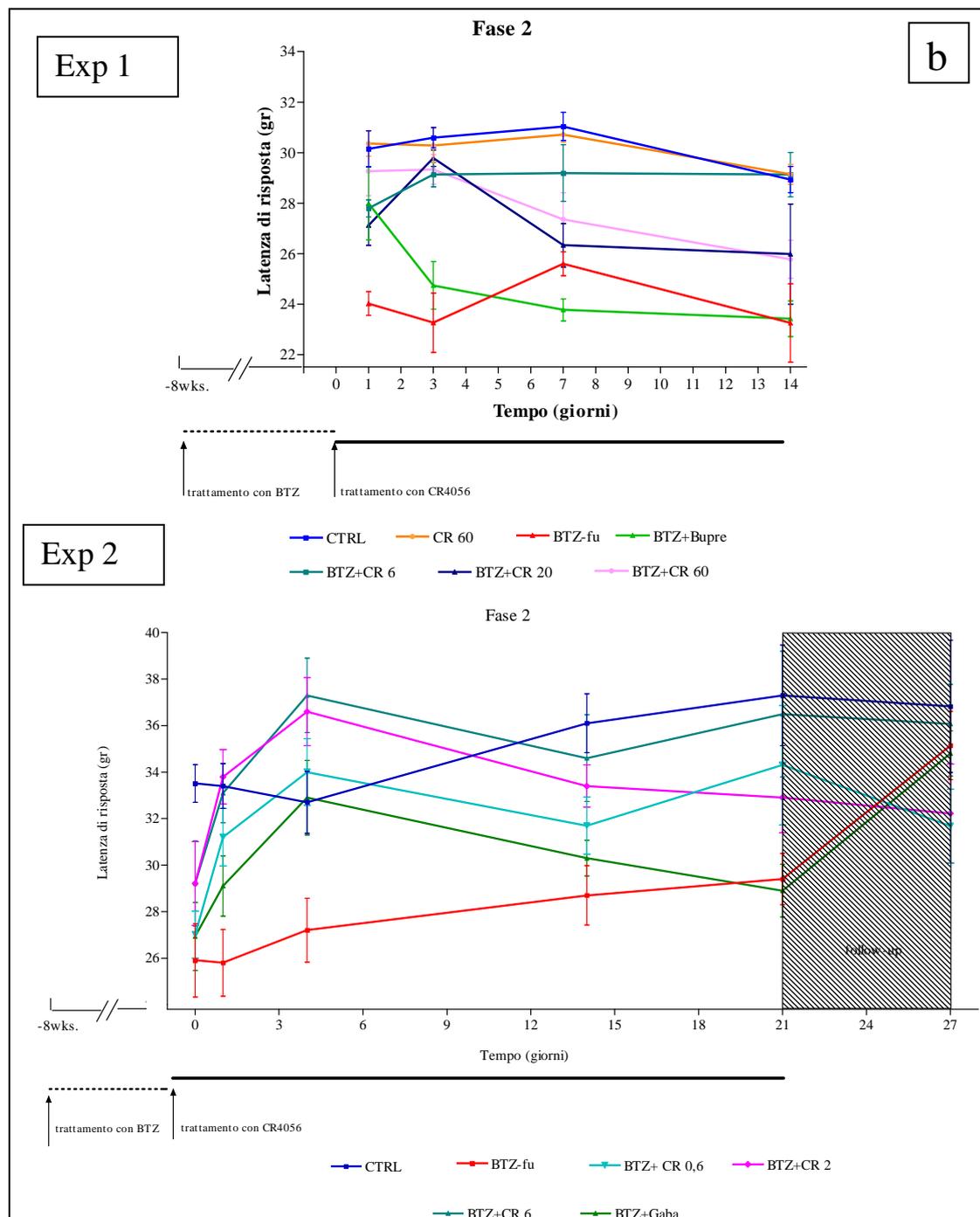
I dati riportati nella Fig. 15a riporta i valori medi di grammi di risposta ( $\pm$  deviazione standard) di ciascun gruppo di animali rispetto ai controlli misurati al termine della Fase1 dell'esperimento1 e 2; mentre la Fig. 15b riporta i grafici derivanti dalla Fase2 dell'esperimento1 e 2.

Gli animali trattati con bortezomib (linea rossa) in entrambi gli esperimenti, al termine della Fase1, mostrano una riduzione statisticamente significativa dei valori di latenza di risposta (espressa in grammi) rispetto ai controlli ( $p < 0.001$  BTZ vs CTRL)(Fig. 15a).

Tale differenza persiste fino al termine della Fase2 nel caso dell'esperimento1, mentre risulta assente dopo il periodo di follow-up del secondo esperimento. La somministrazione del CR4056 alle dosi di 20 e 60 mg/kg è risultata efficace al giorno 1 e 3 ( $p < 0.001$  vs BTZ) ma privo d'effetto nei giorni 7 e 14. Al contrario, la dose di 6 mg/kg si presenta efficace per l'intero periodo di somministrazione della Fase2 ( $p < 0.05$  al giorno1-7 e 14;  $p < 0.001$  al giorno 3 vs BTZ). Infine dal primo esperimento, è stato osservato che la buprenorfina presenta un'efficacia analgesica solo il 1 giorno durante la Fase2 ( $p < 0.05$  vs BTZ). La somministrazione del CR4056 ai dosaggi di 0.6-2 e 6 mg/kg ha mostrato un significativo effetto antiallodinico dose-dipendente.

L'efficacia analgesica della dose di 6 mg/kg si è dimostrata costante per tutta la durata dell'esperimento, mentre la somministrazione con la gabapentina si è dimostrata efficace solo fino al quarto giorno di trattamento.





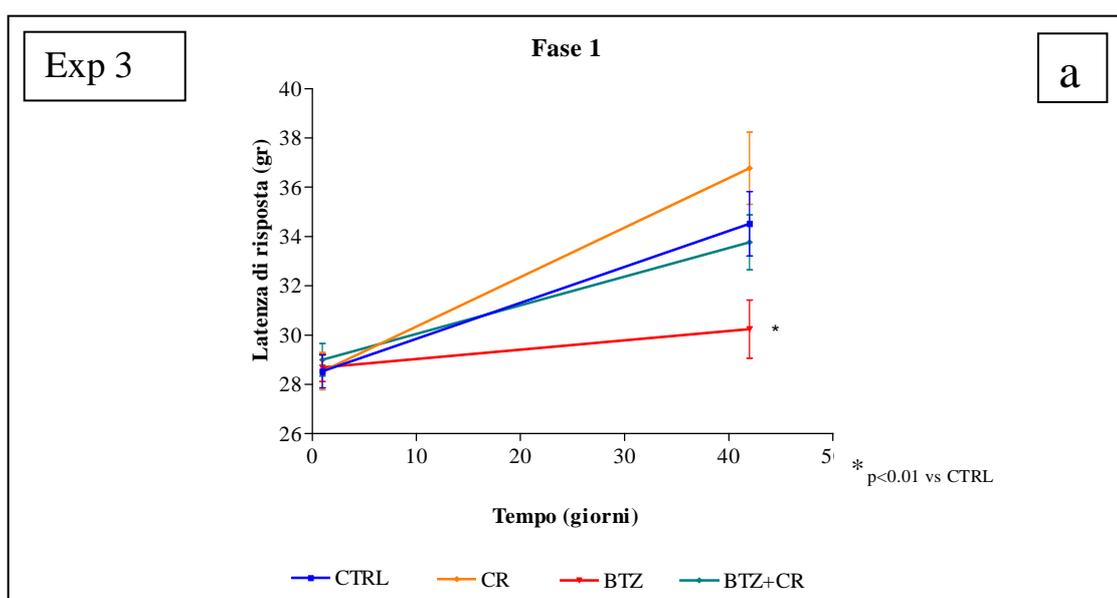
**Figura 15: Dynamic test Fase1(a) e Fase 2(b).** Andamento dei grammi di risposta allo stimolo meccanico osservata nei diversi gruppi di trattamento e negli animali controllo durante esperimento1 e 2. (CTRL:controlli; BTZ 8/10 ws: animali trattati con bortezomib per 8/10 settimane; CR: animali trattati solo con analgesico; BTZ6 ws+(BTZ+CR)4 ws: animali trattati per 6 settimane con solo bortezomib e 4 settimane di cotrattamento BTZ-CR; BTZ8 ws+(BTZ+CR)2 ws: animali trattati per 8 settimane con solo bortezomib e 2 settimane di cotrattamento BTZ-CR; (BTZ+CR)8/10 ws; animali trattati in cotrattamento per 8/10 settimane). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

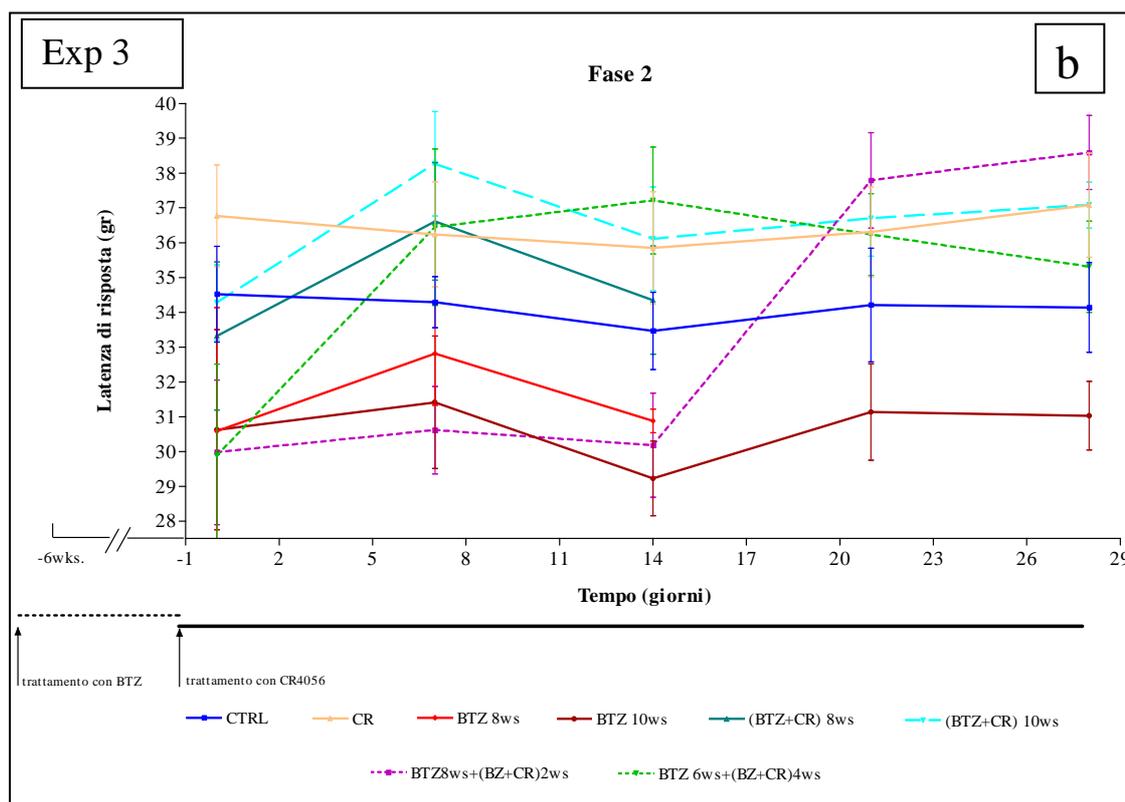
### Esperimento 3

I dati riportati nella Fig. 16a,b riportano i valori medi di grammi di risposta ( $\pm$  deviazione standard) di ciascun gruppo di animali rispetto ai controlli misurati al termine della Fase1 e Fase2 dell'esperimento3

Gli animali trattati con bortezomib al termine della Fase1 (linea rossa), mostrano una riduzione statisticamente significativa dei valori di latenza di risposta rispetto ai controlli ( $p < 0.01$ ) e il gruppo di animali trattati con CR4056 6 mg/kg ( $p < 0.05$ ). Gli animali in co-trattamento BTZ+CR4056 dall'inizio dell'esperimento, invece, non mostrano alcuna differenza significativa rispetto ai controlli (Fig. 16a).

La condizione di allodinia degli animali trattati con bortezomib e l'effetto antiallodinico del CR4056 nei gruppi in co-trattamento dall'inizio dei trattamenti (linea petrolio), persiste fino alla fine della Fase2. Durante la Fase2, la somministrazione di CR4056 in seguito al trattamento solo con bortezomib per 6 e 8 settimane, è in grado di revertire l'allodinia per tutta la Fase2. Anche nell'esperimento3, l'efficacia analgesica della dose di 6 mg/kg si è dimostrata costante in entrambi gli iter sperimentali di trattamento sia preventivo che terapeutico, senza lo sviluppo di fenomeni di tolleranza (Fig. 16b). Durante la Fase2 sono state ottenute differenti significatività circa i grammi di risposta tra i vari gruppi di trattamento alle diverse tempistiche di rilevamento, le quali sono state di seguito riportate di seguito.





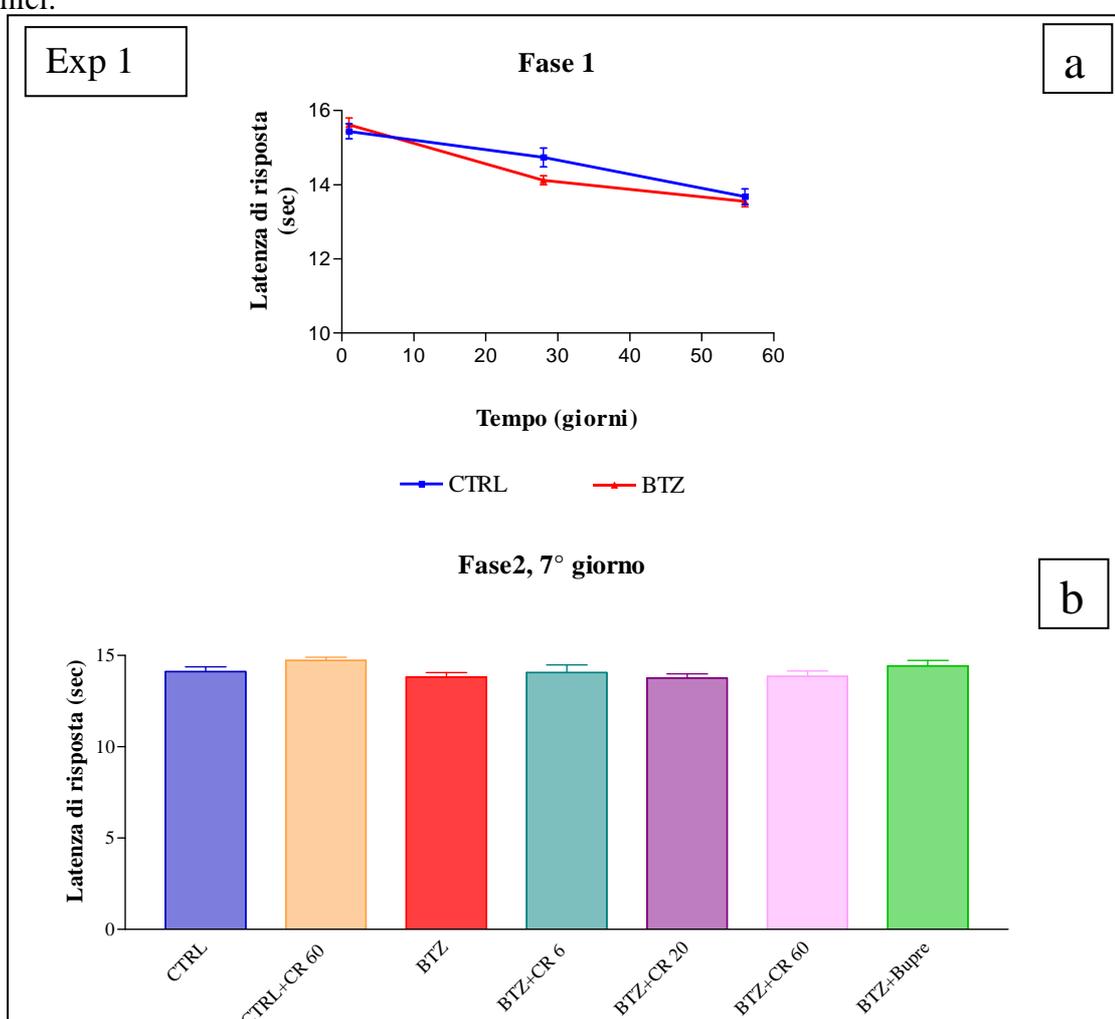
Giorni	Tukey-Kramer post-test	P value
7ws (Fase 2)	BTZ 8ws +(BZ+CR)2ws vs. (BTZ+CR)10ws	P < 0.05
8 ws (Fase 2)	BTZ 6ws +(BTZ+CR)4ws vs. BTZ 10ws	P < 0.05
	BTZ 6ws +(BTZ+CR)4ws vs. BTZ 8ws +(BTZ+CR)2ws	P < 0.05
	BZ 10ws vs. (BTZ+CR) 10ws	P < 0.05
9 ws (Fase 2)	BZ 8ws +(BTZ+CR)2ws vs. BTZ 10ws	P < 0.05
10 ws (Fase 2)	BTZ 10ws vs. CR	P < 0.05
	BTZ 8ws +(BZ+CR)2ws vs. BTZ 10ws	P < 0.001
	BTZ 10ws vs. (BTZ+CR) 10ws	P < 0.01

**Figura 16a,b:** Dynamic test durante la Fase1(a) e Fase2(b), e analisi statistica nel corso della Fase2. Andamento dei grammi di risposta dei diversi gruppi rispetto ai controlli, nel corso della Fase1 e 2 dell'esperimento 3.(CTRL:controlli; BTZ 8/10 ws: animali trattati con bortezomib per 8/10 settimane; CR: animali trattati solo con analgesico; BTZ6ws+(BTZ+CR)4ws: animali trattati per 6 settimane con solo bortezomib e 4 settimane di cotrattamento BTZ-CR; BTZ8ws+(BTZ+CR)2ws: animali trattati per 8 settimane con solo bortezomib e 2 settimane di cotrattamento BTZ-CR; (BTZ+CR)8/10ws; animali in cotrattamento per 8/10 settimane). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

**PLANTAR TEST**

I dati mostrati nella Fig. 17 riporta i valori medi di latenza di risposta ( $\pm$  deviazione standard) di ciascun gruppo di animali rispetto ai controlli misurati al termine della Fase1 e Fase2 dell'esperimento1.

Gli animali trattati con bortezomib (linea rossa), al termine della Fase1, non mostrano alcuna riduzione statisticamente significativa dei secondi di latenza di risposta (rispetto ai controlli (Fig 17a). Tale condizione viene confermata anche durante la Fase2 al settimo giorno di misurazione (Fig 17b), convalidando il dato che nel modello di neuropatia dolorosa presentato in questo studio, non si evidenzia un'alterazione della condizione algica in seguito a stimoli termici.



**Figura 17a,b: Plantar test: Fase1 e Fase2 dell'esperimento1.**

Plantar test dei diversi gruppi rispetto ai controlli (valori medi  $\pm$  deviazione standard) nel corso della Fase1 (a), e Fase2 dell'esperimento1 (b). (CTRL:controlli; BTZ:bortezomib; BTZ+CR 60-6: 8 settimane di bortezomib seguite da trattamento con CR4056; Bupre: buprenorfina). Valori medi  $\pm$  deviazione standard.

## **1.5 EMATOLOGIA ED EMATOCHIMICA**

Al momento del sacrificio, da ciascun animale anestetizzato sia trattato che di controllo, è stato prelevato dall'aorta addominale un campione di sangue. Di questi campioni, come precedentemente descritto nel capitolo "materiali e metodi", vengono analizzati diversi parametri ematochimici ed ematologici. Le medie dei valori misurati per gli animali di controllo e per gli animali trattati per ciascun parametro sono riportate nella tabella 7 (esperimento**1**), tabella 8 (esperimento**2**), tabella 9 (esperimento**3**).

Le analisi ematologiche ed ematochimiche effettuate al termine nella maggior parte degli esperimenti proposti (esperimento**1, 2, 3**) hanno rilevato una lieve trombocitopenia come noto in letteratura (Lonial et al., 2005) in seguito a somministrazione con bortezomib, rispetto agli animali controllo non trattati.

Al momento dei diversi tempi di sacrificio, inoltre, sono stati prelevati e processati lo sterno, il rene e il fegato; in nessuno di questi organi, per nessuno dei protocolli sperimentali testati, sono state evidenziate anomalie patologiche tra gli animali trattati con i diversi composti rispetto agli animali controllo. Non sono state infatti riscontrate lesioni evidenti, né derivanti dal trattamento con bortezomib, né in seguito a CR4056.

<b>EXP 1</b>	<b>GR</b>	<b>GB</b>	<b>PLT</b>	<b>Hb</b>	<b>Ht</b>
<b>Fine fase 1</b>	(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)
CTRL	7,92	3,77	684,55	14,75	42,65
Bortezomib	5,60	3,60	**283,00	9,53	29,03
<b>7 giorni dopo trattamento con CR4056</b>					
CTRL	8,04	3,30	692,67	15,07	43,83
CTRL+CR4056 60 mg/kg	7,70	4,17	798,00	14,27	41,47
Bortezomib	6,87	6,57	595,00	12,20	36,1
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	6,28	5,15	*373,00	11,20	33,50
Bortezomib+CR4056 20 mg/kg	7,46	5,27	509,00	12,70	37,83
Bortezomib+CR4056 60 mg/kg	6,91	4,47	568,67	11,87	35,47
Bortezomib+Buprenorfina	5,38	4,07	*197,33	10,10	29,57
<b>Fine fase 2</b>					
CTRL	7,60	4,23	676,43	14,43	41,47
CTRL+CR4056 60 mg/kg	7,38	6,51	675,29	13,83	40,14
Bortezomib	6,43	6,17	532,33	12,30	35,90
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	6,84	5,35	623,50	12,45	36,88
Bortezomib+CR4056 20 mg/kg	5,58	9,45	546,70	12,77	37,52
Bortezomib+CR4056 60 mg/kg	6,31	7,60	561,13	12,50	36,56
Bortezomib+Buprenorfina	6,64	7,22	595,00	12,40	36,58

	<b>UREA</b>	<b>CREAT</b>	<b>ALT</b>	<b>AST</b>
<b>Fine fase 1</b>	mg/dl	mg/dl	UI/l	UI/l
CTRL	40,3	0,4	43,2	76,15
Bortezomib	53,7	0,3	50,7	107,3
<b>7 giorni dopo trattamento con CR4056</b>				
CTRL	39,7	0,4	39,0	69,0
CTRL+CR4056 60 mg/kg	46,0	0,5	41,0	58,0
Bortezomib	42,8	0,5	40,0	63,5
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	61,0	0,4	48,5	92,5
Bortezomib+Buprenorfina	55,3	0,4	75,7	207,0
Bortezomib+CR4056 20 mg/kg	53,1	0,4	54,7	121,0
Bortezomib+CR4056 60 mg/kg	46,3	0,3	65,3	100,7
<b>Fine fase 2</b>				
CTRL	41,0	0,4	47,4	63,3
CTRL+CR4056 60 mg/kg	32,4	0,4	43,4	59,9
Bortezomib	36,0	0,4	44,7	72,7
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	38,6	0,4	39,6	67,2
Bortezomib+Buprenorfina	41,0	0,4	45,5	70,7
Bortezomib+CR4056 20 mg/kg	42,8	0,4	55,8	80,7
Bortezomib+CR4056 60 mg/kg	53,8	0,4	52,3	71,8

**Tabella 7: Valori di ematologia ed ematochimica dell'esperimento1.**

Valori di animali controllo e trattati con diverse dosi di CR4056 (CTRL: controllo; BTZ:bortezomib; CR6-20: dosaggi in studio del CR4056; Bupre:buprenorfina; GB:globuli rossi; GB:globuli bianchi; PLT: piastrine; Ht:emoglobina, Ht: ematocrito, ALT: alanina amino transferasi; AST: aspartatoaminotransferasi, \*p<0.005 vs ctrl;\*\*p<0.0001 vs ctrl. Fase1: t-test; Fase2: Anova+Dunnet post test ).

<b>EXP 2</b>	<b>GR</b>	<b>GB</b>	<b>PLT</b>	<b>Hb</b>	<b>Ht</b>
	(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)
<b>Fine trattamento con CR4056</b>					
CTRL	7,09	7,73	681,10	14,33	40,22
Bortezomib	5,89	10,83	592,90	11,71	33,70
Bortezomib+CR4056 0.6 mg/kg	6,41	9,91	*529,50	12,51	36,71
Bortezomib+CR4056 2 mg/kg	6,41	11,22	649,00	12,47	36,30
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	6,58	11,09	658,60	13,31	38,61
Bortezomib+Gabapentina	6,98	11,70	615,30	13,88	40,31
<b>Fine follow-up</b>					
CTRL	7,14	6,17	668,14	14,09	40,24
Bortezomib	6,82	10,31	592,57	13,29	38,79
Bortezomib+CR4056 0.6 mg/kg	6,46	9,62	606,17	12,75	37,52
Bortezomib+CR4056 2 mg/kg	7,07	10,73	674,29	13,57	40,06
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	6,48	10,31	658,00	13,13	38,76
Bortezomib+Gabapentina	6,94	11,77	603,71	13,74	40,26

	<b>UREA</b>	<b>CREAT</b>	<b>ALT</b>	<b>AST</b>
	mg/dl	mg/dl	UI/l	UI/l
<b>Fine trattamento con CR4056</b>				
CTRL	39,4	0,49	51,6	78,7
Bortezomib	43,1	0,45	46,9	74,7
Bortezomib+CR4056 0.6 mg/kg	42,3	0,48	50,8	85,7
Bortezomib+CR4056 2 mg/kg	44,5	0,45	55,6	84,9
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	47,6	0,46	55,9	91,9
Bortezomib+Gabapentina	49,8	0,43	54,2	89,6
<b>Fine follow- up</b>				
CTRL	44,71	0,47	52,29	80,14
Bortezomib	43,00	0,46	53,00	77,57
Bortezomib+CR4056 0.6 mg/kg	45,67	0,51	54,00	80,00
Bortezomib+CR4056 2 mg/kg	46,00	0,45	53,29	74,29
Bortezomib+CR4056 6 mg/kg	51,86	0,47	57,57	96,29
Bortezomib+Gabapentina	54,43	0,44	54,57	97,86

**Tabella 8: Valori di ematologia ed ematochimica dell'esperimento2.**

Valori di animali controllo e trattati con diverse dosi di CR4056 (CTRL: controllo; BTZ:bortezomib; CR0.0.6-6: dosaggi in studio del CR4056; Gaba:gabapentina; GB:globuli rossi; GB:globuli bianchi; PLT: piastrine; Ht:emoglobina, Ht: ematocrito, ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartatoaminotransferasi, \*p<0.05 vs ctrl. ANOVA+Dunnet post test)

<b>EXP 3</b>	<b>GR</b>	<b>GB</b>	<b>PLT</b>	<b>Hb</b>	<b>Ht</b>
	(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	(x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(%)
<b>8ws</b>					
CTRL	6,94	3,23	682,67	13,17	38,47
CR4056 6mg/kg	7,02	3,63	721,00	13,85	40,50
Bortezomib 10 ws	5,93	4,33	*335,25	11,78	35,20
(Bortezomib+CR4056) 10 ws	5,60	5,16	*412,63	10,59	31,81
<b>10ws</b>					
CTRL	7,17	3,38	651,00	14,35	41,78
CR4056 6mg/kg	7,62	5,1	679,30	15,3	44,3
Bortezomib 10 ws	6,23	4,9	*362,30	11,8	35,3
Bortezomib 6ws+ (Bortezomib+CR4056 6 mg/kg) 4ws	5,96	3,69	*219,13	11,61	34,60
Bortezomib 8ws+ (Bortezomib+CR4056 6 mg/kg) 2 ws	6,77	5,22	*369,12	12,65	37,77
(Bortezomib+CR4056) 10 ws	6,66	6,0	470,80	12,3	36,6

	<b>UREA</b>	<b>CREAT</b>	<b>ALT</b>	<b>AST</b>
	mg/dl	mg/dl	UI/l	UI/l
<b>8ws</b>				
CTRL	42,50	0,55	41,00	75,75
CR4056 6mg/kg	46,75	0,59	44,50	89,50
Bortezomib 10 ws	53,60	0,49	47,40	85,00
(Bortezomib+CR4056) 10 ws	56,44	0,49	45,11	94,78
<b>10ws</b>				
CTRL	39,33	0,44	44,83	76,50
CR4056 6mg/kg	37,67	0,41	48,67	74,33
Bortezomib 10 ws	49,33	0,40	48,78	79,33
Bortezomib 6ws+ (Bortezomib+CR4056 6 mg/kg) 4ws	54,80	0,38	62,60	114,67
Bortezomib 8ws+ (Bortezomib+CR4056 6 mg/kg) 2 ws	53,33	0,41	46,33	80,33
(Bortezomib+CR4056) 10 ws	50,57	0,42	49,57	81,80

**Tabella 9: Valori di ematologia ed ematochimica dell'esperimento3.**

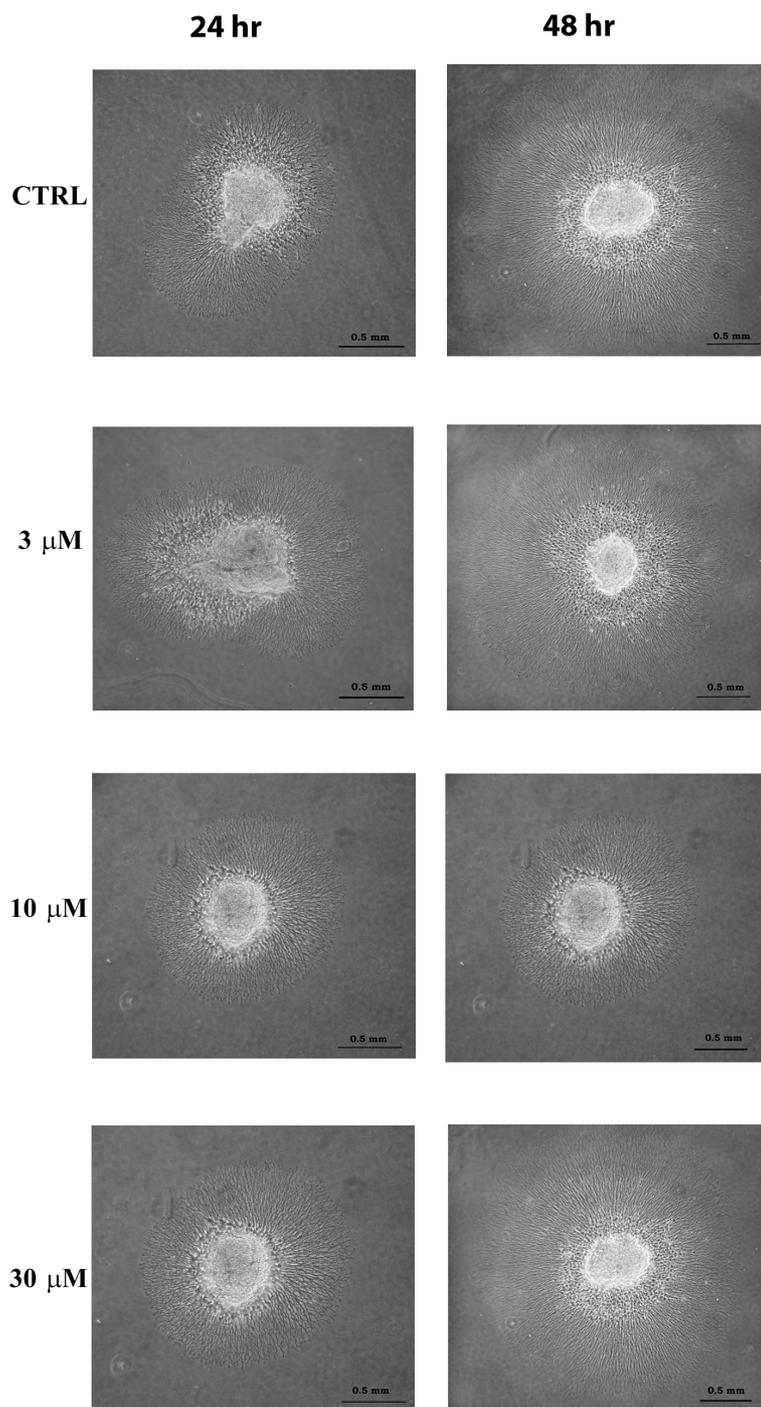
Valori di animali controllo e trattati con diverse dosi di CR4056 (CTRL: controllo; BTZ:bortezomib; CR0.6: unica dose CR4056; GB:globuli rossi; GB:globuli bianchi; PLT: piastrine Ht:emoglobina, Ht: ematocrito, ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartatoaminotransferasi, \*p<0.05 vs ctrl;\*\*p<0.01 vs ctrl, Anova+Dunnet post test ).

## **2. STUDI IN VITRO**

### **2.1 Colture organotipiche di gangli delle radici dorsali trattati con CR4056**

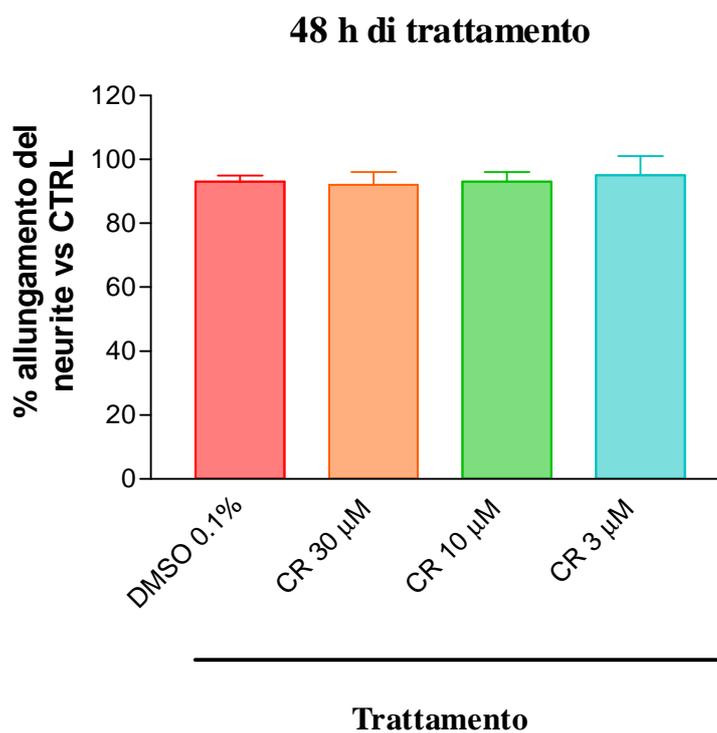
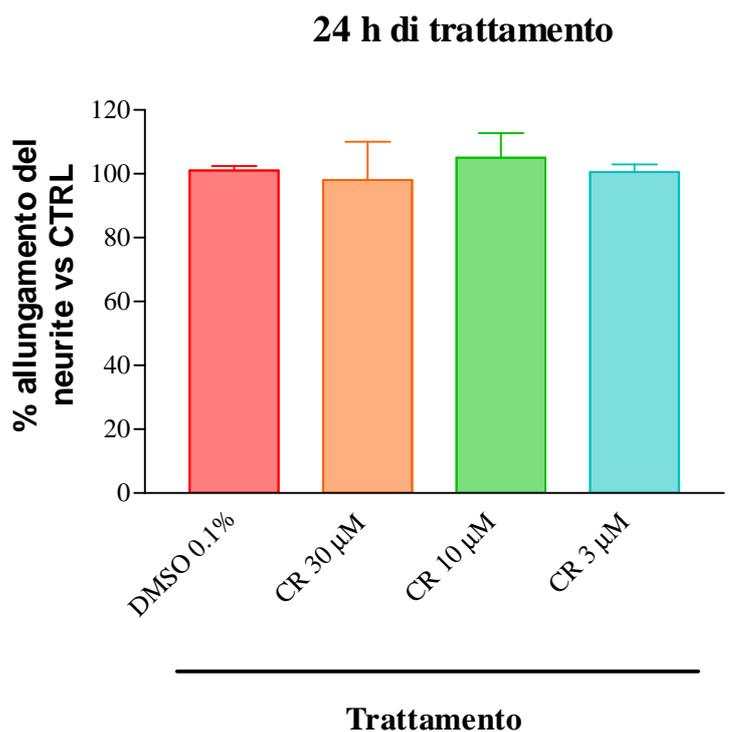
Prima di studiare la tossicità periferica indotta dalla somministrazione di bortezomib tramite la messa a punto di un modello animale è stato condotto uno studio *in vitro* su DRG prelevati da embrioni di ratti Sprague Dawley per valutare la tossicità di CR4056 a livello dei neuriti dei corpi cellulari. I DRG prelevati sono stati trattati con differenti concentrazioni di CR4056 (3-30  $\mu$ M) e DMSO (dimetilsolfossido, sostanza in cui viene risospeso il farmaco).

In questo esperimento, come visibile sia dalle immagini che dai grafici in seguito riportati, l'allungamento dei neuriti dei DRG trattati con CR4056 a tutte le dosi e con DMSO non mostrano alcuna variazione significativa rispetto ai DRG controllo (Fig. 18 e Fig. 19).



**Figura 18: Allungamento del neurite.**

Immagini rappresentative della misura dell'allungamento del neurite dei DRG trattati con CR4056 rispetto alle colture controllo dopo 24 e 48h dal trattamento (CTRL: controlli; 3-30 μM: dosi di trattamento con CR4056).



**Figura 19:** Riduzione percentuale dell'allungamento del neurite.

Riduzione percentuale dell'allungamento del neurite (a) riduzione percentuale dopo 24 h di trattamento rispetto ai controlli, (b) riduzione percentuale dopo 48 h di trattamento rispetto ai controlli (DMSO: CR: trattamento con CR4056 alle dosi 3-30 µM).

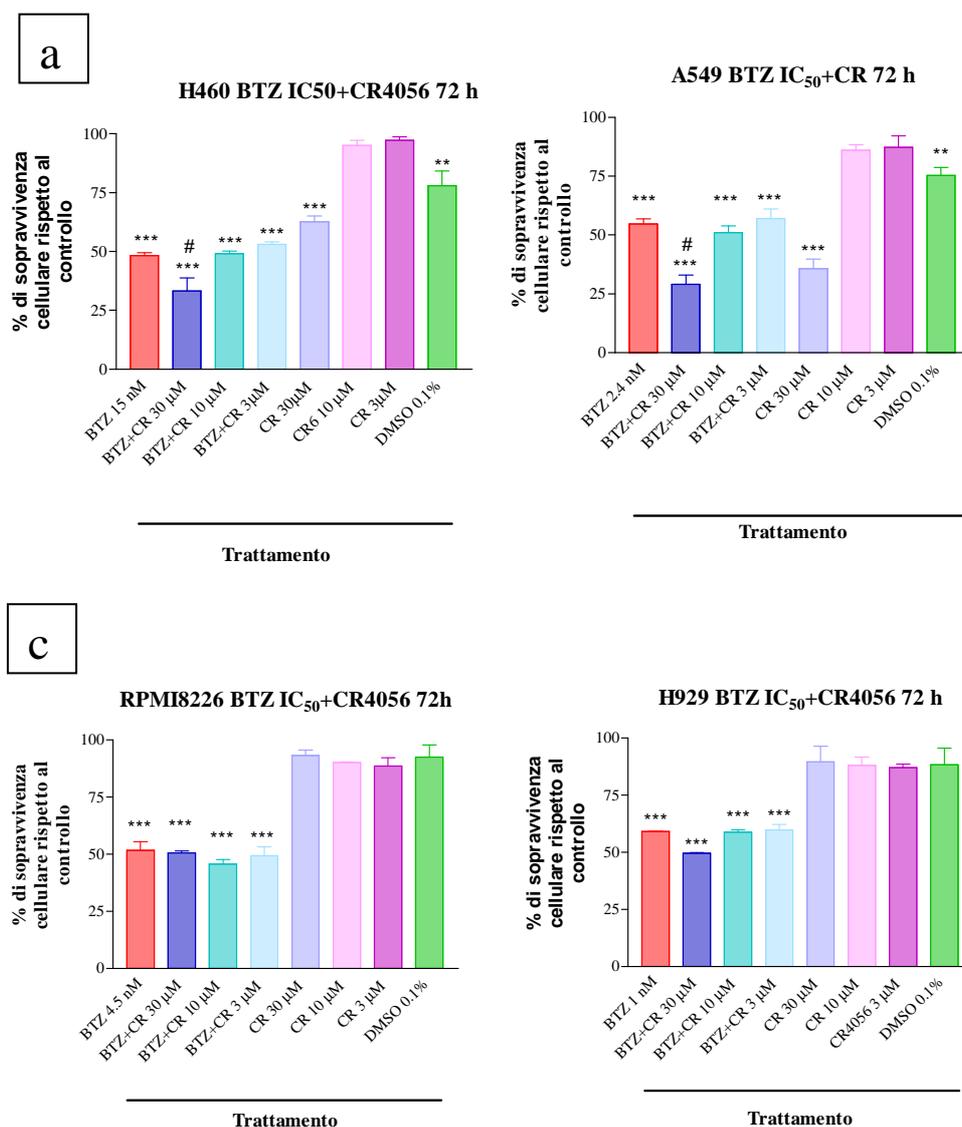
## 2.2 Saggio di citotossicità

Contemporaneamente agli studi di valutazione *in vivo* dell'attività analgesica di CR4056, sono stati condotti esperimenti su differenti linee cellulari (A549, H460, RPMI8226 e H929), volti a valutare la citotossicità indotta da bortezomib. Per valutare quindi, l'inibizione della crescita cellulare, tutte le linee cellulari sono state piastrate e trattate per 72h con differenti concentrazioni crescenti di bortezomib (0.05-250 nM) e poi incubate con MTT.

Da questo esperimento è stato possibile evincere che bortezomib induce un'inibizione della crescita cellulare concentrazione dipendente in tutte le linee cellulari testate. In particolare, la linea cellulare di mieloma H929 si è dimostrata la linea cellulare più sensibile dopo 72 h di trattamento ( $IC_{50} = 1.0 \pm 0.25$  nM), seguita dalle linee A549 ( $IC_{50} = 2.4 \pm 0.3$  nM), RPMI8226 ( $IC_{50} = 4.5 \pm 0.8$  nM) e H460 ( $IC_{50} = 15 \pm 0.6$  nM).

## 2.3 Studio di non interferenza

L'identificazione dell' $IC_{50}$  peculiare per ogni differente linea cellulare, si è resa indispensabile per permettere di effettuare i successivi studi di combinazione tra bortezomib e il CR4056, in questo caso tutte le cellule sono state trattate con bortezomib per 72 h. Dai dati ottenuti, è possibile affermare che per le linee cellulari di mieloma A549 e H460 in cotrattamento, la dose maggiore di CR4056 (30  $\mu$ M) è in grado di indurre una significativa diminuzione nella sopravvivenza cellulare rispetto alle cellule trattate solo con bortezomib ( $^{\#}p < 0.01$ ) (Fig. 20a,b). Al contrario nelle linee cellulari H929 e RPMI8226 il co-trattamento con CR4056 per nessuna dose utilizzata, evidenzia una significativa differenza nella sopravvivenza cellulare rispetto al gruppo trattato solo con bortezomib, ma mostrano solo una differenza significativa rispetto ai controlli ( $***p < 0.001$ ) (Fig. 20c,d). Questo effetto probabilmente è da imputare all'alta presenza di DMSO necessaria per dissolvere la concentrazione maggiore del CR4056; infatti le cellule trattate solo con DMSO 0.1% presentano rispetto alle cellule non trattate, una significativa diminuzione della sopravvivenza cellulare sia nella linea cellulare A549 sia nelle cellule H460 ( $**p < 0.01$ ).



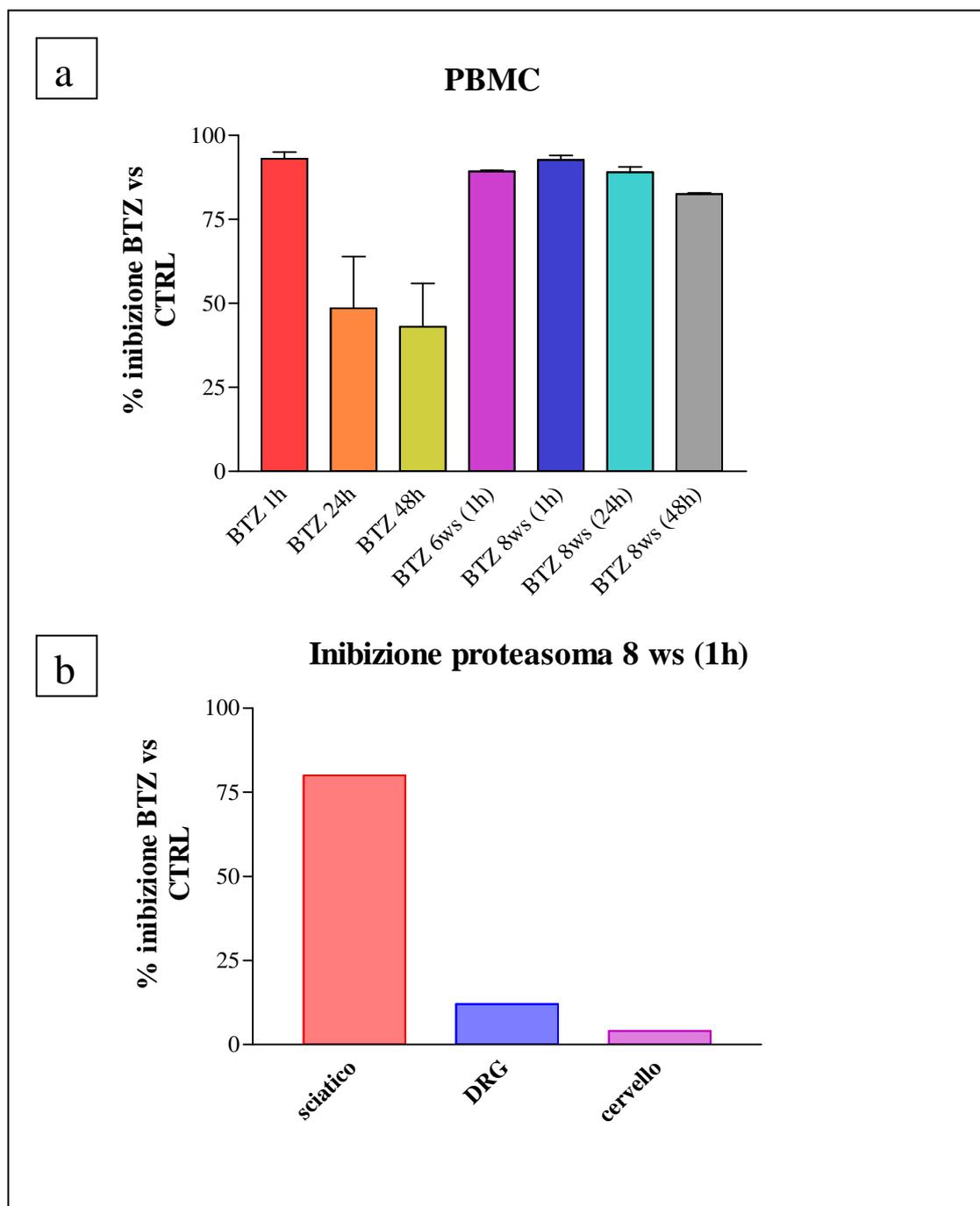
**Figura 20: Effetto citotossico di bortezomib e CR4056 nelle linee cellulari A549, H460, RPMI8226, H929.**

I grafici mostrano la valutazione della crescita cellulare di tutte le linee cellulari trattate singolarmente o in combinazione con bortezomib e/o CR4056. I risultati sono una media di tre esperimenti indipendenti, espressi come percentuale di sopravvivenza cellulare  $\pm$  deviazione standard rispetto alle cellule non trattate (valori delle cellule controllo settata come il 100%) (BTZ: bortezomib, CR: CR4056, DMSO: dimetilsolfossido;  $p^{**}<0.01$  vs CTRL,  $p^{***}<0.001$  vs CTRL; # $p<0.01$  vs BTZ).

#### **4. EFFETTO FARMACODINAMICO DI BORTEZOMIB SULL'ATTIVITA' DEL PROTEASOMA**

Nell'analisi dell'attività del proteasoma sono stati prelevati differenti tessuti a diverse tempistiche di analisi. Infatti l'analisi a carico dei blood mononuclear cells (PBMC) è stata effettuata 1, 24 e 48 h dopo la prima somministrazione di bortezomib (trattamento in acuto), dopo 1h alla sesta settimana di trattamento e dopo 1, 24 e 48h dopo l'ultima somministrazione a fine trattamento di 8 settimane (trattamento in cronico). Invece il prelievo del nervo sciatico, DRG e cervello è stato eseguito 1h dopo le 8 settimane di trattamento. Una volta prelevato il materiale e sottoposto al saggio di attività del proteasoma, sono stati ottenuti delle percentuali di rapporto tra i valori degli animali trattati con bortezomib 0.20 mg/kg 3qw per 8 settimane rispetto agli animali controllo. Ogni punto sperimentale è dato dalla media delle percentuali ottenute da tre esperimenti indipendenti tra loro. Il valore di inibizione è stato ottenuto come:  $100 * [1 - (\text{attività del proteasoma})]$ .

Secondo i risultati ottenuti, è possibile vedere nei PBMC di animali trattati con bortezomib, un'inibizione del proteasoma del 90% rispetto agli animali controllo, presente sia dopo 1h dal singolo trattamento, sia in seguito all'ultima somministrazione delle 8 settimane. Risulta però importante osservare delle sostanziali differenze nel profilo di inibizione tempo dipendente tra le due tipologie di trattamento circa la capacità di recovery della cellula. Infatti è possibile vedere come nel caso della singola somministrazione acuta, l'attività del proteasoma recupera parzialmente già dopo 24h, mentre nel caso del trattamento cronico da bortezomib i livelli di inibizione del proteasoma restano molto alti anche dopo 48 h dalla somministrazione (Fig 21a). Tale evento risulta probabilmente imputabile ad un effetto dose cumulativo del farmaco nel suo organo bersaglio. Anche a livello del nervo sciatico è possibile osservare un'alta inibizione del proteasoma > dell'80% al termine del trattamento con bortezomib, contrariamente per quanto accade nel DRG e nel cervello in cui è nota l'incapacità del farmaco di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) (Fig 21b).

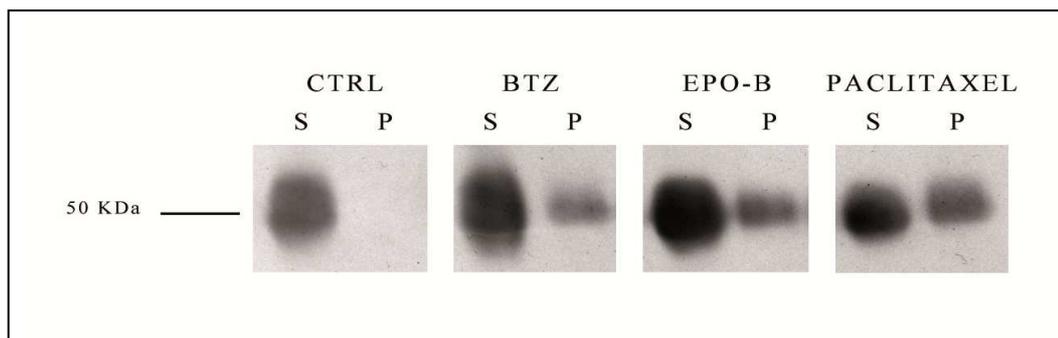


**Figura 21:** Saggio di inibizione del proteasoma in diversi tessuti. L'immagine mostra la percentuale di inibizione del proteasoma nei PBMC e diversi tessuti di animali trattati con bortezomib rispetto gli animali controllo (CTRL:controllo; BTZ:bortezomib; PBMC:cellule mononucleate sangue periferico; DRG: dorsal root ganglion)

#### **4. VALUTAZIONE DELLA FORMA POLIMERIZZATA DELL' $\alpha$ - TUBULINA ACETILATA**

##### FASE 1:

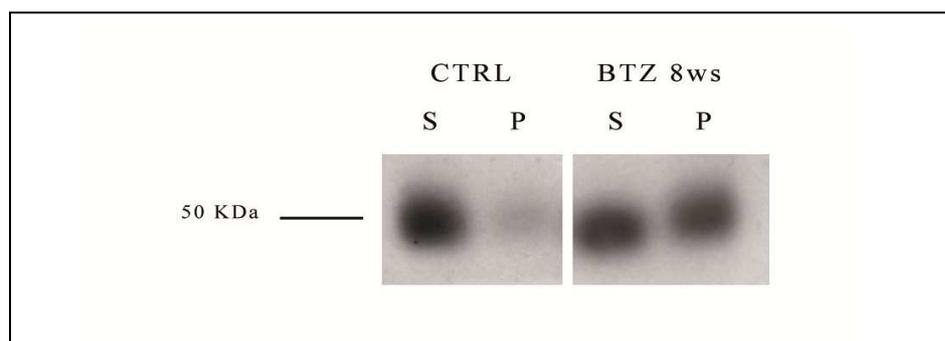
Per ottenere delle indicazioni circa l'eventuale implicazione della polimerizzazione della tubulina come meccanismo d'azione della neuropatia periferica indotta da bortezomib è stato condotto un esperimento preliminare che ci ha permesso di valutare il diverso grado di polimerizzazione della tubulina acetilata in seguito ad estrazione delle proteine da nervo sciatico. Su gel di acrilammide sono stati caricati 50 $\mu$ g di proteine del pellet (frazione che contiene la porzione solubile della tubulina) e 50  $\mu$ g di proteine del surnatante (frazione che contiene la porzione polimerizzata della tubulina), estratte da ratti controllo e animali trattati con bortezomib (0,20 mg/kg 3 volte a settimana per 8 settimane), epotilone B (0,25 mg/kg 1 volta a settimana per 4 settimane) e paclitaxel (10 mg/kg 1 volta a settimana per 4 settimane). Gli estratti di questi ultimi due chemioterapici sono stati ottenuti da precedenti studi effettuati presso il nostro laboratorio, volti a caratterizzare modelli di neuropatia periferica. Come mostrato in Fig 22, gli anticorpi diretti contro la forma acetilata della  $\alpha$ -tubulina (peso molecolare di 50 KDa), hanno permesso di individuare l'effettiva presenza di una maggiore espressione di tale proteina (indice di stabilità dei microtubuli) nel pellet degli animali trattati vs CTRL, indicandone quindi un aumento della stabilità dei microtubuli. Come osservabile il grado di polimerizzazione varia tra i diversi tipi di trattamento, indicando come maggiore stabilizzatore di microtubuli il paclitaxel. È stato comunque osservato un aumento della polimerizzazione anche negli animali trattati con bortezomib (con dosaggi e tempistiche proposte nel nostro modello) rispetto gli animali controllo, richiedendo un'ulteriore analisi quantitativa svolta nella seconda fase dello studio.



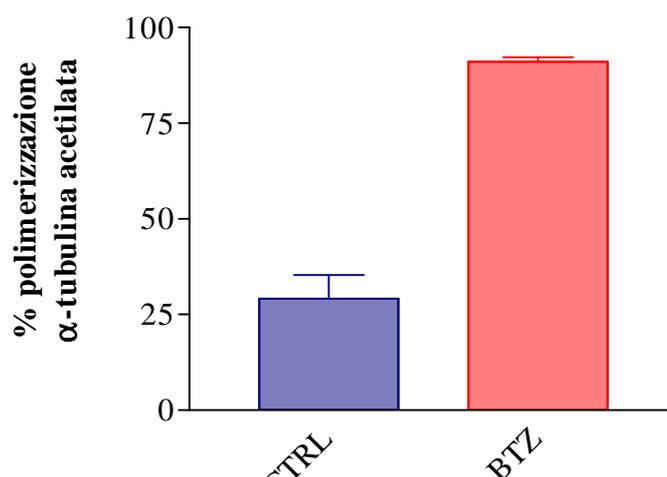
**Figura 22: Analisi di immunoblotting.** L'immagine mostra l'espressione della forma acetilata della  $\alpha$ -tubulina nella frazione surnatante (S) e nel pellet (P) di animali controllo (CTRL), bortezomib 0,20 mg/kg 3 volte a settimana per 8 settimane (BTZ), epotilone-B 0,25 mg/kg 1 volta a settimana per 4 settimane (EPO-B), paclitaxel 10 mg/kg 1 volta a settimana per 4 settimane (PACLITAXEL).

## FASE 2:

In questa seconda fase, al fine di ottenere delle bande adeguate per una valutazione densitometrica quantificabile sono stati caricati 50 $\mu$ g di proteine del pellet e 10  $\mu$ g di proteine del surnatante, estratte da nervi sciatici di ratti controllo e animali somministrati con bortezomib per 8 settimane, 3 volte a settimana. Al termine del periodo di trattamento sono stati prelevati i nervi sciatici e congelati per essere processati per la valutazione della polimerizzazione della tubulina. Come mostrato in Fig 23, gli anticorpi diretti contro la forma acetilata della  $\alpha$ -tubulina (peso molecolare di 50 KDa), hanno permesso di individuare una maggiore espressione di tale proteina (indice di stabilità dei microtubuli) nel pellet degli animali trattati rispetto ai CTRL. La quantificazione di tale dato indica che gli animali trattati con bortezomib, con dosaggi e tempistiche proposte nel nostro modello, presentano un aumento della stabilità dei microtubuli del 30% rispetto agli animali controllo.



**Figura 23: Analisi di immunoblotting.** L'immagine mostra l'espressione della forma acetilata della  $\alpha$ -tubulina nella frazione surnatante (S) e nel pellet (P) di animali controllo (CTRL) e trattati con bortezomib (BTZ) per 8 settimane.



**Figura 24: Percentuale di polimerizzazione** Percentuale di  $\alpha$ -tubulina acetilata polimerizzata nel pellet (P) rispetto  $\alpha$ -tubulina acetilata polimerizzata nel surnatante (S) in animali controllo e in animali trattati per 8 settimane con bortezomib.

Il valore densitometrico di percentuale di polimerizzazione è stato ottenuto come :

valore pellet /valore surnatante per ogni gruppo sperimentale

Entrambi gli esperimenti sono stati verificati in tre trials sperimentali indipendenti in cui lo schema di trattamento è rimasto sempre il modello base di bortezomib (Meregalli et al., 2010) 3 volte a settimana per 8 settimane.

## **DISCUSSIONE**

La neuropatia periferica dolorosa si presenta come un effetto collaterale noto nell'impiego di farmaci chemioterapici (Polomano and Bennet, 2001). Le maggiori classi di agenti antitumorali, i vinca alcaloidi (vincristina), taxani (paclitaxel), e composti platino-derivati (cisplatino), sono associati allo sviluppo di dolore neuropatico dose-limitante. La presenza e severità della neuropatia indotta dai chemioterapici può variare a seconda del farmaco utilizzato, dalla scheda di trattamento, dal tipo del tumore e dalla presenza di complicanze mediche (Cata et al., 2006).

In seguito a studi di fase 2 effettuati dai gruppi di Richardson e Jagannath, in pazienti affetti da mieloma multiplo e trattati con bortezomib, è stato riportato come effetto limitante al trattamento l'insorgenza di dolore neuropatico (Richardson et al. 2003, Jagannath et al., 2004). La scomparsa dei sintomi avviene nella maggior parte dei pazienti dopo la sospensione del trattamento (Cavaletti and Nobile-Orazio, 2007).

Il dolore neuropatico è una condizione cronica scatenata da diverse cause, tra le quali l'utilizzo dei chemioterapici, determinato principalmente da un danno nel sistema nervoso centrale (SNC) o periferico (SNP). Tra i sintomi più frequenti si trovano l'ipersensibilità a stimoli normalmente innocui, condizioni conosciute di "allodinia tattile" che risulta spesso essere refrattaria ai farmaci anti-infiammatori non steroidei (NSAIDs) e agli oppioidi (Backonja and Glanzman, 2003). Attualmente gli unici rimedi utilizzati per alleviare il dolore neuropatico sono alcuni antidepressivi come la duloxetina, gli anticonvulsivanti come la gabapentina, gli anestetici locali (McQuay et al., 1996; Moulin et al., 2007; Saarto and Wiffen 2010). Poiché diversi trial clinici dimostrano una limitata efficacia di tali farmaci, risulta importante continuare a investire sullo sviluppo di nuovi composti analgesici.

Una classe emergente di composti impiegati per la cura del dolore, è costituita da farmaci che agiscono a livello dei recettori imidazolinici (IRs). Tali recettori hanno mostrato una rilevanza fisiologica nella regolazione sia della funzionalità neuronale che non-neuronale e i loro ligandi sono ad oggi studiati come possibili modulatori del dolore neuropatico.

Queste molecole hanno finora dimostrato di possedere vari effetti farmacologici, e la loro implicazione è stata verificata in varie patologie come la depressione, l'Alzheimer, il dolore neuropatico e la sindrome di tolleranza agli oppioidi (Piletz et al., 2000, Garcia-Sevilla et al., 1998).

Inoltre, alcuni gruppi di ricerca hanno descritto un'associazione tra i recettori imidazolinici I<sub>2</sub> e le monamine ossidasi MAO (Parini et al., 1996), con forti evidenze circa la modulazione di tali enzimi mediante l'interazione con il loro sito regolatorio (Carpéné et al., 1995). Un esempio è riportato da Qiu e Zheng, che hanno valutato l'agmatina, un ligando putativo del recettore imidazolinico I<sub>2</sub>, come farmaco neuroprotettore della neurotossicità indotta da fenomeni di ischemia-ipoossia, e di danno da glutammato. Il meccanismo attraverso cui tale farmaco è in grado di compiere la sua funzione è l'attivazione dei recettori I<sub>2</sub> che consente l'aumento di espressione della proteina fibrillare acida (GFAP) negli astrociti, l'inibizione dell'attività di MAO, e la riduzione della quantità di calcio nelle cellule (Qiu and Zheng, 2006). Altri studi hanno dimostrato inoltre, l'espressione di MAO su neuroni sensoriali di piccolo diametro (Raddatz et al., 1995). Studi recenti, condotti da Dina e dai suoi collaboratori (Dina et al., 2008) hanno dimostrato il possibile contributo dei metaboliti delle catecolamine nello sviluppo della neuropatia periferica dolorosa. I neuroni afferenti primari nocicettivi sono infatti in possesso degli enzimi necessari per il metabolismo delle catecolamine. La presenza dei metaboliti nei neuroni sensoriali, determina una disfunzione neuronale probabilmente coinvolta nell'insorgenza del dolore neuropatico (Dina et al., 2008). Tale meccanismo è presente anche nel sistema nervoso centrale, dove l'accumulo di metaboliti delle catecolamine provoca la morte di neuroni catecolaminergici nel cervello, causa di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer e il Parkinson (Rommelfanger and Weinshenker, 2007). Dal momento che è stato dimostrato che MAO-A risulta espresso nei mitocondri (Vega et al., 1991; Student and Edwards, 1977), è possibile che i metaboliti di MAO-A siano in grado di indurre la neuropatia periferica mediante l'attivazione di pathway che conducono ad un danno mitocondriale (Westlund et al., 1993; Leininger et al., 2006; Baloh, 2008). A questo proposito uno studio rilevante risulta quello svolto da Cavaletti e colleghi, in cui sono stati descritti fenomeni di alterazione del reticolo endoplasmatico nei mitocondri delle cellule di Schwann, nel nervo periferico, e nelle cellule satelliti di DRG di animali trattati con bortezomib (Cavaletti et al., 2007).

A livello del sistema nervoso centrale, il meccanismo d'azione di inibizione di MAO genera un aumento della quantità di catecolamine a livello sinaptico; inoltre i ligandi dei recettori I<sub>2</sub> hanno mostrato un efficace passaggio della barriera ematoencefalica, legando con una potente affinità i siti I<sub>2</sub> a livello centrale (Lalies et al., 1999). Questi eventi potrebbe quindi facilitare l'inibizione del pathway del dolore, nel trattamento delle sue forme croniche e neuropatiche.

Grazie allo sforzo nella ricerca di farmaci analgesici da parte delle industrie farmaceutiche, si è cominciato a caratterizzare composti analgesici capaci di bloccare le sensazioni di dolore, senza intaccare le condizioni fisiologiche. Un esempio è dato proprio dallo studio di un analgesico sperimentale, il CR4056, sintetizzato dall'azienda farmaceutica Rottapharm. CR4056 è un nuovo ligando dei recettori imidazolinici che ha dimostrato una potente efficacia analgesica in diversi modelli animali di dolore tra cui quello infiammatorio, nocicettivo, e neuropatico. Inoltre, dati ottenuti *in vitro* hanno escluso ogni eventuale interazione diretta del CR4056 con i recettori per gli oppioidi, e con il pathway dei recettori cannabinoidi (Ferrari et al., 2011). Grazie quindi ad una collaborazione scientifica con l'azienda Rottapharm, è stato possibile sperimentare il CR4056 in un modello di dolore neuropatico da bortezomib, fornendo un ulteriore valore per la sua approvazione in fase clinica.

Bortezomib è un inibitore reversibile dell'attività chimotripsinica del proteasoma, in grado di inibire la proliferazione cellulare, indurre l'apoptosi delle cellule di mieloma multiplo (MM), down regolazione del signaling del fattore nucleare NFκB, e l'induzione intrinseca ed estrinseca di pathways di morte cellulare (Hideshima et al., 2001; Roccaro et al., 2006). Bortezomib è in grado di indurre il 35% di risposta positiva in pazienti affetti da mieloma refrattario e recidivo quando viene utilizzato come singolo agente (Richardson et al., 2003), risultando efficace anche quando utilizzato in associazione ad altri chemioterapici come la talidomide.

L'utilizzo di modelli animali ha fino ad ora permesso di riprodurre più o meno efficacemente la sintomatologia associata al trattamento con bortezomib, al fine di approfondire e ampliare le conoscenze circa i meccanismi di dolore e di tossicità periferica. Tra i vari modelli presenti in letteratura, ritroviamo il primo modello di 4 settimane di trattamento con bortezomib effettuato in ratti Wistar, che è stato in grado di evidenziare alcune caratteristiche patologiche quali la demielinizzazione e alterazione nei DRG degli animali trattati, ma non abbastanza severe da riprodurre la sintomatologia clinica (Cavaletti et al., 2007). Si è passati quindi allo

studio di un successivo modello sempre in ratti Wistar, in cui è stata mantenuta la stessa frequenza e dose di trattamento con bortezomib (0.20 mg/kg 3 volte a settimana) ma dove sono stati prolungati i tempi di trattamento a 8 settimane. In questo caso è stato possibile evidenziare alterazioni patologiche più rilevanti quali una degenerazione assonale, oltre alla valutazione della presenza di dolore neuropatico associato alla neuropatia periferica (Meregalli et al., 2010).

Nel progetto oggetto di questa tesi è stata valutata in vivo l'efficacia analgesica terapeutica e preventiva di CR4056 nel dolore indotto da 8 settimane di trattamento con bortezomib. Il protocollo sperimentale ha previsto una prima fase composta da due esperimenti (esperimento 1 e 2) volti all'individualizzazione della dose minima efficace (0,6 mg/kg) e di quella ottimale al fine di mantenere un'azione anti-allodinica per tutta la durata degli esperimenti (6 mg/kg). Una volta individuato tale dosaggio, è stato possibile sviluppare un terzo esperimento volto alla valutazione dell'attività analgesica del CR4056 sia in un *protocollo curativo*, quindi somministrato in seguito a trattamento con bortezomib, sia in un *protocollo preventivo* e quindi dato in associazione dall'inizio del trattamento con il chemioterapico.

Gli animali co-trattati con bortezomib e CR4056 hanno mostrato una buona condizione di salute per l'intero periodo di trattamento a tutti i tempi di somministrazione diversi tra i vari esperimenti, come è stato osservato da un andamento fisiologico del peso corporeo durante il periodo di trattamento.

L'analisi elettrofisiologica effettuata al termine delle Fasi I di tutti gli esperimenti, ha mostrato una significativa riduzione della velocità di conduzione nervosa rispetto agli animali controllo, dimostrando l'insorgenza della neuropatia periferica. Tale alterazione risulta presente negli animali trattati con bortezomib anche dopo tre settimane di recovery. Questo dato risulta in linea con il precedente lavoro di caratterizzazione del modello in cui la neuropatia recuperava solo parzialmente al termine di quattro settimane di recovery (Meregalli et al., 2010). Il composto CR4056, come anche la buprenorfina e la gabapentina, non mostra alcuna capacità di migliorare i segni legati alla neurotossicità periferica indotta del chemioterapico (come indicato dalle velocità di conduzione nervosa).

Attraverso l'indagine morfologica è stata osservata una degenerazione assonale del nervo sciatico e una lieve azione tossica del bortezomib a carico dei DRG, evidenziando una sofferenza delle cellule satelliti di supporto al neurone sensoriale come già precedentemente dimostrato da Meregalli e colleghi (Meregalli et al., 2010). Il dato ottenuto è risultato invece in disaccordo con il modello di tossicità più breve, in cui è stata osservata una rilevante

vacuolizzazione citoplasmatica delle cellule satelliti e un danneggiamento sia delle fibre mieliniche che mieliniche del nervo sciatico (Cavaletti et al., 2007). Per spiegare tale differenza è stato ipotizzato un meccanismo compensatorio dell'attività del proteasoma in risposta all'inibizione prolungata dello stesso. I dati di farmacodinamica ottenuti nello studio potrebbero avallare questa ipotesi, in quanto una bassa inibizione del proteasoma nei DRG verificato al termine delle 8 settimane di trattamento, potrebbe determinare una morfologia migliore dei DRG stessi. Alcune valutazioni dei meccanismi responsabili della neurotossicità periferica da bortezomib sono stati di recente eseguite da Casafont e colleghi, che ha dimostrato la capacità di bortezomib di indurre importanti alterazioni a livello nucleare nei neuroni dei DRG, quali un accumulo di proteine ubiquitinate, una riduzione dell'attività di trascrizione e l'addensamento di poly(A) RNAs in granuli nucleari (Casafont et al., 2010). La capacità di bortezomib di indurre alterazioni morfologiche a carico dei DRG è stata confermata anche da Carozzi et al. e da Bruna et al., in topi trattati con bortezomib (Carozzi et al., 2010, Bruna et al., 2010). Quindi le differenze tra i modelli utilizzati potrebbero essere una diretta conseguenza dell'utilizzo di differenti regimi di trattamento (acuto e cronico) e di differenti specie.

In accordo con Meregalli e Cavaletti (Meregalli et al., 2010; Cavaletti et al., 2007), in questo studio non è stata osservata l'iperalgia termica negli animali trattati con bortezomib, e quindi non è stato possibile verificare un'eventuale azione da parte del CR4056 su questo parametro. L'assenza di alterazioni nella sensibilità termica è stata riscontrata anche da Bruna e colleghi in un modello murino di dolore neuropatico indotto da bortezomib. Tali risultati appaiono però in contrasto con quanto riportato da alcuni pazienti durante il trattamento con bortezomib (Cata et al., 2007); probabilmente le differenze nel dosaggio e nei tempi di somministrazione di bortezomib negli animali potrebbero spiegare anche in questo caso le differenze riscontrate.

Nel corso degli esperimenti 1 e 2 è stata individuata la dose minima efficace del farmaco (0.6 mg/kg), mentre le dosi di 20 e 60 mg/kg hanno mostrato fenomeni di tolleranza. La valutazione dell'attività preventiva di CR4056 è stata eseguita con la dose efficace di 6 mg/kg. Il CR4056 è stato in grado di revertire l'allodinia sviluppata in seguito del trattamento con bortezomib, ma anche di evitare lo sviluppo di dolore neuropatico se co-somministrato al chemioterapico a partire dall'inizio del trattamento. I gold standard buprenorfina e gabapentina, somministrate nei ratti alla dose equivalente a quelle di uso clinico, hanno mostrato un effetto analgesico solo per pochi giorni dopo la somministrazione. La loro capacità analgesica non deve comunque essere sottovalutata, in quanto già validata in altri

modelli di dolore, come modelli di neuropatia diabetica dolorosa (Canta et al., 2009b) o di dolore post-operatorio (Flatters, 2010). Probabilmente la diversa origine del dolore neuropatico, può determinare la sensibilità all'azione di gabapentina e buprenorfina.

Parallelamente allo studio *in vivo* dell'azione analgesica di CR4056 nei confronti del dolore neuropatico, sono stati condotti alcuni esperimenti *in vitro* al fine di studiare l'interazione tra bortezomib e CR4056.

Il primo modello *in vitro* necessario per escludere un'eventuale citotossicità del CR4056 a carico dei DRG, è stato messo a punto somministrando dosi crescenti di farmaco (10-30  $\mu$ M) a colture organotipiche di DRG estratti da embrioni di ratti Sprague-Dawley al 15° giorno di età. Come atteso, tutte le dosi utilizzate non hanno mostrato alcuna azione citotossica a carico del neurite, né dopo 24h né dopo 48h dal trattamento. Una volta appurato questo primo dato preliminare è stato possibile identificare per ogni linea tumorale scelta, l'IC<sub>50</sub> del bortezomib e procedere con l'analisi di non interferenza tra CR4056 e l'attività chemioterapica di bortezomib. Nel range di concentrazioni testate per il CR4056 fornite dal gruppo di lavoro della ditta Rottapharm, in accordo con degli studi condotti su linee di astrocitoma umano e di neuroblastoma (dati confidenziali non presentati), è stato possibile verificare la non interferenza tra CR4056 e bortezomib nello studio combinato tra i due composti.

Nonostante siano oggetto di attenzione di molti gruppi di ricerca, i meccanismi molecolari responsabili della neuropatia periferica da chemioterapico non sono ancora stati ben caratterizzati. In questo lavoro abbiamo studiato la relazione tra la neurotossicità di bortezomib e l'inibizione del proteasoma. Lo studio ha previsto il prelievo di PBMC (cellule mononucleate del sangue periferico) dagli animali controllo e trattati 1, 24 e 48 h dopo la somministrazione di bortezomib (tempi scelti in base a studi di farmacodinamica dell'attività del proteasoma nell'uomo) dopo singola somministrazione (trattamento acuto) oppure 6 e 8 settimane di trattamento con bortezomib (somministrazioni cronica). Il prelievo del nervo sciatico, DRG e cervello è stato effettuato 1 h dopo l'ultima somministrazione delle 8 settimane di bortezomib.

Gli studi di farmacodinamica effettuati per valutare la capacità inibitoria del proteasoma in seguito a trattamento con bortezomib hanno dimostrato nei PBMC una fase reversibile di recupero dell'attività del proteasoma già dopo 24 h dalla somministrazione, in linea con quanto visto in studi in modelli animali precedenti (Adams et al., 1999). Infatti, è stato dimostrato che l'attività del proteasoma viene recuperata nel giro di 48-72h dalla

somministrazione di bortezomib (Adams and Kauffman, 2004). Il profilo farmacodinamico del trattamento acuto dopo la singola somministrazione di bortezomib, risulta in linea con un recente studio effettuato in clinica dal gruppo di Reece e collaboratori, in cui è stata caratterizzato la farmacocinetica e farmacodinamica di bortezomib in pazienti con mieloma multiplo refrattario (Reece et al., 2011). In tale studio viene riproposto lo stesso andamento cinetico di ripresa dell'attività del proteasoma, indicando un'iniziale inibizione di circa l'80% dopo 1 h dopo la somministrazione, che recupera fino al 30% dopo 24 e 48 h, mantenendo una condizione di stabilità (Reece et al., 2011). Questa prima fase *in acuto* è quindi in grado di confermare la reversibilità dell'inibizione del proteasoma associata a trattamento con bortezomib, e di comprovare il protocollo attualmente utilizzato in clinica, in cui è previsto un periodo di sospensione maggiore di 72h tra una somministrazione e la successiva, così da permettere il normale recupero fisiologico dell'attività del proteasoma (Adams and Kauffman, 2004). Le analisi effettuate al termine delle 8 settimane di trattamento con bortezomib, quindi in *fase cronica*, hanno mostrato una costante inibizione dell'attività del proteasoma, che resta elevata anche fino le 48h dopo l'ultima somministrazione. La prolungata inibizione del proteasoma mostrata in seguito al trattamento cronico con bortezomib, potrebbe essere la conseguenza di un effetto cumulativo del farmaco, in grado di provocare un'incapacità dei PBMC a sintetizzare *de novo* la subunità del proteasoma. Questa condizione potrebbe in parte spiegare la trombocitopenia riscontrata nei pazienti (Lonial et al., 2005). L'analisi di inibizione del proteasoma nel nervo sciatico ha dimostrato una elevata inibizione del proteasoma in seguito a trattamento cronico con bortezomib, potenzialmente responsabile in parte della degenerazione assonale presente negli animali trattati. Inoltre, è stata riscontrata una bassissima inibizione dell'attività del proteasoma nel cervello, giustificata dall'incapacità di bortezomib di oltrepassare la barriera ematoencefalica (Adams et al., 1999)

Studi condotti da Csizmadia e collaboratori hanno dimostrato che farmaci inibitori del proteasoma determinano alterazioni funzionali e strutturali delle cellule neuronali a carico del citoscheletro, delle risposte allo stress e della sintesi e degradazione proteica. Probabilmente anche alcuni di questi meccanismi potrebbero spiegare l'azione neurotossica sul SNP (Csizmadia et al., 2008).

A seguito di queste considerazioni, abbiamo studiato l'azione di bortezomib sulla stabilizzazione dei microtubuli valutata nel nervo sciatico, poiché inibendo il proteasoma, si potrebbe osservare una differente degradazione delle proteine associate ai microtubuli.

Per verificare l'effetto della somministrazione cronica di bortezomib a livello molecolare, è stato effettuato un primo esperimento qualitativo volto allo studio della possibile implicazione della polimerizzazione della tubulina nella neuropatia periferica da bortezomib.

L'analisi ha previsto una comparazione della polimerizzazione indotta da bortezomib con altri due farmaci noti per il loro meccanismo d'azione di neurotossicità a carico dei microtubuli, quali il paclitaxel ed epotilone-B. Una volta verificata la presenza di un evidente grado di stabilizzazione dei microtubuli negli animali trattati con bortezomib, si è resa necessaria la messa a punto di una metodica di quantizzazione della percentuale di polimerizzazione al fine di valutare quantitativamente la differenza tra animale controllo e trattato. I nostri risultati mostrano un chiaro elemento di stabilizzazione dei microtubuli, indicato da un incremento del 30 % della percentuale di polimerizzazione della tubulina acetilata negli animali trattati con bortezomib rispetto agli animali controllo.

Studi *in vitro* hanno mostrato come la capacità di bortezomib di polimerizzare e stabilizzare i microtubuli in cellule di mieloma e cellule neurali, possa rivelarsi un importante fattore nello sviluppo della neuropatia periferica indotta da bortezomib (Poruchynsky et al., 2008). La stabilizzazione dei microtubuli indotta da bortezomib impedisce la normale dinamicità necessaria alla formazione e composizione degli aggresomi di proteine cellulari danneggiate, che si dovrebbero originare in seguito all'inibizione del proteasoma (Johnston et al., 1998). In questo studio è stato inoltre verificato come il grado di polimerizzazione risulti inferiore rispetto ad altri chemioterapici noti per il loro principale meccanismo d'azione a carico dei microtubuli, motivando la reversibilità della neurotossicità una volta sospeso il trattamento (Cavaletti et al., 2007; Meregalli et al., 2010). Come già dimostrato per altri chemioterapici come taxani ed epotiloni (Canta et al., 2009b) è quindi possibile ipotizzare che il meccanismo di stabilizzazione dei microtubuli risulti implicato nello sviluppo della neuropatia periferica (Chiorazzi et al., 2009).

Tuttavia a differenza dei taxani, bortezomib non agisce direttamente sulla struttura dei microtubuli che appaiono intatti, ma si ipotizza una sua azione a carico dei livelli delle proteine associate ai microtubuli, dando luogo ad un effetto più velocemente reversibile. Questa spiegazione è coerente con quanto osservato in clinica, in cui pazienti trattati con bortezomib recuperano più facilmente rispetto a quelli in cura con i taxani (Richardson et al., 2006). Anche i dati del nostro esperimento circa la presenza di una trombocitopenia nella maggior parte degli animali trattati con bortezomib potrebbero essere ricondotta alla

stabilizzazione dei microtubuli, come già precedentemente suggerito nel lavoro di Poruchynsky e collaboratori (Poruchynsky et al., 2008).

Dallo studio appena citato, si evince inoltre che solo bortezomib, tra gli inibitori del proteasoma testati presenta un effetto di stabilizzatori dei microtubuli, dimostrando come non vi sia una diretta correlazione consequenziale tra l'inibizione del proteasoma e la polimerizzazione dei microtubuli.

Risulta chiaro, quindi, che la neurotossicità indotta da bortezomib si origina da una serie di meccanismi d'azione temporalmente presenti nei soggetto trattati, ma che necessitano di ulteriori studi per una migliore definizione di un'eventuale correlazione tra loro.

In conclusione questo lavoro ha permesso di:

1) Individuare:

- ✓ la minima dose efficace di CR4056 a 0,6 mg/kg
- ✓ la dose ottimale di efficacia CR4056 a 6 mg/kg per revertire e inibire l'insorgenza di allodinia in seguito a trattamento con bortezomib, senza indurre tolleranza.

2) verificare mediante esperimenti *in vitro* la non interferenza del CR4056 con l'attività antineoplastica di bortezomib

3) riprodurre *in vivo* la percentuale d'inibizione del proteasoma (circa dell'80%) simile a quella osservata in clinica (De Coster R., in seguito ad osservazioni personali).

4) verificare la stabilizzazione dei microtubuli indotta da un trattamento cronico con bortezomib

Tali risultati appaiono importanti non solo per la riuscita nell' individualizzazione di una dose efficace di CR4056, ma fornisce un ulteriore conferma preclinica preziosa per il proseguimento dello sviluppo del farmaco. La rilevanza di questo studio consiste nella dimostrazione che il CR4056 potrebbe, una volta utilizzato in clinica, consentire un miglioramento della condizione dolorosa se somministrato successivamente al trattamento con bortezomib, o ancor meglio agire impedendo lo sviluppo della sintomatologia dolorosa se somministrato in co-trattamento con il chemioterapico dall'inizio della cura. Per il momento, ed in linea del tutto teorica, l'aver caratterizzato il composto CR4056 anche sotto l'aspetto preventivo potrebbe un giorno, basandosi su studi di farmacogenomica, essere somministrato a pazienti affetti da mieloma multiplo con un genotipo maggiormente predisposto allo sviluppo di dolore neuropatico associato all'utilizzo di bortezomib. Tuttavia, l'utilizzo di

analgesici potrebbe mascherare dei sintomi indice di una neuropatia periferica e rischiare di sottovalutare la sua severità e irreversibilità.

Attualmente in letteratura sono presenti pochi studi volti alla caratterizzazione dei fattori di rischio associati allo sviluppo di una severa neuropatia periferica indotta da bortezomib. Tra i più noti ritroviamo l'effetto dose cumulativo del farmaco, eventuali neuropatie pre-esistenti al momento dell'inizio del trattamento con bortezomib, e fattori genetici. Nel 2010 il gruppo di studio di Corso e colleghi (Corso et. al., 2010) ha effettuato uno studio clinico su pazienti affetti da mieloma, paragonando pazienti trattati in prima linea con bortezomib, e pazienti in ricaduta o progressione della malattia. In questo caso è stato verificato che l'aumento d'età risulta essere un fattore di rischio legato all'insorgenza della neuropatia, ma la differenza maggiore consiste nell'incidenza della comparsa di dolore neuropatico. Infatti è stato dimostrato che il dolore neuropatico si presenta con una minore incidenza e breve durata nei pazienti trattati in prima linea con bortezomib (Cavaletti and Nobile-Orazio, 2007).

Recentemente si stanno sviluppando studi di farmacogenetica volti alla caratterizzazione del dolore neuropatico indotto da bortezomib (Broyl et al., 2010). Tali risultati potrebbero però presentare delle lacune circa l'utilizzo di adeguati e specifici metodi necessari per definire il dolore neuropatico, con un iter difficoltoso nella comparazione dell'espressione genica delle popolazioni a confronto.

Studi futuri verteranno sullo sviluppo di un modello in topo su cui testare contemporaneamente lo sviluppo del dolore neuropatico, l'attività analgesica di CR4056 e la non interferenza dell'analgesico con l'attività antineoplastica di bortezomib. La necessità di utilizzare un modello murino è supportata dalla maggiore disponibilità e capacità delle linee tumorali di attecchire nel topo; a differenza del modello in ratto in cui è nota la difficoltà di impianto del tumore e di cui poche sono le linee tumorali conosciute.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* 1999 Jun 1;59(11):2615-22.
- Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev.* 2003 May;29 Suppl 1:3-9. Review.
- Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest.* 2004 22(2):304-11. Review.
- Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S, Canales C, Daud A, Spriggs DR. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res.* 2002 Aug;8(8):2505-11.
- Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience.* 2002 111(2):389-97.
- Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* 2002 Apr;16(4):433-43.
- Backonja M, Glanzman RL. Gabapentin dosing for neuropathic pain: evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials. *Clin Ther.* 2003 Jan;25(1):81-104. Review.
- Baloh RH Mitochondrial dynamics and peripheral neuropathy. *Neuroscientist.* 2008 14: 12-18
- Bannister K, Bee LA, Dickenson AH. Preclinical and early clinical investigations related to monoaminergic pain modulation. *Neurotherapeutics.* 2009 Oct;6(4):703-12.
- Basu A., Haldar S. Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein. *Int. J. Oncol.*, 1998 13(4):659-664.
- Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int.* 2005 Jun 1;5(1):18.

- Broyl A, Corthals SL, et al. Mechanisms of peripheral neuropathy associated with bortezomib and vincristine in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a prospective analysis of data from the HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Lancet Oncol.* 2010 Nov;11(11):1057-65.
- Bruna J, Udina E, Alé A, Vilches JJ, Vynckier A, Monbaliu J, Silverman L, Navarro X. Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice. *Exp Neurol.* 2010 Jun;223(2):599-608.
- Canta A, Chiorazzi A, Meregalli C, Carozzi V, Oggioni N, Lauria G, Lombardi R, Bianchi R, Porretta-Serapiglia C, Cavaletti G. Continuous buprenorphine delivery effect in streptozotocine-induced painful diabetic neuropathy in rats. *J Pain.* 2009a Sep;10(9):961-8.
- Canta A, Chiorazzi A, Cavaletti G. Tubulin: a target for antineoplastic drugs into the cancer cells but also in the peripheral nervous system. *Curr Med Chem.* 2009b 16(11):1315-24. Review.
- Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, Sala B, Chiorazzi A, Meregalli C, Bossi M, Marmioli P, Cavaletti G. Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies. *Exp Neurol.* 2010 Dec;226(2):301-9.
- Carpéné C, Collon P, Remaury A, Cordi A, Hudson A, Nutt D, Lafontan M. Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I2 sites. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Feb;272(2):681-8
- Casafont I, Berciano MT, Lafarga M. Bortezomib induces the formation of nuclear poly(A) RNA granules enriched in Sam68 and PABPN1 in sensory ganglia neurons. *Neurotox Res.* 2010 Feb;17(2):167-78.
- Cata JP, Weng HR, Lee BN, Reuben JM, Dougherty PM Clinical and experimental finding in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Minerva Anesthesiol* 2006 72: 151-169
- Cata JP, Weng HR, Burton AW, Villareal H, Giralt S, Dougherty PM Quantitative sensory findings in patients with bortezomib-induced pain. *J Pain.* 2007 Apr;8(4):296-306.
- Cavaletti G, Bogliun G, Marzorati L, Zincone A, Piatti M, Colombo N, Parma G, Lissoni A, Fei F, Cundari S, Zanna C. Grading of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity using the Total Neuropathy Scale. *Neurology.* 2003 Nov 11;61(9):1297-300.

- Cavaletti G, Gilardini A, Canta A, Rigamonti L, Rodriguez-Menendez V, Ceresa C, Marmioli P, Bossi M, Oggioni N, D'Incalci M, De Coster R. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat. *Exp Neurol*. 2007 Mar;204(1):317-25.
- Cavaletti G, Nobile-Orazio E. Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: still far from a painless gain. *Haematologica*. 2007 Oct;92(10):1308-10.
- Cavo M. Proteasome inhibitor bortezomib for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Aug;20(8):1341-52. Review.
- Chance P.F., Reilly M.: Inherited neuropathies. *Current Opinion in Neurology* 1994 7, 5, 372-380,
- Chauhan D, Anderson KC. Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): Therapeutic implications. *Apoptosis*. 2003 Aug;8(4):337-43. Review.
- Chauhan D, Singh AV, Aujay M, Kirk CJ, Bandi M, Ciccarelli B, Raje N, Richardson P, Anderson KC. A novel orally active proteasome inhibitor ONX 0912 triggers in vitro and in vivo cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):4906-15.
- Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, P Dou Q. *Curr Cancer Drug Targets*. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. 2011 Mar;11(3):239-53.
- Chiorazzi A, Nicolini G, et al. Experimental epothilone B neurotoxicity: results of in vitro and in vivo studies. *Neurobiol Dis*. 2009 Aug;35(2):270-7.
- Corso A, Mangiacavalli S, Varettoni M, Pascutto C, Zappasodi P, Lazzarino M. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comparison between previously treated and untreated patients. *Leuk Res*. 2010 Apr;34(4):471-4.
- Csizmadia V, Raczynski A, Csizmadia E, Fedyk ER, Rottman J, Alden CL. Effect of an experimental proteasome inhibitor on the cytoskeleton, cytosolic protein turnover, and induction in the neuronal cells in vitro. *Neurotoxicology*. 2008 Mar;29(2):232-43.
- Devor M. Ectopic discharge in Abeta afferents as a source of neuropathic pain. *Exp Brain Res*. 2009 Jun;196(1):115-28. Review.
- Dina OA, Khasar SG, Alessandri-Haber N, Bogen O, Chen X, Green PG, Reichling DB, Messing RO, Levine JD. Neurotoxic catecholamine metabolite in nociceptors contributes to painful peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci*. 2008 Sep;28(6):1180-90. Partial retraction in: *Eur J Neurosci*. 2009 Dec 3;30(11):2235.

- Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NG et al. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. *Trends Pharmacol Sci.* 1998 19: 381-390.
- Ferrari F, Fiorentino S, Mennuni L, Garofalo P, Letari O, Mandelli S, Giordani A, Lanza M, Caselli G. Analgesic efficacy of CR4056, a novel imidazoline-2 receptor ligand, in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pain Res.* 2011 4:111-25
- Fisher RI, Bernstein SH, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 20;24(30):4867-74.
- Flatters SJ. Effect of analgesic standards on persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR). *Neurosci Lett.* 2010 Jun 14;477(1):43-7.
- Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2004 Nov;24(22):9695-704
- Fuchs D, Berges C, Opelz G, Daniel V, Naujokat C. Increased expression and altered subunit composition of proteasomes induced by continuous proteasome inhibition establish apoptosis resistance and hyperproliferation of Burkitt lymphoma cells. *J Cell Biochem.* 2008 Jan 1;103(1):270-83.
- García-Sevilla JA, Escribá PV, Walzer C, Bouras C, Guimón J. Imidazoline receptor proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 1998 May 15;247(2-3):95-8.
- Gentili F, Cardinaletti C, Carrieri A, Ghelfi F, Mattioli L, Perfumi M, Vesprini C, Pignini M. Involvement of I2-imidazoline binding sites in positive and negative morphine analgesia modulatory effects. *Eur J Pharmacol.* 2006 Dec 28;553(1-3):73-81.
- Haldar S, Jena N, Croce CM. Inactivation of Bcl-2 by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4507-11.
- Head G.A., Mayrov D.N. Imidazoline Receptors, Novel Agents and Therapeutic Potential Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 2006 4: 17-32.
- Henson R.A., Urich H.: Cancer and the nervous system:the neurological manifestations of systemic malignant disease. Blackwell Scientific, London, 1982

- Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 2001 Apr 1;61(7):3071-6
- Jagannath S, Barlogie B, et al. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *Br J Haematol.* 2004 Oct;127(2):165-72.
- Jasmin L, Tien D, Janni G, Ohara PT. Is noradrenaline a significant factor in the analgesic effect of antidepressants? *Pain.* 2003 Nov;106(1-2):3-8. Review.
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998 Dec 28;143(7):1883-98
- Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 2004 4:253-265.
- Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *Oncologist.* 2003 8(6):508-13. Review.
- Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, Pazdur R Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5291-4.
- Kennedy B, Gargoum F, Bystricky B, Curran DR, O'Connor TM Novel agents in the management of lung cancer. *Curr Med Chem.* 2010 17: 4291-325
- Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001 Aug;8(8):739-58. Review.
- Kropff M, Bisping G, Wenning D, Berdel WE, Kienast J. Proteasome inhibition in multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006 Jul;42(11):1623-39.Review
- Kumar SK, Flinn I, et al. Bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide and lenalidomide combination for newly diagnosed multiple myeloma: phase 1 results from the multicenter evolution study. *Leukemia.* 2010 Jul;24(7):1350-6
- Kusunose N, Koyanagi S, Hamamura K, Matsunaga N, Yoshida M, Uchida T, Tsuda M, Inoue K, Ohdo S. Molecular basis for the dosing time-dependency of anti-allodynic effects of gabapentin in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain.* 2010 Nov 26;6:83.
- Kuwabara S. Guillain-Barré syndrome: epidemiology, pathophysiology and management. *Drugs.* 2004 64(6):597-610. Review.

- Lalies MD, Hibell A, Hudson AL, Nutt DJ. Inhibition of central monoamine oxidase by imidazoline<sub>2</sub> site-selective ligands. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 21;881:114-7.
- Leininger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL 2006 Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006 2: 620-628.
- Lenz H-J Clinical update: proteasome inhibitors in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 2003 29: 41-48.
- Li B, Dou QP. Bax degradation by the ubiquitin/proteasome-dependent pathway: involvement in tumor survival and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 11;97(8):3850-5.
- Li JX, Zhang Y Imidazoline I<sub>2</sub> receptors: target for new analgesics? *Eur J Pharmacol.*, 2011 658: 49-56.
- Lione LA, Nutt DJ, Hudson AL. Characterisation and localisation of [<sup>3</sup>H]2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline binding in rat brain: a selective ligand for imidazoline I<sub>2</sub> receptors. *Eur J Pharmacol.* 1998 Jul 17;353(1):123-35.
- Lonial S, Waller EK, et al. SUMMIT/CREST Investigators. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood.* 2005 Dec 1;106(12):3777-84.
- Manfredi J.J., Horwitz S.B. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmac. Ther.*, 1984 25:83-125.
- McDonald ES, Windebank AJ. Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling. *Neurobiol Dis.* 2002 Mar;9(2):220-33.
- McQuay HJ, Tramèr M, Nye BA, Carroll D, Wiffen PJ, Moore RA. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain.* 1996 Dec;68(2-3):217-27.
- Meregalli C, Canta A, Carozzi VA, Chiorazzi A, Oggioni N, Gilardini A, Ceresa C, Avezza F, Crippa L, Marmiroli P, Cavaletti G Bortezomib-induced painful neuropathy in rats: a behavioral, neurophysiological and pathological study in rats. *Eur J Pain.* 2010 Apr;14(4):343-50.
- Mitsiades N, Mitsiades CS, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 29;99(22):14374-9.

- Mitsiades N, Mitsiades CS, et al. The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood*. 2003 Mar 15;101(6):2377-80.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood*. 2006 Feb 1;107(3):1092-100.
- Monforte R, Estruch R, Valls-Solé J, Nicolás J, Villalta J, Urbano-Marquez A. Autonomic and peripheral neuropathies in patients with chronic alcoholism. A dose-related toxic effect of alcohol. *Arch Neurol*. 1995 Jan;52(1):45-51.
- Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, Ware MA, Watson CP, et al. A. Pharmacological management of chronic neuropathic pain - consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Canadian Pain Society. Pain Res Manag*. 2007 12: 13-21.
- Nawrocki ST, Carew JS, Dunner K Jr, Boise LH, Chiao PJ, Huang P, Abbruzzese JL, McConkey DJ. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 15;65(24):11510-9.
- Ojima I, Chakravarty S, Inoue T, Lin S, He L, Horwitz SB, Kuduk SD, Danishefsky SJ. A common pharmacophore for cytotoxic natural products that stabilize microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 13;96(8):4256-61.
- Orłowski RZ, Stinchcombe TE, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol*. 2002 Nov 15;20(22):4420-7.
- Palumbo A, Bringhen S et al., Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: a randomized controlled trial. *J Clin Oncol*. 2010 Dec 1;28(34):5101-9.
- Parini A, Moudanos CG, Pizzinat N, Lanier SM. The elusive family of imidazoline binding sites. *Trends Pharmacol Sci*. 1996 Jan;17(1):13-6. Review
- Pei XY, Dai Y, Grant S. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 1;10(11):3839-52.
- Pekol T, Daniels JS, Labutti J, Parsons I, Nix D, Baronas E, Hsieh F, Gan LS, Miwa G. Human metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib: identification of circulating metabolites. *Drug Metab Dispos*. 2005 Jun;33(6):771-7.

- Piletz JE, Zhu H, Ordway G, Stockmeier C, Dilly G, Reis D, Halaris A. Imidazoline receptor proteins are decreased in the hippocampus of individuals with major depression. *Biol Psychiatry*. 2000 Nov 1;48(9):910-9
- Polomano RC, Bennett GJ. Chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathy. *Pain Med*. 2001 Mar;2(1):8-14.
- Poruchynsky MS, Sackett DL, Robey RW, Ward Y, Annunziata C, Fojo T. Proteasome inhibitors increase tubulin polymerization and stabilization in tissue culture cells: a possible mechanism contributing to peripheral neuropathy and cellular toxicity following proteasome inhibition. *Cell Cycle*. 2008 Apr 1;7(7):940-9.
- Priest BT, Kaczorowski GJ. Blocking sodium channels to treat neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Mar;11(3):291-306. Review.
- Qiu WW, Zheng RY. Neuroprotective effects of receptor imidazoline 2 and its endogenous ligand agmatine. *Neurosci Bull*. 2006 May;22(3):187-91.
- Raddatz R, Parini A, Lanier SM. Imidazoline/guanidinium binding domains on monoamine oxidases. Relationship to subtypes of imidazoline-binding proteins and tissue-specific interaction of imidazoline ligands with monoamine oxidase B. *J Biol Chem*. 1995 Nov 17;270(46):27961-8.
- Raddatz R, Savic SL, Bakthavachalam V, Lesnick J, Jasper JR, McGrath CR, Parini A, Lanier SM. Imidazoline-binding domains on monoamine oxidase B and subpopulations of enzyme. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Mar;292(3):1135-45
- Reece DE, Sullivan D, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of two doses of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Jan;67(1):57-67.
- Reichling DB, Levine JD. Critical role of nociceptor plasticity in chronic pain. *Trends Neurosci*. 2009 Dec;32(12):611-8.
- Richardson PG, Barlogie B, et al., A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med*. 2003 Jun 26;348(26):2609-17.
- Richardson PG, Sonneveld P, et al.; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005 Jun 16;352(24):2487-98.
- Richardson PG, Briemberg H, et al. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3113-20.

- Richardson PG, Weller E, et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2010 Aug 5;116(5):679-86.
- Roccaro AM, Hideshima T, Richardson PG, Russo D, Ribatti D, Vacca A, Dammacco F, Anderson KC. Bortezomib as an antitumor agent. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006 Dec;7(6):441-8. Review.
- Rommelfanger KS, Weinshenker D. Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*. 2007 Jul 15;74(2):177-90 Review.
- Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. Immunocytochemical localization of an imidazoline receptor protein in the central nervous system. *Brain Res*. 1998 Jan 12;780(2):270-93.
- Ruschak AM, Slassi M, Kay LE, Schimmer AD. Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Jul 6;103(13):1007-17.
- Saarto T, Wiffen PJ Antidepressants for neuropathic pain: a Cochrane review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010 81: 1372-3.
- San Miguel JF, Schlag R, et al. VISTA Trial Investigators. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):906-17.
- Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*. 2007 Nov;10(11):1361-8. Review.
- Schwartz R, Davidson T. Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology (Williston Park)*. 2004 Dec;18(14 Suppl 11):14-21. Review.
- Scuteri A., Nicolini G., Miloso M., Bossi M., Cavaletti G., Windebank A.J., Tredici G. Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer Res.*, 2006 26(2A):1065-1070.
- Singleton JR. Evaluation and treatment of painful peripheral polyneuropathy. *Semin Neurol*. 2005 Jun;25(2):185-95. Review.
- Student AK, Edwards DJ Subcellular localization of types A and B monoamine oxidase in rat brain. *Biochem Pharmacol*. 1977 26: 2337-2342.
- Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 1999 Sep;5(9):2638-45.
- Tesson F, Parini A Identification of an imidazoline-guanidinium receptive site in mitochondria from rabbit cerebral cortex. *Eur J Pharmacol*. 1991 Sep 12;208(1):81-3.

- Vega JA, Amenta F, Hernandez LC, del Valle ME Presence of catecholamine-related enzymes in a subpopulation of primary sensory neurons in dorsal root ganglia of the rat. *Cell Mol Biol.* 1991 37: 519-530
- Velcade report(Bortezomib) for injection: [www.millenniumcom/products/velcade](http://www.millenniumcom/products/velcade), 2004
- Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B, Orlowski RZ. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2003 Dec 15;9(17):6316-25.
- Wang L.G., Liu X.M., Kreis W., Budman D.R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1999 44:355-361.
- Wang W, Gu J, Li YQ, Tao YX. Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain? *Mol Pain.* 2011 Feb 23;7:16. Review.
- Westlund KN, Krakower TJ, Kwan SW, Abell CW Intracellular distribution of monoamine oxidase A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord. *Brain Res.* 1993 612: 221-230.
- Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci.* 2001 Apr 15;21(8):RC140.

## **PUBBLICAZIONI**

In questi tre anni di dottorato, la collaborazione con la ditta farmaceutica Rottapharm ha portato alla stesura di alcuni lavori inerenti il CR4056, che hanno permesso di far conoscere tale molecola nell'ambito scientifico.

### *Pubblicazioni*

- Ferrari F, Fiorentino S, Mennuni L, Garofano P, Letari O, Mandelli S, Giordani A, Lanza M and Caselli G. "ANALGESIC EFFICACY OF CR4056, A NOVEL IMIDAZOLINE-2 RECEPTOR LIGAND, IN RAT MODELS OF INFLAMMATORY AND NEUROPATHIC PAIN". *J. Pain Res.*, 4:111–125, 2011
- Cristina Meregalli, Cecilia Ceresa, Annalisa Canta, Valentina Alda Carozzi, Alessia Chiorazzi, Barbara Sala, Norberto Oggioni, Marco Lanza, Ornella Letari, Flora Ferrari, Federica Avezza, Paola Marmiroli, Gianfranco Caselli, Guido Cavaletti "CR4056, A NEW ANALGESIC I2 LIGAND, IS HIGHLY EFFECTIVE AGAINST BORTEZOMIB-INDUCED PAINFUL NEUROPATHY IN RATS" *IN REVISIONE*

### *Presentazioni a congressi*

- Ferrari F, Tremolada D, Ugolini G, Lanza M, Caselli G. "EVALUATION OF CR4056, IN COMPARISON WITH GABAPENTIN AND AMITRIPTYLINE, IN A RAT MODEL OF FIBROMYALGIA". Proceedings of the 7th Congress of the European Federation of IASP® Chapters (EFIC®), Hamburg, Germany, 2011
- Lanza M, Ferrari F, Meregalli C, Canta A, Chiorazzi A, Cavaletti G, Caselli G. "ANALGESIC EFFICACY OF THE NOVEL IMIDAZOLINE-2 LIGAND CR4056 IN PRECLINICAL MODELS OF NEUROPATHIC PAIN". Proceedings of the IBRO 8<sup>th</sup> Meeting, Poster Section 10. Pain (Neuropathic Pain), Abstract A0226, Firenze, Italy, 2011
- Meregalli C, Canta A, Carozzi VA, Oggioni N, Chiorazzi A, Lanza M, Letari O, Cavaletti G, Caselli G. "THE NEW ANALGESIC CR4056 EFFECTIVELY ABROGATES NEUROPATHIC PAIN INDUCED BY BORTEZOMIB IN RATS". Proceedings of the AACR 102nd Annual Meeting, Poster Section 28, Abstract 657, AACR 102<sup>nd</sup> Annual Meeting, Orlando, USA, 2011
- Canta A, Meregalli C, Carozzi VA, Oggioni N, Chiorazzi A, Tredici G, Lanza M, Letari O, Caselli G. "BORTEZOMIB-INDUCED NEUROPATHIC PAIN: EVALUATION OF ANTI NOCICEPTIVE EFFECT OF A NEW ANALGESIC COMPOUND". Proceedings of the AACR Poster Section 32, Abstract 3725, AACR 101<sup>st</sup> Annual Meeting, Washington D.C, USA, 2010
- Meregalli C, Chiorazzi A, Costa B, Ferrari F, Lanza M, Letari O, Caselli G., Cavaletti G. "CR4056: A NOVEL POTENT ANTI-NOCICEPTIVE AGENT ACTIVE ON SEVERAL

ANIMAL MODELS OF NEUROPATHIC PAIN". III NeuPSIG Abstract, Neuropathic Pain Conference, Athens, Greece, 2010

- Neri E, Espinoza S, Sala E, Garofalo P, Mennuni L, Ferrari F, Lanza M, Caselli G. "INHIBITION OF CAPSAICIN-INDUCED NEUROGENIC PAIN BY CR4056, A NOVEL IMIDAZOLINE-2 (I2R) RECEPTOR LIGAND". XIII Congresso della Società Italiana di Neuroscienze, Milano, 2009
- Lanza M, Fiorentino S, Mennuni L, Letari O, Costa B, Caselli G. "CR4056: A NOVEL POTENT ANTI-HYPERALGESIC AGENT FOR NEUROPATHIC PAIN TREATMENT". Keystone Symposia "The neurobiology of pain and analgesia", Santa Fe, NM, USA, 2009
- Lanza M., Espinoza S., Mennuni L., Fiorentino S., Mandelli S., Giordani A. and Caselli GF. "MODULATION OF NEUROTRANSMITTER RELEASE BY CR4056, A NEW ANALGESIC COMPOUND". FENS Abstract, vol.4, 189.18, FENS Forum, Geneva, Switzerland, 2008

# RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Professor **Tredici** per avermi dato la possibilità di entrare a far parte della grande famiglia del Dipartimento di Neuroscienze (DNTB) che da anni coordina e dirige.

Intendo poi ringraziare il **gruppo di ricerca del Dott. Caselli** della ditta farmaceutica Rottapharm con cui abbiamo cooperato per la definizione di questo lavoro, che mi ha fornito la molecola in studio e dati indispensabili per la realizzazione di tale elaborato.

Vorrei poter esprimere una profonda gratitudine verso coloro che mi hanno portato a questo traguardo, sperando di essere stata all'altezza delle aspettative e cercando di fare tutto al meglio sempre con passione ed impegno.

Spero di poter continuare in futuro a lavorare con le stesse persone con le quali ho avuto il piacere e l'onore di lavorare durante tutti questi anni, in un ambito che per alcuni può risultare un tantino particolare..... ma che per me è stato sede di soddisfazione e che mi auguro possa essere solo una piccola anticipazione del mio futuro! Una sincera gratitudine va a...

**Guido**, capo supremo del gruppo *in vivo*, a cui sono grata per la stima dimostrata e l'entusiasmo per la ricerca che mi ha trasmesso...

**Norberto** fonte inesauribile di conoscenza e di insegnamento del mondo animale...e non solo...

**Annalisa** che oltre che collega è diventata presto una insostituibile amica per la sincerità del suo affetto e per le giornate condivise dentro e fuori il DNTB...

**Valentina** punto di riferimento fondamentale sempre più da scoprire....

**Alessia** da subito collega di banco ed ora indispensabile amica

**Barbara** a tutti gli effetti "una di noi" pronta a dedicarsi alle amiche un po' pazzarelle

**Federica**, la più piccola del gruppo, appena arrivata e già pronta a spiccare il volo...

**Cecilia** per i numerosi consigli su cosa vuol dire "fare ricerca"

Un ringraziamento importante va a **tutte** le altre persone del **DNTB** che hanno contribuito con la loro competenza e amicizia alla mia crescita professionale e personale.

Come dimenticare tutti i miei **amici**, che da anni mi sostengono o che da poco sono entrati nella mia vita, tutti voi mi avete regalato tante piccole manifestazioni di affetto da cui ho tratto la forza e gli stimoli per crescere e a diventare la persona che sono oggi....

Infine, desidero ringraziare con affetto tutta **la mia famiglia** per il loro sostegno e per essere sempre il mio punto di riferimento nella vita, ed in particolare per essermi stata vicino ogni momento del mio percorso di crescita.

Infine, ma non per ordine di importanza, **Marco**.....l'uomo che da sempre è al mio fianco, che ha condiviso con me gioie e dolori, sempre con molta pazienza e affetto ... che ha deciso di accompagnarmi anche nel futuro....

...e un grazie a tutta la **sua famiglia** che ha partecipato alle tappe di questo percorso sempre con entusiasmo e considerandomi una di loro...

Con affetto GRAZIE A TUTTI VOI ed un augurio a me stessa.....

*Cristina*