

“La differenza tra le cose difficili e le cose impossibili sta nel fatto che per quelle considerate impossibili ci vuole solo più tempo, più impegno, più fede.”

(A. Cevenini)

*Al mio Papà*

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO – BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale

Dottorato in Neuroscienze

-XXVI ciclo-



**CARATTERIZZAZIONE NEUROFISIOLOGICA,  
NEUROPATOLOGICA E COMPORTAMENTALE  
DELLA NEUROPATIA PERIFERICA DA BORTEZOMIB  
IN MODELLI MURINI**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Guido CVALETTI

Tutor: Chiar.mo Prof. Guido CVALETTI

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Barbara SALA

Matricola n. 716318

Anno Accademico 2012-2013

# INDICE

<b>SCOPO DEL LAVORO E RIASSUNTO</b>	<b>6</b>
<b>AIM OF WORK AND SUMMARY</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>15</b>
<b>1. Le neuropatie periferiche</b>	<b>15</b>
<b>2. Le neuropatie periferiche indotte da farmaci chemioterapici</b>	<b>19</b>
<b>3. Bortezomib</b>	<b>22</b>
3.1 Caratteristiche e meccanismo d'azione	23
3.2 Azione antineoplastica	29
3.3 Azione neurotossica	30
3.4 Modelli in vivo di neuropatia periferica	32
<b>4. Mieloma multiplo</b>	<b>34</b>
4.1 Eziologia	34
4.2 Patogenesi	35
4.3 Sintomatologia	36
4.4 Diagnosi e fattori prognostici	37
4.5 Terapia ed effetti collaterali	38
4.6 Modelli <i>in vivo</i> di mieloma multiplo	39
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>45</b>
<b>A. Studio dell'azione neurotossica di bortezomib in modelli murini</b>	<b>45</b>
A.1 Animali	45
A.2 Modalità di somministrazione	45
A.3 Experimental design	45
A.3.1 Studio dell'azione neurotossica di bortezomib nel topo Balb/c, CD1, Hsd NuNu e Scid	46
A.3.2 Studio combinato dell'azione neurotossica ed antineoplastica di bortezomib in un modello murino di mieloma multiplo	48

---

A.4 Metodi di valutazione della tossicità, neurotossicità e azione antineoplastica del trattamento farmacologico	50
A.4.1 Tossicità generale: monitoraggio dello stato di salute dell'animale	50
A.4.2 Tossicità generale: monitoraggio del peso corporeo	50
A.4.3 Neurotossicità: misura della velocità di conduzione nervosa	50
A.4.4 Neurotossicità: analisi morfologiche dei DRG e del nervo sciatico	51
A.4.5 Neurotossicità: analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico	52
A.4.6 Test comportamentali: dynamic test	52
A.4.7 Azione antineoplastica: misura della crescita tumorale	54
A.5 Analisi statistiche	54
<b>B. Analisi di localizzazione dei trasportatori del Ca<sup>2+</sup> Parvalbumina e Calbindina</b>	<b>55</b>
B.1 Animali	55
B.2 Analisi di localizzazione: immunoistochimica	55
B.2.1 Preparazione del campione	55
B.2.2 Reazione di immunoistochimica	55
B.2.3 Analisi morfometrica	56
B.3 Analisi statistiche	56
<b>C. Materiali</b>	<b>57</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>58</b>
<b>A. Studio dell'azione neurotossica di bortezomib in modelli murini</b>	<b>58</b>
A.1 Studio dell'azione neurotossica di bortezomib in topi Balb/c, CD1 Hsd NuNu e Scid	60
A.1.1 Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo	60
A.1.2 Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa	65
A.1.3 Neurotossicità: analisi morfologica dei DRG e del nervo sciatico	67
A.1.4 Neurotossicità: analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico	73
A.1.5 Neurotossicità: dynamic test	78
A.2 Studio combinato dell'azione neurotossica ed antineoplastica di bortezomib in un modello murino di mieloma multiplo	79

A.2.1 Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo	79
A.2.2 Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa	81
A.2.3 Neurotossicità: analisi morfologica dei DRG e del nervo sciatico	83
A.2.4 Neurotossicità: analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico	85
A.2.5 Neurotossicità: dynamic test	89
A.2.6 Azione antineoplastica: misura della crescita tumorale	90
<b>B. Analisi di localizzazione dei trasportatori del Ca<sup>2+</sup> Parvalbumina e Calbindina</b>	<b>91</b>
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>108</b>
<b>PUBBLICAZIONI</b>	<b>119</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>121</b>

## **SCOPO DEL LAVORO E RIASSUNTO**

La messa a punto di diversi modelli di neuropatia periferica indotta da farmaci antineoplastici in ratto, ha consentito negli ultimi 20 anni di chiarire i meccanismi fisiopatologici coinvolti nella degradazione delle fibre nervose e nella sofferenza dei neuroni dei gangli della radice dorsale (DRG) e responsabili della neurotossicità periferica e, inoltre, di identificare delle strategie di neuroprotezione utili a contrastare o a curarne gli effetti. Tuttavia, poiché solamente poche linee tumorali sono in grado di indurre lo sviluppo di tumori nel ratto, questo modello animale non rappresenta il mezzo più efficace per studiare, contemporaneamente, l'attività antineoplastica e gli effetti neurotossici dei chemioterapici. Ciò è invece possibile in un modello murino, al contrario del ratto, grazie alla capacità di sviluppare tumori solidi in seguito all'inoculo di linee cellulari tumorali di diversa origine.

L'obiettivo di questo lavoro, svolto nell'ambito del Dottorato in Neuroscienze, è stato la messa a punto di quattro modelli murini di neuropatia periferica indotta dalla somministrazione dell'inibitore del proteasoma bortezomib, attraverso una caratterizzazione neurofisiologica, istopatologica e comportamentale.

Le neuropatie periferiche indotte da chemioterapici (CIPN dall'inglese *chemotherapy-induced peripheral neuropathies*) rappresentano uno dei più comuni fattori limitanti l'utilizzo nella terapia antitumorale di tali farmaci, in quanto spesso possono compromettere in modo significativo la qualità di vita dei pazienti.

I meccanismi che stanno alla base dell'insorgenza delle neuropatie periferiche sono ancora poco conosciuti, nonostante sia noto che la neurotossicità dipenda dalla dose e dal tipo di farmaco utilizzato.

Bortezomib è un farmaco antineoplastico appartenente alla famiglia dei composti inibitori del proteasoma ed ha una provata efficacia nella terapia del mieloma multiplo; la *Food and Drug Administration* (FDA) ha infatti approvato l'utilizzo di bortezomib nel 2003 per il trattamento del mieloma multiplo in fase avanzata, promuovendolo nel 2008 come farmaco di prima linea nel trattamento iniziale di tale patologia. Tuttavia, in clinica, i pazienti in trattamento con bortezomib sviluppano una neuropatia di tipo prevalentemente sensitivo spesso accompagnata da dolore neuropatico.

Questo lavoro si è articolato in *tre fasi consecutive*:

(A.1) Una fase di messa a punto *in vivo* di quattro modelli murini di neuropatia periferica indotta da bortezomib.

Obiettivo: valutare le caratteristiche neuropatologiche della neuropatia periferica da bortezomib in due ceppi murini immunocompetenti (Balb/c e CD1) e in due ceppi immunodeficienti (Hsd NuNu e Scid).

(A.2) Una fase di messa a punto di un modello murino di mieloma multiplo associato al trattamento chemioterapico con bortezomib.

Obiettivo: valutare contemporaneamente l'attività antineoplastica e neurotossica di bortezomib in topi Scid.

(B) Una fase di analisi di localizzazione dei trasportatori del Ca<sup>2+</sup> Parvalbumina e Calbindina (marcatori, rispettivamente dei neuroni grandi e dei neuroni piccoli) nei neuroni sensitivi dei DRG.

Obiettivo: verificare la distribuzione delle diverse sottopopolazioni neuronali dei DRG (neuroni piccoli, medi e grandi) per quantificare il danno subito dal trattamento farmacologico con bortezomib.

Al fine di mettere a punto e studiare nel modello murino le caratteristiche neuropatologiche della neuropatia periferica indotta da bortezomib (A.1), topi femmine Balb/c, CD1, Hsd NuNu e Scid (peso iniziale di circa 19-21 gr.) sono stati trattati con il chemioterapico. Nello specifico ai topi Balb/c è stato somministrato bortezomib due volte a settimana per 4 settimane alla dose di 0,8 mg/Kg; ai topi CD1 e Hsd NuNu il farmaco è stato somministrato due volte a settimana per 6 settimane alla dose di 0,8 mg/Kg mentre ai topi Scid bortezomib è stato somministrato una volta a settimana per 5 settimane alla dose di 1 mg/Kg. Durante l'intero periodo di trattamento sono stati valutati sia parametri indice di una tossicità generale, quali il tasso di mortalità e la variazione del peso corporeo, sia di neurotossicità quali la misurazione della velocità di conduzione nervosa (VDC) lungo il fascio di nervi caudale ed il nervo digitale, analisi morfologiche e morfometriche dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico e la valutazione del dolore neuropatico attraverso il dynamic test.

La valutazione dei parametri di tossicità generale ha evidenziato una buona tolleranza al trattamento con bortezomib in tutti e quattro i ceppi: i topi Balb/c e Scid trattati con il chemioterapico presentano una riduzione del peso corporeo (rispetto ai controlli non trattati) statisticamente significativa (rispettivamente del 10,65 e dell' 8,17%), al contrario gli animali

CD1 sono caratterizzati da un incremento del peso corporeo non paragonabile a quello degli animali non trattati (riduzione del 7,9% rispetto ai controlli) e i topi Hola Hsd NuNu mostrano un incremento del peso corporeo paragonabile a quello degli animali non trattati.

Le misurazioni delle VDC, indice di danno a carico delle fibre di grosso calibro, hanno messo in evidenza alterazioni neurofisiologiche di differente severità in tutti i ceppi. Bortezomib ha determinato sia una riduzione evidente della VDC caudale che di quella digitale. I topi Balb/c hanno manifestato una riduzione della VDC caudale del 27,3% e della VDC digitale del 17,9% (rispetto ai controlli non trattati); negli animali CD1 la riduzione della VDC caudale è stata del 20,3% mentre quella della VDC digitale è stata del 26,9%; i topi NuNu hanno mostrato una riduzione della VDC caudale del 15,2% e della VDC digitale del 13,5%; gli animali Scid sono stati caratterizzati da una riduzione della VDC caudale del 21,35% e della VDC digitale del 23,83%. L'analisi morfologica dei DRG ha evidenziato che bortezomib è in grado di causare delle alterazioni della morfologia sia dei neuroni sensitivi che delle cellule satellite. Nel nervo sciatico degli animali trattati è stata osservata una degenerazione assonale delle fibre mieliniche da moderata a severa. L'analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG ha dimostrato un aumento quantitativo delle dimensioni del soma, del nucleo e del nucleolo dei topi Balb/c rispetto ai controlli non trattati. L'aumento delle dimensioni del nucleolo ha caratterizzato il ceppo CD1, così come il ceppo Hola Hsd NuNu e il ceppo Scid nei quali si è manifestato anche l'aumento delle dimensioni somatiche.

L'analisi morfometrica del nervo sciatico nei topi Scid ha evidenziato l'aumento statisticamente significativo della g-ratio (rapporto tra il diametro dell'assone e il diametro della fibra) dovuto al trattamento con bortezomib e una tendenza, non significativa, alla riduzione dello spessore della guaina mielinica.

L'utilizzo del dynamic test ha permesso di valutare l'insorgenza di allodinia meccanica (percezione dolorosa in risposta a uno stimolo meccanico non nocicettivo) in seguito a trattamento con bortezomib osservando una diversa risposta ad uno stimolo meccanico tra gli animali trattati e i controlli. I topi CD1 e Scid hanno manifestato una riduzione nei tempi di risposta allo stimolo rispetto agli animali controllo statisticamente significativa (rispettivamente 29,1% e 22,1%); al contrario gli animali Balb/c e Hola Hsd NuNu hanno mostrato comunque una riduzione dei tempi di risposta allo stimolo rispetto agli animali controllo, ma non significativa dal punto di vista statistico (rispettivamente 21,5 % e 20,4%).

Al fine di valutare contemporaneamente l'attività antineoplastica e neurotossica di bortezomib (A.2), topi femmine Scid (peso iniziale di circa 19-21 gr.) sono stati inoculati con  $1 \times 10^6$  cellule della linea tumorale RPMI 8226 (linea cellulare umana di mieloma multiplo). Metà di questi animali è stato trattato con bortezomib 1 mg/Kg una volta a settimana per 5 settimane. Anche in questa fase del lavoro durante l'intero periodo di trattamento sono stati valutati sia parametri indice di una tossicità generale, quali il tasso di mortalità e la variazione del peso corporeo, sia di neurotossicità quali la misurazione della velocità di conduzione nervosa (VDC) lungo il fascio di nervi caudale ed il nervo digitale, analisi morfologiche e morfometriche dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico e la valutazione del dolore neuropatico attraverso il dynamic test. Inoltre è stata valutata l'azione antineoplastica di bortezomib attraverso il monitoraggio della crescita tumorale.

La valutazione dei parametri di tossicità generale ha evidenziato una buona tolleranza al trattamento con il chemioterapico: gli animali portatori di mieloma multiplo hanno mostrato un aumento del peso corporeo paragonabile a quello degli animali di controllo, mentre gli animali portatori di mieloma multiplo trattati con bortezomib hanno manifestato una riduzione del peso corporeo tra la seconda e la quarta somministrazione con un recupero fino al termine del trattamento. Le misurazioni delle VDC hanno messo in evidenza alterazioni neurofisiologiche di differente severità nei due gruppi rispetto agli animali di controllo. Bortezomib ha determinato sia una riduzione evidente della VDC caudale (27,1% rispetto agli animali di controllo) che di quella digitale (19,1% rispetto agli animali di controllo); gli animali portatori di mieloma multiplo hanno, invece, mostrato una VDC caudale paragonabile a quella degli animali di controllo e una riduzione della VDC digitale (14,21%).

L'analisi morfologica dei neuroni sensitivi dei DRG ha dimostrato alterazioni a carico dei neuroni sensitivi e delle cellule satelliti sia negli animali portatori di mieloma che in quelli trattati con bortezomib; inoltre il mieloma multiplo ha causato una frequente degenerazione delle fibre mieliniche che permane negli animali tratti con bortezomib

L'analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG ha dimostrato una riduzione quantitativa delle dimensioni del soma, del nucleo e del nucleolo dei topi Scid inoculati con mieloma multiplo rispetto agli animali controllo, mentre quelli inoculati con mieloma multiplo e trattati con bortezomib hanno evidenziato un aumento statisticamente significativo delle superfici somatiche e nucleolari, ma non di quelle nucleari.

L'analisi morfometrica del nervo sciatico ha messo in evidenza l'aumento statisticamente significativo della g-ratio negli animali portatori di mieloma multiplo, incrementato nei topi sottoposti a trattamento con bortezomib. La riduzione dello spessore della guaina mielinica è

risultata statisticamente significativa negli animali portatori di mieloma multiplo ed è incrementata negli animali sottoposti a trattamento con bortezomib.

Attraverso l'utilizzo del dynamic test è stata valutata l'insorgenza di allodinia meccanica in entrambi i gruppi: gli animali portatori di mieloma multiplo hanno evidenziato una risposta allo stimolo paragonabile a quella degli animali di controllo, mentre gli animali sottoposti a trattamento con bortezomib hanno manifestato una riduzione dei tempi di risposta allo stimolo statisticamente significativa rispetto agli animali di controllo (14,53%), ma non altrettanto significativa rispetto agli animali portatori di mieloma multiplo (9,6%).

Infine, la valutazione della crescita tumorale, ha messo in evidenza l'efficace ruolo antineoplastico di bortezomib a partire dalla prima settimana di trattamento.

Dal momento che l'analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG degli animali trattati con bortezomib ha mostrato un aumento anomalo delle superfici somatiche, nucleari e nucleolari, è stato stabilito di verificare la distribuzione delle diverse sottopopolazioni neuronali dei DRG (neuroni piccoli, medi e grandi) per quantificare il danno subito dal trattamento chemioterapico (**B**). In maniera inaspettata, calbindina e parvalbumina hanno evidenziato la marcatura di cellule con una superficie somatica simile sia negli animali di controllo (rispettivamente  $478,1 \pm 210,5 \mu\text{m}^2$  e  $451,5 \pm 193,5 \mu\text{m}^2$ ) che negli animali trattati (rispettivamente  $368,2 \pm 144,1 \mu\text{m}^2$  e  $342,6 \pm 136 \mu\text{m}^2$ ). Risulta evidente una differenza di marcatura tra i topi di controllo e quelli sottoposti a trattamento con chemioterapico, in particolare dal punto di vista della percentuale di cellule marcate con parvalbumina: infatti i neuroni dei DRG degli animali di controllo immunomarcati rappresentano il 33,15% delle cellule totali a differenza di quelli degli animali trattati che costituiscono il 15,36% delle cellule totali.

La messa a punto e la caratterizzazione di modelli murini di neuropatia periferica indotta da bortezomib, eseguite in questo lavoro, hanno posto le basi per lo studio contemporaneo dell'attività e della neurotossicità di un farmaco antineoplastico in presenza di una massa tumorale. Questo ulteriore passo in avanti è il presupposto per la valutazione dell'efficacia di composti neuroprotettori utilizzati in associazione al farmaco chemioterapico con possibilità di verificare che il loro uso contemporaneo non comporti la perdita di efficacia dell'antineoplastico.

## **AIM OF WORK AND SUMMARY**

In the last 20 years several *in vivo* rat models of peripheral neuropathy induced by antineoplastic drugs clarified the pathophysiological mechanisms involved in peripheral neurotoxicity. Moreover these models allowed to identify neuroprotection strategies for preventing sensory nerve and dorsal root ganglia (DRG) neurons damages. Only a few cancer cell lines is able to induce the development of cancer in immunocompetent rats, therefore these models do not represent the best way to investigate, at the same time, the antineoplastic activity and the neurotoxic effects of these drugs; by contrast, murine models are widely employed in oncological studies and can be useful for this purpose.

During the Ph.D Programme in Neuroscience, the aim of this project has been the neurophysiologic, histopathologic and behavioural characterization of 4 murine models of peripheral neuropathy induced by the proteasome inhibitor bortezomib.

The neurotoxic side effects of several antineoplastic agents are among the main reason for treatment modification or their limitation as antitumor therapy. The mechanisms underline the onset of peripheral neuropathies are still not clear, even though it is accepted that the neurotoxicity is dose- and drug-dependent. Bortezomib is a proteasome inhibitor and it is used as an efficient chemotherapeutic agent in the treatment of multiple myeloma. In 2003 the *Food and Drug Administration* (FDA) approved the use of bortezomib for the treatment of advanced multiple myeloma, then in 2008 the drug was promoted as a first-line chemotherapeutic agent for the treatment of myeloma. However patients treated with bortezomib develop a peripheral neuropathy, often combined with neuropathic pain.

This project consist of **3 consecutive phases**:

(A.1) The development of 4 *in vivo* murine models of bortezomib-induced peripheral neuropathy.

Aim: to evaluate the neuropathologic mechanisms involved in bortezomib-induced peripheral neuropathy in two immunocompetent murine strains (Balb/c and CD1) and in two immunodeficient murine strains (Hsd Hsd NuNu and Scid).

(A.2) The development of a multiple myeloma murine model in association with bortezomib treatment.

Aim: to evaluate, at the same time, the antineoplastic activity and the neurotoxic effect of bortezomib in Scid mice.

(B) The localization of Ca<sup>2+</sup> transporters Calbindin and Parvalbumin in DRG neurons (respectively markers of small size neurons and big size neurons).

Aim: verify the distribution of different DRG neurons subpopulations (small size, medium size and big size neurons) to quantify the damage induced by the treatment.

Female Balb/c, CD1, Hsd NuNu and Scid mice (initial body weight 19-21 gr.) were treated with bortezomib to develop and to study the neuropathologic mechanisms of the peripheral neuropathy (A.1).

Balb/c mice were administered with bortezomib twice a week for 4 weeks at the dose of 0,8 mg/Kg; CD1 and Hsd NuNu were treated with bortezomib 0,8 mg/Kg twice a week for 6 weeks while Scid mice were administered with bortezomib 1 mg/Kg once a week for 5 weeks.

During the treatment period we evaluated both general toxicity parameters, like mortality and body weight changes, and neurotoxicity parameters, including the sensory nerve conduction velocity (NCV) in the caudal and digital nerve, the morphological and morphometrical analysis of DRG neurons and sciatic nerve and the assessment of neuropathic pain by behavioural dynamic test.

Bortezomib has been well tolerated in all 4 strains: Balb/c and Scid mice treated with the compound showed a statistically significant decrease in body weight compared to the control ones (respectively of 10,65 and 8,17%); on the contrary CD1 mice showed an increase in body weight even though not comparable to the control ones (reduction of 7,9% respect to control mice) and Hsd NuNu mice revealed an increase in body weight similar to control ones.

All 4 strains disclosed different neurophysiological alterations.

Bortezomib caused a clear reduction both in caudal and in digital NCV. Balb/c showed a decrease in caudal NCV of 27,3% and in digital NCV of 17,9% (compared to control ones). CD1 mice showed a reduction in caudal NCV of 20,3% and in digital NCV 26,9%; Hsd NuNu mice showed a decrease in caudal NCV of 15,2% and in digital NCV of 13,5%; Scid mice showed a reduction in caudal NCV of 21,35% and in digital NCV of 23,83%.

The morphological analysis highlighted alterations of DRG neurons and satellite cells induced by bortezomib; moreover the compound caused a severe and frequent degeneration of myelinic fibers.

The morphometrical analysis of DRG neurons showed the increase in size of soma, nucleus and nucleolus in Balb/c treated mice respect to control ones. In CD1 mice only the nucleolus was increased in size, while in Hsd NuNu and Scid mice bortezomib caused an increase in both of soma and nucleolus size.

Furthermore Bortezomib induced a statistically significant increase of g-ratio (the ratio of the inner axonal diameter to the total outer diameter) and a trend decrease of myelin thickness.

Dynamic test highlighted the onset of mechanical allodynia (a pain due to a stimulus which does not normally provoke pain). CD1 e Scid mice showed a statistically significant reduction of the answer to the mechanical stimulus respect to control ones (respectively of 29,1% and 22,1%); on the contrary in Balb/c mice and Hsd NuNu bortezomib caused a not statistically significant decrease of answer (respectively 21,5% and 20,4%).

Female Scid mice (initial body weight 19-21 gr.) were injected with  $1 \times 10^6$  RPMI 8226 cells (human cellular line of multiple myeloma) and half of these animals were treated with bortezomib 1 mg/Kg once a week for 5 weeks (A.2) to evaluate, at the same time, the antineoplastic activity and the neurotoxic effect of the compound. Also in this phase, parameters of general toxicity and of neurotoxicity were evaluated. Moreover we monitored the tumor increase.

Bortezomib has been well tolerated in all groups: mice injected with RPMI 8226 cells revealed an increase in body weight similar to control ones, while mice injected with RPMI 8226 cells and treated with the compound showed a decrease in body weight between the second and the fourth administration that recovered until the end of treatment.

Two groups disclosed different neurophysiological alterations.

Bortezomib caused a relevant decrease both in caudal (27,1% respect to control animals) and in digital NCV (19,1% respect to control animals) while multiple myeloma reduced only the digital NCV (14,21% respect to control animals).

The morphological analysis showed alterations of DRG neurons and satellite cells induced by multiple myeloma that were confirmed in animals treated with bortezomib; moreover multiple myeloma caused a frequent degeneration of myelinic fibers that increased in animals treated with bortezomib.

The morphometrical analysis of DRG neurons showed the decrease in size of soma, nucleus and nucleolus in mice with multiple myeloma, while bortezomib caused an increase in size of soma and nucleolus.

The morphometrical analysis of sciatic nerve showed the involvement of multiple myeloma in the increase of g-ratio and in the decrease of myelin thickness. The treatment with bortezomib highlighted these results.

Dynamic test demonstrated the onset of mechanical allodynia only in mice with multiple myeloma treated with bortezomib: the decrease in the answer to the stimulus is statistically significant in comparison to control ones (14,53%) but it is not relevant if compared to animals with multiple myeloma (9,6%).

Furthermore, the evaluation of tumor size demonstrated that bortezomib has an efficient antineoplastic role starting from the first week of treatment.

Since the morphometrical analysis of DRG neurons showed the increase in size of soma, nucleus and nucleolus of animals treated with bortezomib, we decided to measure the damage induced by the compound proving the distribution of different neuronal subpopulations (small, medium and big neurons) (**B**).

Unexpectedly Calbindin and Parvalbumin labelled neurons with similar somatic areas both in control animals (respectively  $478,1 \pm 210,5 \mu\text{m}^2$  e  $451,5 \pm 193,5 \mu\text{m}^2$ ) and in treated mice (respectively  $368,2 \pm 144,1 \mu\text{m}^2$  e  $342,6 \pm 136 \mu\text{m}^2$ ). A difference between the labelling of control animals respect to treated ones is clear, particularly if we consider the percentage of parvalbumin labelling: indeed the DRG neurons of control animals treated represent the 33,15% of all cells while the DRG neurons of treated animals are the 15,36% of all neurons.

The characterization of *in vivo* murine models of bortezomib-induced peripheral neuropathy of this study is relevant since it could represent a starting point for evaluating the anticancer activity of the compound and, at the same time, its neurotoxicity. Furthermore these models could be useful to test the neuroprotective action of new experimental agents and to evaluate the non-interference between the chemotherapeutic agent and the neuroprotectant agents.

# INTRODUZIONE

## 1. LE NEUROPATIE PERIFERICHE

Con il termine di neuropatia periferica si intende genericamente un disturbo della funzione o della struttura a livello del sistema nervoso periferico (SNP) ovvero di quell'insieme di strutture nervose nelle quali i neuroni ed i loro prolungamenti periferici interagiscono con le cellule periferiche satelliti o cellule di Schwann.

Con ciò non si vuole indicare una precisa affezione, ma piuttosto ci si riferisce ad una manifestazione, conseguenza di diverse possibili alterazioni che possono interessare lo stesso sistema, nelle sue varie componenti. Dal momento che ogni nervo periferico possiede una funzione altamente specializzata in una determinata parte del corpo, in seguito al suo danneggiamento può verificarsi una vasta gamma di sintomi.

In alcuni casi è possibile classificare il disturbo come puramente motorio, sensitivo o vegetativo sebbene numerose neuropatie possano interessare contemporaneamente più tipi di fibre nervose.

Le neuropatie possono essere classificate o in base alla distribuzione e al numero di nervi interessati o in base all'eziologia: sulla base del primo criterio si classificano in mononeuropatie, mononeuropatie multifocali, polineuropatie e polineuropatie simmetriche; sulla base del secondo criterio si suddividono in ereditarie e acquisite.

Le *mononeuropatie* interessano un singolo nervo periferico: sono patologie solitamente conseguenti a lesioni traumatiche, dovute a compressioni meccaniche, lesioni vascolari e neoplasie infiltranti. La sintomatologia ad esse associata è localizzata e limitata al territorio di innervazione del nervo leso. La sindrome del tunnel carpale, conseguente all'ispessimento del canale membranoso che il nervo mediano percorre nel palmo della mano per raggiungere ed innervare le dita, ne è un tipico esempio (Cranford et al., 2007). Le mononeuropatie possono essere anche associate all'alcolismo, al diabete mellito e alle neuropatie ereditarie; vengono valutate mediante test elettrodiagnostici che evidenziano una diminuzione della velocità di conduzione nervosa del nervo in esame.

Le *mononeuropatie multifocali* sono caratterizzate da un interessamento simultaneo o progressivo di più nervi localizzati in aree distinte.

Le *polineuropatie* sono caratterizzate da un interessamento bilaterale e simmetrico dei nervi periferici (*polineuropatie simmetriche*), (Warzoc e Wattin, 1990). I disturbi compaiono generalmente nelle mani e nei piedi. Tali neuropatie sono solitamente correlate a malattie sistemiche: un tipico esempio è dato dalla polineuropatia diabetica.

Alcuni tipi di neuropatie hanno un esordio improvviso, mentre altre compaiono in maniera graduale nell'arco degli anni. La sintomatologia è diversa a seconda del tipo di fibre nervose interessate e alla loro localizzazione ma, nella maggior parte dei casi, la neuropatia periferica si manifesta attraverso debolezza alle braccia e alle gambe, formicolii, dolore, intorpidimento, assenza del senso di posizione. La qualità della vita dei pazienti colpiti da tale patologia viene fortemente compromessa.

Dal punto di vista eziologico si distinguono le *neuropatie ereditarie*, causate da alterazioni genetiche che vengono trasmesse di generazione in generazione (in molti casi il difetto genetico è noto), e le *neuropatie acquisite*, dovute ad alterazioni genetiche insorte nel corso della vita.

La famiglia di neuropatie ereditarie più ampia è quella delle *Neuropatie Motorie Sensoriali Ereditarie* (HSMN). Tali patologie sono caratterizzate da una demielinizzazione a lenta evoluzione, spesso associata ad anomalie anatomiche del piede (piede cavo).

La malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT) di tipo 1 e di tipo 2 (HSMN I e II) è l'esempio più comune di HSMN ed è un gruppo di patologie dovute a mutazioni nei cromosomi 1, 8, 17, X. Sono caratterizzate da una progressione lenta che interessa le fibre nervose periferiche adibite al controllo del movimento e che determina la compromissione dei muscoli delle estremità che, indebolendosi, si atrofizzano dando agli arti una tipica forma sottile.

La CMT di tipo I, che rappresenta oltre la metà dei casi, è definita anche "Neuropatia demielinizzante" poiché comporta la demielinizzazione del nervo con alterazioni a carico della conduzione nervosa. Inizialmente, infatti, la mielina difettosa, o assente, causa solo rallentamento della velocità di conduzione, senza sintomi o con sintomi leggeri per lo più di debolezza, poi la denervazione muscolare aumenta progressivamente e la malattia si manifesta con più evidenza.

La CMT di tipo II, che rappresenta circa il 25-30 % dei casi, è caratterizzata dalla degenerazione assonale del nervo. La velocità di conduzione è quasi normale, ma c'è una diminuzione dell'ampiezza del segnale.

Altre patologie ereditarie sono la malattia di Dejerine-Sottas (HSMN di tipo III), simile alla CMT ma con un decorso clinico più rapido, caratterizzata da demielinizzazione e successiva rimielinizzazione del nervo periferico che aumenta di volume; la neuropatia amiloidotica

familiare legata al deposito di una proteina anomala (transtiretina) all'interno dei nervi periferici e le neuropatie in corso di porfiria, dovute all'alterato metabolismo delle porfirine che si associa a neuropatia periferica prevalentemente motoria.

Le neuropatie acquisite sono statisticamente più frequenti di quelle ereditarie e possono essere classificate sulla base delle diverse cause a cui sono dovute.

Si distinguono in:

- **Neuropatie da danni fisici (traumi):** i traumi costituiscono la causa più comune di lesione di un nervo. Lesioni o traumi improvvisi, causati ad esempio da incidenti automobilistici, cadute, sport e attività connesse, possono provocare resezione, compressione e stiramento del nervo inducendo danni di entità eterogenea a seconda che la conduzione nervosa sia più o meno conservata (Ugalde e Rosen, 2001). Tra le diverse cause che inducono queste neuropatie figurano le amiloidosi, accumuli di sostanza amiloide di origine proteica indigeribile dalle proteasi nei tessuti connettivi e nella matrice extracellulare, in grado di indurre un danno di tipo compressivo-ischemico e le neoplasie quando la massa tumorale si trova nelle vicinanze di un nervo causandone la compressione (sindrome paraneoplastica).

- **Neuropatie da malattie sistemiche:** sono disturbi che colpiscono l'intero organismo, spesso causate da un ampio spettro di disturbi sia metabolici che endocrini.

Nello specifico:

- ✓ Il *diabete mellito* è in grado di generare una neuropatia prevalentemente sensitiva. Si tratta di un disordine clinicamente evidente, o anche subclinico, che si manifesta nel corso della malattia diabetica in assenza di altre cause; tale disordine neurologico comprende manifestazioni a carico della funzione somatica e/o autonoma del sistema nervoso periferico. La patologia è caratterizzata da elevati livelli cronici di glucosio nel sangue che causano il danno nervoso.

- ✓ *Disturbi renali* possono causare anomale quantità di sostanze tossiche nel sangue, con un grave danneggiamento del nervo. La neuropatia sensitivo-motoria lenta insorge nella maggior parte dei pazienti in dialisi a causa delle grosse molecole ad alto peso molecolare difficilmente dializzabili. Alcune *malattie del fegato*, invece, portano a neuropatie come risultato di squilibri chimici.

- ✓ *Squilibri ormonali* sono alla base dell'alterazione dei normali processi metabolici che causano neuropatia. La presenza di ipotiroidismo, ad esempio, induce polineuropatie compressive del nervo mediano sensitivo-motore ad impronta assonale.

- ✓ *Carenze nutrizionali e vitaminiche* (in particolare B12, B1, B6 ed E) provocano danni di notevole entità al tessuto nervoso determinando degenerazione assonale. Le avitaminosi sono disturbi legati ad un regime dietetico inadeguato, ma possono essere dovute anche a problemi gastro-intestinali che impediscono un corretto assorbimento vitaminico (Singleton J.R., 2005).
- ✓ *L'alcolismo* induce danno tossico assonale che provoca neuropatia sensitivo-motoria distale ed è la seconda causa di neuropatia dopo il diabete nei paesi industrializzati.
- ✓ *Danni vascolari e malattie del sangue* determinano la diminuzione dell'ossigeno indirizzato ai nervi periferici portando rapidamente a gravi danni per i tessuti nervosi, fino alla morte.
- ✓ *La presenza di tossine* può causare lesioni nervose periferiche. Gli individui esposti a metalli pesanti (arsenico, piombo, mercurio, tallio), industrie farmaceutiche o tossine ambientali sviluppano spesso neuropatie.

▪ **Neuropatie da infezioni e malattie autoimmuni:** le reazioni immunitarie determinano l'insorgenza di neuropatie immuno-mediate che si manifestano quando il sistema immunitario, per ragioni sconosciute, "attacca" i nervi periferici, causando l'insorgenza della malattia. I virus e i batteri che possono attaccare i tessuti nervosi comprendono Herpes-varicella Zoster (Herpes Zoster), il virus Epstein-Barr, Citomegalovirus, Herpes Simplex e membri della grande famiglia dell' Herpes Virus umano. Il virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV), che provoca l'AIDS, causa gravi danni sia al Sistema Nervoso Centrale (SNC) che al SNP: può determinare forme diverse di neuropatia, ciascuna associata ad una specifica fase attiva della malattia di immunodeficienza. Una rapida progressione corrisponde ad una polineuropatia dolorosa che interessa piedi e mani, ed è spesso il primo segno clinico di infezione da HIV. Malattie come la difterite, la lebbra e la malattia di Lyme sono patologie batteriche caratterizzate da ampie lesioni nervose periferiche con una vasta gamma di disturbi neuropatici, compresa la polineuropatia dolorosa, che si manifesta spesso entro poche settimane dopo l'avvenuta infezione.

Le forme più comuni di neuropatie immuno-mediate sono rappresentate: - dalla Sindrome di Guillain-Barrè (SGB), una poliradicolonevrite acuta ad esordio rapido che può evolvere a paralisi totale e insufficienza respiratoria nell'arco di pochi giorni dai primi eventi, seguiti da recupero parziale o totale a pochi mesi dalla fase acuta. La sua eziopatogenesi è spesso legata ad infezioni batteriche o virali con la produzione di auto-anticorpi che generano

demielinizzazione (Kuwabara S., 2004; Winer J.B., 2008); - dalla poliradicolonevrite infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP), considerata la variante cronica della SGB; - dalle neuropatie croniche con auto-anticorpi verso le componenti dei nervi periferici, tra cui la glicoproteina associata alla mielina (MAG), i gangliosidi (GM1, GD1a, GD1b); - dalle neuropatie associate a vasculiti ovvero infiammazioni dei vasi sanguigni che possono interessare anche i vasi collaterali e i nervi periferici; - dalle neuropatie associate a gammopatie monoclonali dovute all'espansione clonale di linfociti B o plasmacellule nel midollo osseo e negli organi linfoidei con conseguente rilascio plasmatico di IgM che provocano nel nervo un accumulo di materiale proteico amiloidogeno e conseguente danno da compressione (Meier T. e Meyer M., 1990).

- **Neuropatie iatrogene:** sono legate alla somministrazione di farmaci antitumorali, anticonvulsivanti, agenti antivirali, antibiotici i cui effetti collaterali comportano l'insorgenza di disturbi a carico del SNP, limitando così il loro impiego a lungo termine.
  
- **Neuropatie idiopatiche:** neuropatie determinate da cause sconosciute.

## **2. NEUROPATIE PERIFERICHE INDOTTE DA FARMACI CHEMIOTERAPICI**

Le neuropatie periferiche indotte da chemioterapici (CIPN dall'inglese *chemotherapy-induced peripheral neuropathies*) sono classificate come neuropatie iatrogene e la loro insorgenza è determinata dagli effetti tossici sul SNP dovuti all'impiego di alcuni farmaci antineoplastici. Tali neuropatie rappresentano il più comune fattore limitante l'utilizzo in terapia di tali farmaci, in quanto spesso possono compromettere in modo significativo la qualità di vita dei pazienti.

Generalmente il SNP possiede la capacità di rigenerarsi in seguito a lesioni, ma perché ciò avvenga, il corpo cellulare dei neuroni deve rimanere illeso anche dopo il termine della somministrazione del farmaco. Sono solo alcuni i casi, però, in cui i sintomi sono in grado di risolversi completamente: nella maggior parte dei casi la neuropatia indotta da chemioterapici è solo parzialmente reversibile (Peltier e Russel, 2002).

I meccanismi che stanno alla base dell'insorgenza delle neuropatie periferiche sono ancora poco conosciuti, nonostante sia noto che la neurotossicità dipenda dalla dose e dal tipo di farmaco utilizzato.

Gli alcaloidi della vinca (es: vincristina, vindesina, vinblastina) e i taxani (taxolo e taxotere) inducono una polineuropatia sensitivo-motoria assonale distale, prevalentemente agli arti inferiori, dose-dipendente e solitamente reversibile dopo la sospensione del trattamento. L'attività tumorale di questi farmaci si esercita su una proteina del citoscheletro, la tubulina, che orienta il fuso mitotico nella divisione cellulare. L'importante ruolo della tubulina anche nel favorire il flusso assonale nel nervo periferico viene ritenuto alla base della patogenesi della neurotossicità indotta da questa classe di farmaci (Pace, 2005). La colchicina e gli analoghi dei nucleosidi sono anch'essi responsabili dell'induzione di una neuropatia dovuta a degenerazione assonale, mentre la suramina provoca, nel nervo colpito, fenomeni di demielinizzazione.

Un diverso meccanismo sembra invece essere responsabile della neurotossicità indotta dai composti derivati del platino (es: cisplatino, oxaliplatino, carboplatino): essi si concentrano nei DRG inducendo una neuropatia con sofferenza secondaria delle fibre sensitive di grosso calibro e un quadro di polineuropatia sensitiva cronica che insorge tardivamente (Pace, 2005).

La talidomide, un farmaco ad azione antiangiogenetica utilizzato nel trattamento del mieloma multiplo e nel trattamento della *graft-versus host disease* induce una neurotossicità periferica caratterizzata da una polineuropatia sensitiva distale con un meccanismo ancora non chiarito (si ipotizza un effetto combinato sia sulle fibre del nervo periferico che sui neuroni sensitivi), (Cavaletti et al., 2006).

Tra i farmaci di ultima generazione, sia gli inibitori del proteasoma (es: bortezomib) che gli eptiloni (antitubulinici simili ai taxani) hanno dimostrato una rilevante neurotossicità periferica: i primi inducono una marcata neuropatia periferica dose-dipendente spesso accompagnata anche da dolore neuropatico (Jaggannath et al., 2004; Cavaletti e Nobile-Orazio, 2007); i secondi, in quanto farmaci stabilizzanti dei microtubuli, agiscono come i taxani inducendo una polineuropatia sensitivo-motoria dose-dipendente.

Non bisogna sottovalutare il fatto che alcuni di questi farmaci vengono comunemente utilizzati in combinazione, aumentando così il rischio della loro neurotossicità.

In alcuni casi la neuropatia che si genera è spesso associata a dolore neuropatico e risulta essere invalidante per la qualità di vita del paziente al punto da richiedere la sospensione del trattamento farmacologico.

Non esistono metodologie tecniche non invasive per prevenire o diagnosticare tali patologie: ci si basa su osservazioni di tipo clinico per individuare la presenza e il grado di severità delle CIPN. I metodi classici di neurofisiologia, quali la misurazione della velocità di conduzione nervosa e l'elettromiografia sono poco sensibili nel rilevare i sintomi precoci della malattia e, inoltre, sono poco tollerate dai pazienti. Nonostante la rilevanza clinica non esistono ancora metodi universalmente accettati per definire la CIPN in tutti i suoi aspetti (somatici ed autonomici) e per valutarne l'impatto sulla qualità della vita (QdL) del paziente (Cavaletti et al., 2006). Anche quando una CIPN è effettivamente presente, la sua gravità può non essere definita in modo chiaro; esistono infatti diverse scale di classificazione delle neuropatie i cui riscontri, spesso, non sono confrontabili soprattutto perché basate su valutazioni di tipo soggettivo (Postma et al., 1995). Negli ultimi anni è stata proposta ed accettata una scala di riferimento comune agli studi delle CIPN da utilizzare a scopo valutativo e comparativo (Cavaletti e Marmiroli, 2004).

In alcuni casi gli effetti neurotossici del trattamento insorgono immediatamente o poco dopo la prima somministrazione del farmaco, in altri, invece, tali effetti si presentano dopo un periodo relativamente lungo dalla sospensione del trattamento chemioterapico. Questo fenomeno viene definito *coasting* ed è caratteristico delle neuropatie indotte da farmaci platino-derivati: la valutazione corretta della gravità del danno durante il trattamento è problematica e lo è, di conseguenza, l'eventuale decisione di variare la somministrazione del chemioterapico.

I sintomi neuropatici sono correlati al tipo di nervo interessato: i nervi sensitivi presentano un rischio maggiore di danno associato a chemioterapia rispetto ai nervi motori, dal momento che i farmaci utilizzati non sono in grado di passare la barriera ematoencefalica e raggiungere il SNC.

I sintomi associati ad una neuropatia sensitiva sono generalmente sonnolenza, formicolii ed un aumento della sensibilità dolorosa. La sintomatologia associata a neuropatia dei nervi motori, invece, è più eterogenea e legata al tipo di farmaco utilizzato: gli alcaloidi della vinca (v), se somministrati ad alte dosi provocano, oltre alla debolezza dei muscoli distali, un profondo decremento del riflesso tendineo; i farmaci platino-derivati (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino) ad alte dosi sono in grado di indurre debolezza muscolare.

La gravità della CIPN è inoltre legata a 5 fattori:

- ✓ il tipo di farmaco utilizzato;
- ✓ il tempo di infusione prescelto (tempi di infusione più brevi sono associati a neuropatie più gravi);

- ✓ le dosi singole e cumulative di farmaco. Quest'ultima risulta di maggiore rilevanza in quanto la rigenerazione del SNP necessita di un periodo di assenza di danno medio-lungo, esigenza incompatibile con la programmazione dei cicli di chemioterapia;
- ✓ l'esposizione ambientale, occupazionale o farmacologica del paziente a neurotossine;
- ✓ la presenza di neuropatie preesistenti al trattamento, come è il caso di pazienti diabetici, alcolisti o con sindrome paraneoplastica (Quasthoff e Hartung, 2002).

Chemioterapici quali il cisplatino, l'oxaliplatino, la talidomide, la suramina ed alcuni antitubulinici sono considerati, ad oggi, farmaci di "vecchia generazione" perché sviluppati diversi decenni fa. Ognuno di questi ha un'azione diretta alle cellule cancerogene, ma che non risparmia anche le cellule sane: questo determina un orientamento della ricerca biomedica sempre più rivolto da un lato allo sviluppo di farmaci antineoplastici di "nuova generazione" che, pur preservando l'efficacia antitumorale, presentino una ridotta neurotossicità; dall'altro all'individuazione di molecole neuroprotettive da affiancare in terapia ai farmaci antineoplastici, in grado di prevenirne e/o mitigarne gli effetti tossici.

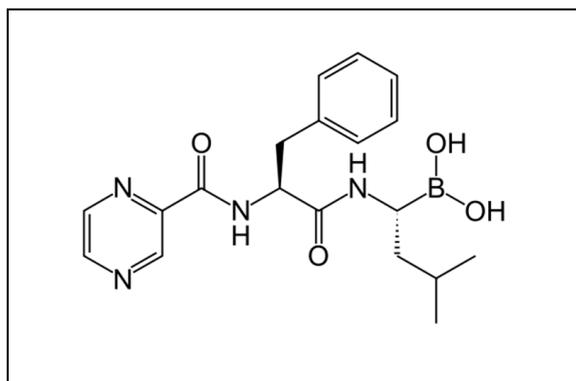
### **3. BORTEZOMIB**

Con il termine chemioterapico si intende, generalmente, un farmaco utilizzato in terapia per combattere le infezioni causate da microrganismi e parassiti. Sotto questo nome vengono, però, anche raggruppati tutti quei farmaci che trovano impiego nella terapia antitumorale (chemioterapici antitumorali).

La maggior parte dei farmaci chemioterapici vengono definiti "antiproliferativi" oltre che "citotossici", dal momento che agiscono interferendo con la sintesi del DNA, alterando il processo di divisione cellulare e producendo un danno che si conclude con la morte della cellula stessa.

### 3.1 Caratteristiche e meccanismo d'azione

Il **bortezomib** (Velcade, PS-341) (fig.1) è un composto sintetico che inibisce in modo reversibile l'attività chimotriptica della subunità 20S del proteasoma. Inoltre è in grado di inibire la proliferazione e indurre apoptosi in una grande varietà di linee cellulari tumorali, modelli animali e cellule tumorali di pazienti resistenti alle terapie convenzionali (Kane et al., 2006; Chari et al., 2010).



**Figura 1. Formula di struttura di bortezomib**

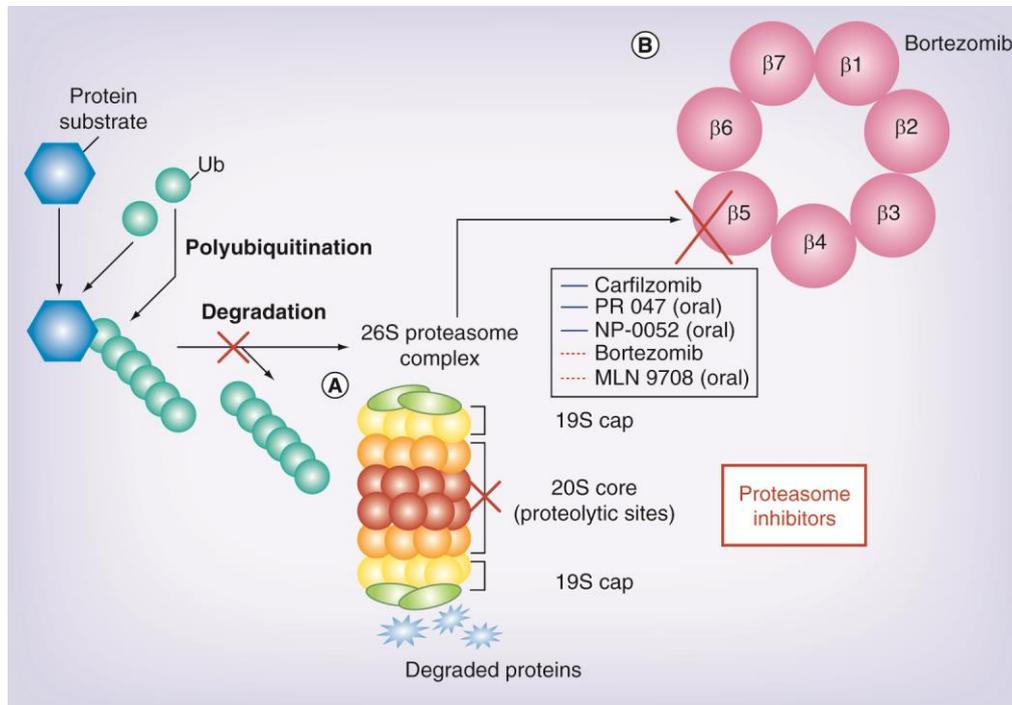
Il proteasoma 26S ubiquitina-dipendente è un complesso multienzimatico che esercita una funzione di mantenimento delle normali funzioni cellulari eliminando proteine intracellulari aberranti in risposta a stimoli extracellulari e contribuendo in questo modo a mantenere l'omeostasi proteica.

Il proteasoma 26S è presente sia nel citoplasma che nel nucleo ed è formato da una subunità proteolitica 20S in cui risiede il centro catalitico che idrolizza il substrato peptidico, e da due complessi regolatori 19S responsabili del riconoscimento, della deubiquitinazione e del trasloco del substrato nel core 20S (Romano et al., 2013) e nei quali le proteine poliubiquitinate vengono degradate (fig. 2).

Prima della degradazione, la proteina bersaglio viene marcata su uno specifico residuo di lisina (K48) con una catena poliubiquitina. Tale substrato è 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).

L'atomo di boro di bortezomib si lega con un'alta affinità e stabilità al sito catalitico del proteasoma 26S portando all'inibizione reversibile dell'attività proteolitica e dell'attività chimotripsino-simile.

L'approvazione dell'utilizzo dell'inibitore del proteasoma bortezomib per il trattamento del mieloma multiplo (MM) ha validato il ruolo della subunità 20S come target per i farmaci antitumorali (Adams e Kauffmann, 2004).



**Figura 2. Meccanismo di inibizione del proteasoma.**

Gli inibitori del proteasoma sono farmaci che bloccano l'azione del proteasoma. (A) Il proteasoma 26S nelle cellule umane è composto da due complessi (19S) e da un core (20S) in cui avvengono le reazioni catalitiche. (B) Sezione dell'anello  $\beta$ . La funzione inibitoria principale è correlata al legame dei composti con il sito chimotripsinico nella subunità  $\beta$  della subunità principale 20S (Le linee blu indicano un'inibizione irreversibile, le linee rosse tratteggiate indicano un'inibizione reversibile) [Riprodotta dalla review di Romano et al., 2013].

I meccanismi coinvolti nella morte cellulare mediata dall'inibizione della subunità 20S del proteasoma non sono ancora stati completamente caratterizzati. Bortezomib produce diversi effetti biologici che includono:

- l'inibizione del ciclo cellulare,
- l'incremento del processo apoptotico attraverso la prevenzione della degradazione dei fattori pre-apoptotici,
- l'induzione dello stress del reticolo endoplasmatico,
- l'inibizione della secrezione di citochine,
- il blocco dell'espressione di molecole di adesione,
- l'inibizione della crescita tumorale, dell'angiogenesi e delle metastasi (Cao e Mao, 2011).

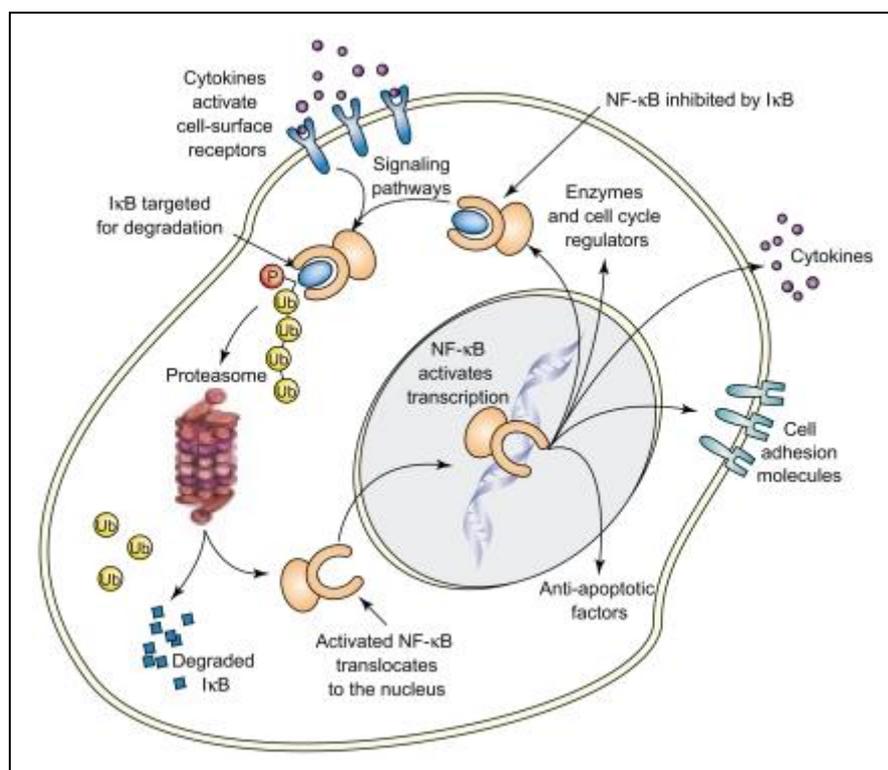
Gli studi sui possibili ruoli di bortezomib nell'induzione della morte cellulare sono stati focalizzati su tre pathways principali:

- ✓ inibizione del pathway di NF-kB (dall'inglese *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (fig.3);
- ✓ induzione della proteina pro-apoptotica NOXA e della sua interazione con l'oncogene c-myc (fig. 4);
- ✓ unfolded protein response (UPR) (fig. 5).

In principio l'utilizzo di bortezomib nella terapia antitumorale è stato basato sulla sua capacità di inibire il pathway molecolare di NF-kB. Tale pathway è regolato dalla proteina inibitoria IκB attraverso il blocco della trascrizione nucleare dell'eterodimero p50(NF-kB)7p65(RelA). Quando NF-kB non è legato a IκB è in grado di traslocare nel nucleo e attivare i geni NF-kB-correlati tra cui Interleuchina 6 (proteina che svolge sia una ruolo pro che anti-infiammatorio), molecole di adesione, fattori anti-apoptotici ed enzimi coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare (Hideshima et al, 2011).

Dal momento che IκB è degradato dal proteasoma e bortezomib è un inibitore del proteasoma stesso, dapprima il farmaco è stato considerato responsabile dell'inibizione della degradazione di IκB e quindi del successivo blocco dell'accesso di NFκB nel nucleo nel quale generalmente provvede all'innescò dei meccanismi di sopravvivenza e proliferazione. Per quanto questo meccanismo d'azione sia considerata l'ipotesi più popolare riguardo il meccanismo d'azione di bortezomib (Di Raimondo e Conticello, 2010), esistono alcuni dati che sembrerebbero contraddirla.

Innanzitutto l'inibitore del proteasoma PS-1145 che blocca selettivamente IκB, induce una debole inibizione della proliferazione delle plasmacellule rispetto a bortezomib, rendendo evidente un diverso meccanismo d'azione di quest' ultimo (Obeng et al., 2006; Conticello et al. 2011). Inoltre è stato dimostrato che le plasmacellule di pazienti con mieloma multiplo sia alla diagnosi che alla ricaduta presentano quasi esclusivamente la forma citoplasmatica inattiva di NFκB. In modo ancora più straordinario queste cellule presentano un'alta sensibilità a bortezomib a prescindere dalla localizzazione di NFκB suggerendo l'esistenza di altre molecole target di questo inibitore del proteasoma (Conticello et al., 2011). In ultimo, linee cellulari di mieloma multiplo e colture primarie da pazienti affetti dalla malattia subiscono un severo effetto citotossico da parte di bortezomib anche se attualmente il farmaco down-regola IκB e aumenta l'attività di NFκB (Hideshima et al., 2009).



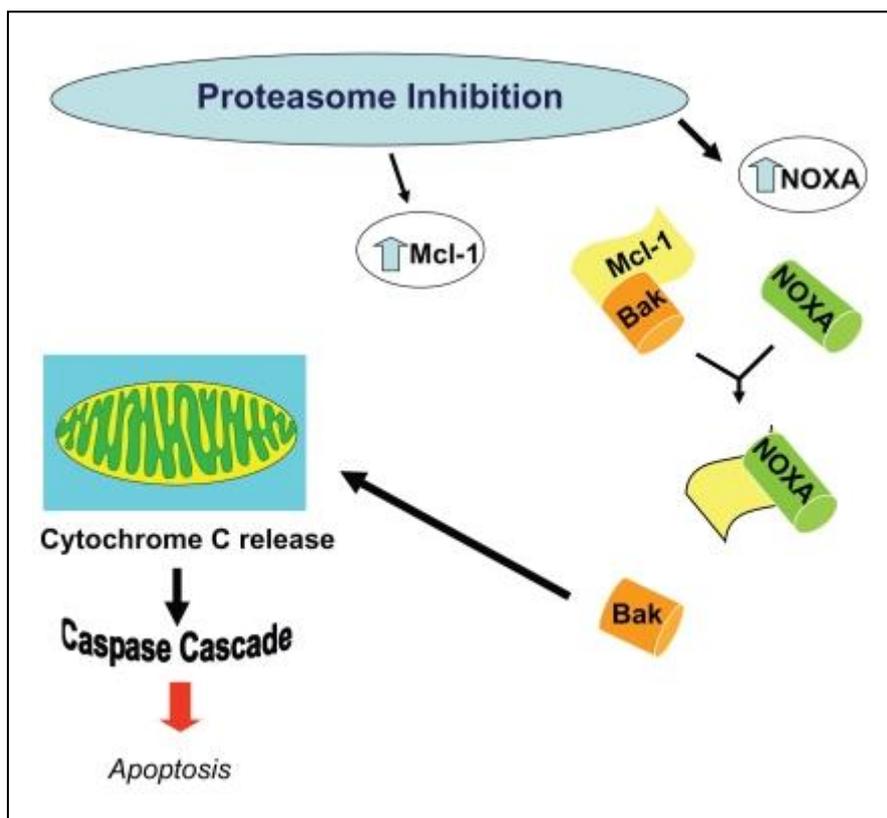
**Figura 3. Pathway di attivazione di NF-κB**

La proteina inibitoria I-κB quando si lega nel citoplasma a NF-κB lo rende inattivo. Diversi stimoli cellulari portano alla fosforilazione e all'ubiquitinazione di I-κB portandolo in tal modo all'attivazione della degradazione del proteasoma. Bortezomib, quale inibitore del proteasoma, aumenta l'inibizione di NF-κB indotta da I-κB con una conseguente inibizione della crescita tumorale. [Riprodotta da Adams J., 2003].

Bortezomib è in grado di innescare il meccanismo apoptotico dapprima inducendo il clivaggio del fattore anti-apoptotico Mcl-1 (dall'inglese *induced myeloid leukemia cell differentiation protein*) che porta all'aumento dei livelli di NOXA (inducendo la trascrizione e la sintesi proteica), poi determinando il clivaggio delle caspasi 3, 8 e 9 che sono deputate all'innescamento sia dei pathway intrinseci che estrinseci (riconoscimento del danno al DNA, induzione dei meccanismi di apoptosi) (Chari et al, 2010).

Linee cellulari di mieloma multiplo esposte a bortezomib *in vitro* hanno mostrato che livelli ridotti di Mcl-1 provocano l'aumento della suscettibilità solo alle proteine pro-apoptotiche BH3, coinvolgendo NOXA. Dall'altro lato bortezomib influenza direttamente sia la trascrizione che i livelli proteici di NOXA in maniera dose-dipendente, agendo così come un "sensibilizzatore apoptotico". Grazie all'aumento del complesso Mcl-1L-NOXA, alla concomitante riduzione del complesso Mcl-1-Bak e all'accumulo di NOXA libera, Bim (attivatore di BH-3) può essere sostituito dal complesso Mcl-1-Bim e portare all'attivazione di Bax-Bak, inducendo un'ulteriore innescamento dei meccanismi apoptotici (Gomez-Bougie et al., 2007). Esiste un'evidenza sperimentale *in vitro* per cui l'induzione di NOXA avviene

preferibilmente nelle cellule tumorali ed è collegata ai livelli di c-myc, poiché in assenza di c-myc (ottenuta grazie ad RNA interference) l'induzione di NOXA è annullata. Inoltre, l'attività trascrizionale di c-myc sui promotori di NOXA è favorita dal rimodellamento cromatinico che rappresenta le basi molecolari dell'aumento di interesse nel combinare bortezomib con gli inibitori dell'istone deacetilasi (enzima deputato alla deacetilazione di lisina e arginina) o dell'acetil trasferasi (enzima che catalizza il trasferimento di radicali acetilici da molecole donatrici quali l'acetilcoenzima A a recettori di varia natura) (Hideshima et al., 2011).



**Figura 4. Alterazione dei livelli di Mcl-1 e NOXA**

**L'inibizione del proteasoma aumenta i livelli del fattore pro-apoptotico NOXA che può prevalere sull'aumento concomitante del fattore anti-apoptotico Mcl-1 inducendo, così, l'attivazione delle caspasi e la conseguente apoptosi. [Riprodotta da Chari et al., 2010].**

Grazie all'inibizione del proteasoma, le proteine *misfolded* e ubiquitinate (immunoglobuline) non possono essere più processate e il pathway compensatorio per la sopravvivenza attivo nelle cellule di mieloma multiplo (conosciuto come UPR signaling), viene convertito in segnale pro-apoptotico. Dopo l'esposizione a bortezomib, vengono indotte molecole pro-apoptotiche come BiP, CHOP e XBP-1 che contribuiscono allo stress del reticolo endoplasmatico. Questo processo è stato studiato come meccanismo di resistenza a bortezomib poiché la presenza di un punto di mutazione in PSMB5 nelle linee cellulari di

mieloma multiplo può prevenire l'accumulo di proteine *misfolded* e poliubiquitinate che innescano lo stress del reticolo endoplasmatico annullando il processo apoptotico (Ruschak et al., 2011).

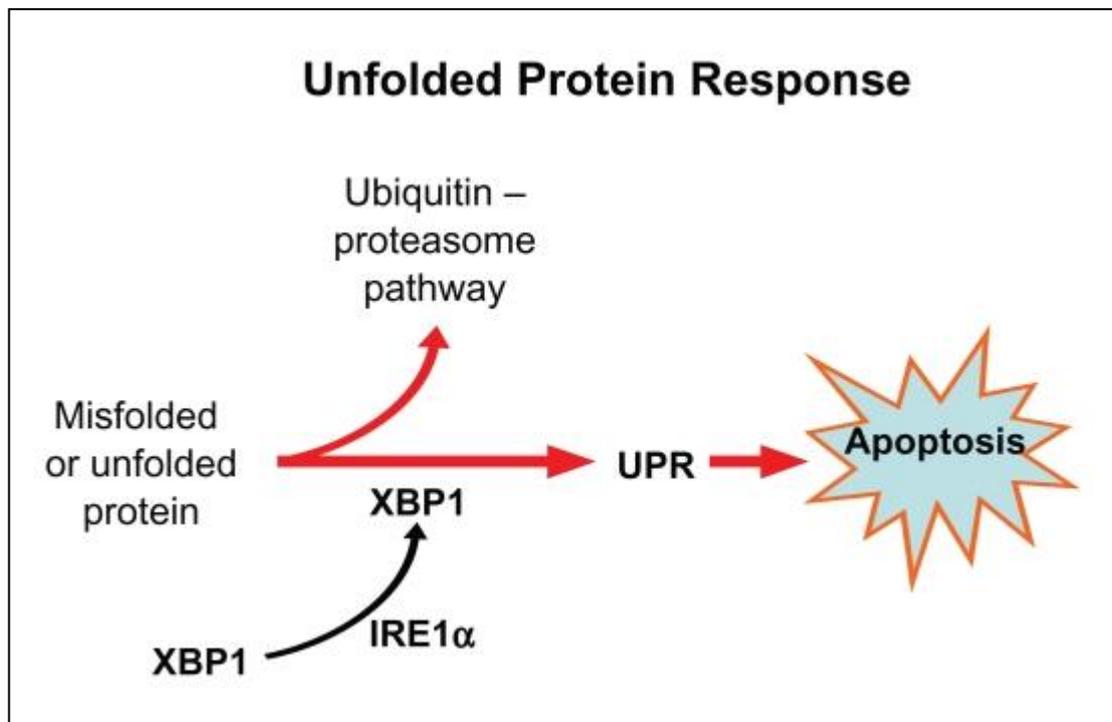


Figura 5. Unfolded Protein Response (UPR)

**Se ci sono proteine misfolded accumulate nel reticolo endoplasmatico, il meccanismo IRE1  $\alpha$  attiva il fattore di trascrizione XBP-1 attraverso la chinasi IRE1. XBP-1 a sua volta attiva UPR provocando l'innescio del processo apoptotico. [Riprodotta da Chari et al., 2010].**

Un altro processo fisiologico simile ad UPR, presente nelle plasmacellule di mieloma multiplo, è l'autofagia che si attiva in presenza di proteine *misfolded* come meccanismo per la sopravvivenza (Aronson e Davies, 2012). Un report recente ha evidenziato una connessione tra UPR, stress del reticolo endoplasmatico, il sistema di ubiquitinazione del proteasoma e autofagia, poiché bortezomib è in grado di indurre autofagia e stress del reticolo endoplasmatico nelle cellule di mieloma multiplo anche in presenza di BAF, un inibitore dell'autofagia (Kawaguchi et al., 2011). Questo dato è in contrasto con un report precedente nel quale, nonostante l'induzione dell'autofagia, bortezomib in combinazione con inibitori dell'autofagia non ottiene un effetto citotossico e presenta un effetto antagonista (Hoang et al., 2009).

Bortezomib agisce anche come inibitore dell'angiogenesi nel microambiente midollare, che svolge un ruolo chiave sia nella patogenesi del mieloma multiplo che nella progressione della malattia. Nei modelli in cui vengono utilizzate cellule endoteliali di pazienti con mieloma multiplo, il farmaco inibisce la proliferazione cellulare, la chemiotassi,

l'adesione e la formazione di capillari, supportando così l'attività di inibizione angiogenetica mostrata *in vivo*. Inoltre bortezomib inibisce l'espressione e la secrezione di diversi fattori pro-angiogenetici, incluso VEGF (dall'inglese *vascular endothelial growth factor*) (Roccaro et al., 2006, Romano et al., 2013).

Sono stati proposti ulteriori meccanismi d'azione di bortezomib, come l'aumento dell'espressione di proteine regolatrici del ciclo cellulare tra cui p21, p27 (inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti) e p53 (dall'inglese *tumor protein 53*), e l'aumento di concentrazioni intracellulari di alcune proteine specifiche pro-apoptotiche (Gareau et al., 2011).

Bortezomib sta emergendo come adiuvante nella terapia per aumentare la sensibilità delle cellule cancerogene all'azione di altri agenti tra cui il desametasone o gli inibitori della deacetilasi (Hideshima et al., 2011). Inoltre il suo impiego potrebbe essere utile nel superamento della resistenza all'apoptosi delle cellule midollari stromali conferita da IL-6 (interleuchina 6) o dalle cellule di adesione del mieloma multiplo (Chauhan et al., 2005).

I meccanismi che stanno alla base dell'inibizione del proteasoma dovuta a bortezomib non sono ancora stati completamente chiariti. Oltretutto, recentemente, sta emergendo un problema clinico rilevante costituito dalla resistenza innata e acquisita al farmaco.

### **3.2 Azione antineoplastica**

Nel 1995 l'Istituto Nazionale del Cancro ha dimostrato l'inibizione del proteasoma da parte di bortezomib, la sua selettività antitumorale e la sua efficacia (Boyd e Paull, 1995) attraverso analisi precliniche effettuate *in vitro* su 60 diverse linee cellulari derivate da tumori multipli (Adams et al., 1999) e in seguito comprovate da modelli di *xenotrapianto* in topi nudi, iniettati con tumori del colon, prostata umana e cancro al polmone (Teicher et al., 1999). Successivamente, studi di fase I hanno dimostrato l'efficacia di bortezomib nel trattamento del mieloma multiplo aprendo rapidamente la strada a trial di fase II e III volti a dimostrare la tollerabilità e l'attività di bortezomib come singolo agente nella malattia sia in forma recidiva che refrattaria (Aghajanian et al., 2002; Orłowski et al., 2002).

Gli studi di fase II SUMMIT (dall'inglese *Study of Uncontrolled Multiple Myeloma Managed with Proteasoma Inhibition Therapy*) e CREST (dall'inglese *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). Questi favorevoli risultati hanno portato, nel 2003, la FDA (Food and Drug Administration) americana ad approvare rapidamente l'uso clinico di bortezomib nelle fasi avanzate di mieloma multiplo seguita, nel 2004, dall'EMA (European Medicines Agency). Inizialmente l'uso del farmaco è stato consentito in pazienti che avessero ricevuto almeno due precedenti linee di terapia e che mostrassero progressione di malattia durante il loro ultimo ciclo di trattamento.

A seguito di questi studi è stato avviato un nuovo studio di fase III APEX (dall'inglese *Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions*) per comparare 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).

Studi successivi sono stati 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, dall'inglese *Velcade as Initial Standard Therapy in Multiple Myeloma: Assessment with Melphalan Prednisone*), in cui l'effetto sinergico di bortezomib è risultato molto più efficace sia in termini di rapidità di miglioramento che aumento della soglia di sopravvivenza (San Miguel et al., 2008). Più recentemente bortezomib è stato usato sempre come farmaco di prima linea per il mieloma, sia come singolo agente che in combinazione con terapie standard ed emergenti. Sulla base di questi incoraggianti risultati bortezomib è stato associato a desametasone e lenalidomide (Richardson et al., 2010). In questo studio di fase II (IFM 2008, dall'inglese *Frontline Therapy in de Novo Multiple Myeloma Patients Under 65*), il 100% dei pazienti ha risposto al trattamento farmacologico e ben il 57% di essi ha presentato una risposta completa. In un altro studio combinato bortezomib è stato associato a melfalan, prednisone e talidomide (trial di fase III GIMEMA, dall'inglese *Italian Myeloma Network*) e ha evidenziato una sopravvivenza libera da malattia dopo tre anni del 56% e una sopravvivenza globale dell'89% (Palumbo et al., 2010). Un'ulteriore associazione presa in considerazione è stata quella di bortezomib, desametasone, ciclofosfamide e lenalidomide (trial di fase II EVOLUTION) che non ha mostrato una differenza significativa rispetto alla combinazione dei tre farmaci utilizzati nel trial IFM 2008, ma una maggiore tossicità (Kumar 2012).

Nel 2008, a seguito dei promettenti risultati ottenuti nei trials clinici, la FDA ha approvato l'utilizzo di bortezomib nel trattamento iniziale del mieloma multiplo.

La dose di somministrazione iniziale raccomandata di bortezomib è pari a 1,3 mg/m<sup>2</sup> dell'area di superficie corporea da somministrare, due volte la settimana, per due 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 del farmaco devono trascorrere almeno 72 ore per permettere il recupero della funzione del proteasoma nei tessuti sani (Aghajanian et al, 2002).

### **3.3 Azione neurotossica**

Sebbene l'efficacia antitumorale di bortezomib sia comprovata, la sua somministrazione cronica ha evidenziato l'insorgenza di diversi effetti collaterali tra cui astenia, nausea, vomito e diarrea, trombocitopenia, anemia, ma soprattutto un'importante neuropatia periferica dose-dipendente spesso accompagnata anche da dolore neuropatico (Jagannath et al, 2004; Kondagunta et al, 2004; Richardson et al, 2006).

L'insorgenza di neuropatia periferica (di tipo prevalentemente sensitivo) rappresenta il principale effetto collaterale dovuto al trattamento con il farmaco e rappresenta, quindi il fattore dose-limitante il suo impiego in clinica (Jagannath et al, 2004; Kondagunta et al, 2004; Cavaletti e Nobile-Orazio, 2007). Una percentuale superiore al 70% dei pazienti che hanno manifestato una neuropatia periferica correlata al trattamento, risultava precedentemente trattato con agenti neurotossici e più dell'80% di questi aveva mostrato segni o sintomi di una neuropatia periferica alla valutazione basale.

È probabile che i pazienti con sintomi e/o segni preesistenti di neuropatia periferica (dolore, parestesia, bruciore, con il distretto distale più colpito rispetto a quello prossimale) manifestino un peggioramento durante il trattamento con il farmaco. L'incidenza di neuropatia periferica è elevata già dalla fase iniziale del trattamento e raggiunge il picco al 5° ciclo.

Nei pazienti colpiti da una neuropatia grave, che hanno richiesto un ciclo di trattamento discontinuo, i sintomi sono scomparsi o si sono alleviati nel 37% del totale dei casi durante il trattamento; tuttavia, il resto dei pazienti ha continuato a mostrare deficit neuropatici durante il trattamento discontinuo o a termine di esso. Per i pazienti che hanno riportato un miglioramento o la completa risoluzione dei sintomi neuropatici dopo il termine del trattamento, il tempo medio di risoluzione è stato di 47 giorni dall'ultima dose di bortezomib ricevuta, con un intervallo temporale, tuttavia, caratterizzato da una variabilità elevata (1-529 giorni).

In uno studio successivo, pazienti che avevano beneficiato dell'uso di bortezomib con un protocollo di trattamento di 8 cicli, cioè 24 settimane, hanno raddoppiato il tempo di esposizione al chemioterapico; a termine delle successive 24 settimane, dopo una prolungata

esposizione dei pazienti al farmaco, non si è riscontrata la presenza di una tossicità sistemica, o di una neuropatia periferica, di tipo cumulativo o permanente (Jagannath et al, 2004).

L'insorgenza di gravi forme di neuropatia periferica indotta da bortezomib potrebbe essere prevenuta attraverso la diagnosi precoce e la correzione del dosaggio farmacologico; tuttavia, i pazienti dovrebbero essere strettamente monitorati o istruiti a riferire la comparsa di nuovi sintomi neuropatici o il peggioramento di quelli preesistenti, come l'aumento della sensibilità al dolore o sensazioni d'intorpidimento.

In caso di severa neuropatia è richiesta la modifica della dose utilizzata o addirittura l'interruzione del trattamento stesso (Tabella 1).

<b>Severità della neuropatia</b>	<b>Aggiustamento della posologia</b>
<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 e che porta a paralisi) e/o grave neuropatia autonoma	Interruzione del trattamento con bortezomib

**Tabella (1): Modifiche delle dosi raccomandate (basato sulle modifiche delle dosi negli studi clinici di fase II condotti sul mieloma multiplo) in caso di dolore neuropatico e/o di neuropatia sensoriale periferica correlato alla somministrazione di bortezomib (da Millennium Pharmaceuticals).**

### **3.4 Modelli in vivo di neuropatia periferica**

Al fine di meglio caratterizzare gli effetti tossici di bortezomib sul SNP, negli ultimi anni sono stati messi a punto specifici modelli animali in grado di riprodurre efficacemente i danni riscontrati nella pratica clinica.

Cavaletti e colleghi nel 2007 hanno messo a punto il primo modello di neuropatia periferica da bortezomib nel ratto (Cavaletti et al., 2007a). Ratti Wistar femmine 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 maniera dose-dipendente già dopo 2 settimane di somministrazione. A livello morfologico è stata osservata una demielinizzazione del nervo sciatico: il target preferenziale di bortezomib sembrano infatti essere le cellule di Schwann nelle fibre nervose periferiche e le cellule satelliti nel ganglio della radice dorsale (DRG) (Cavaletti et al., 2007a). Nel 2010 il gruppo di Meregalli e collaboratori (Meregalli et al., 2010) ha sviluppato un modello in cui ratti Wistar sono stati trattati per via endovenosa con bortezomib 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 concordanti con quelli del 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 riscontrati danni a carico dei DRG contrariamente a quanto messo in luce nel modello precedente. Tale differenza potrebbe essere motivabile secondo l'ipotesi per cui esistono alcuni meccanismi compensatori messi in atto dalla cellula per contrastare l'inibizione cronica del proteasoma ad opera di bortezomib (Fuchs et al., 2008). Inoltre, 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, allo scopo di caratterizzare le alterazioni nucleari nei neuroni dei DRG indotte dal trattamento con bortezomib è stato riprodotto un altro modello di citotossicità (Casafont et al., 2010). In questo studio ratti Sprague-Dawley sono stati trattati per via endovenosa 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. Tale modello mette in luce 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 (Casafont et al., 2009).

Bruna e colleghi (Bruna et al., 2010) hanno sviluppato il primo modello murino di neuropatia periferica da bortezomib con lo scopo di analizzare le alterazioni elettrofisiologiche, funzionali ed istologiche. In questo studio topi femmina Swiss 0F1 sono stati trattati con ripetute somministrazioni sottocutanee di bortezomib alla dose di 1 mg/kg due volte a settimana per 6 settimane, seguite 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).

Sempre nel 2010 presso il nostro laboratorio è stato messo a punto un modello di neuropatia periferica da chemioterapici in previsione di uno studio combinato dell'attività antineoplastica e della neurotossicità di bortezomib, nello stesso contesto animale. In questo studio topi femmine Balb/c sono stati trattati con 4 diversi chemioterapici: cisplatino, paclitaxel, epotilone b e bortezomib; quest'ultimo è stato somministrato alla dose di 0.4 e 0.8 mg/kg 2 volte a settimana per 4 settimane. La valutazione istopatologica, neurofisiologica e comportamentale è riportata nella sezione "*Risultati*" (Esperimento 1) (Carozzi et al., 2010).

## **4. MIELOMA MULTIPLO**

Il mieloma multiplo, nota anche come *malattia di Kahler-Bozzolo*, rappresenta il secondo tumore ematologico più comune e costituisce il 10-15% di tutti i tumori ematologici; è responsabile del 15-20% delle morti dovute a tali tumori e di circa il 2% di tutti i decessi provocati dal cancro (International Myeloma Working Group, 2003).

Sebbene il mieloma multiplo rimanga un tumore incurabile, la sopravvivenza è in aumento e i pazienti recentemente diagnosticati sono proiettati verso un'aspettativa di vita intorno ai cinque anni (Bergsagel et al., 2013).

### **4.1 Eziologia**

Il mieloma multiplo è una neoplasia sostenuta dalla proliferazione di un clone neoplastico di natura plasmacellulare. In particolare, le plasmacellule neoplastiche si accumulano nel midollo osseo e producono una proteina monoclonale che viene rilevata nel sangue o nelle urine (o in entrambi) e che causa un danno tissutale o un danno d'organo (Smith e Yong, 2013). Studi epidemiologici suggeriscono che questo sia preceduto da una gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS) quale condizione asintomatica progressiva.

Generalmente la malattia colpisce persone la cui media d'età alla diagnosi è di circa 70 anni, sebbene l'età non costituisca un fattore rilevante poiché il 15% dei casi è diagnosticato in pazienti al di sotto dei 60 anni e il 2% al di sotto dei 40 anni (Bergsagel et al., 2013).

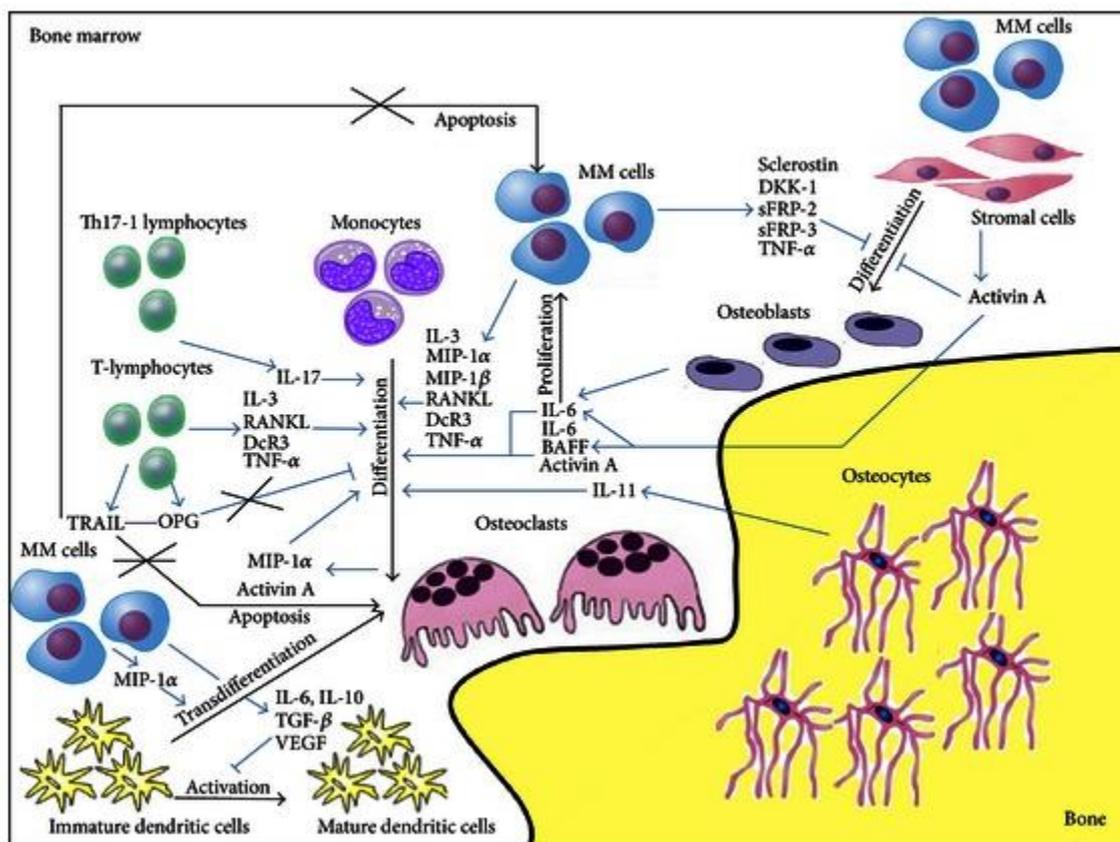
## 4.2 Patogenesi

Anomalie genetiche che si verificano durante la fase terminale del differenziamento dei linfociti B in plasmacellule sembrano essere responsabili dell'insorgenza del mieloma multiplo. Nella metà dei casi clinici avviene una traslocazione cromosomica che provoca l'inserimento di un oncogene nel gene per la catena pesante delle immunoglobuline sul cromosoma 14 (traslocazione IgH); questo porta all'overespressione dell'oncogene e alla proliferazione cellulare sregolata. L'altra metà dei casi di mieloma multiplo è caratterizzata dalla trisomia di diversi cromosomi quali il 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21. La presenza di queste numerose trisomie viene definita iperdiploidia. Dopo l'insorgenza del mieloma possono verificarsi ulteriori anomalie genetiche, quali la mutazione di RAS (dall'inglese *Rat Sarcoma*) (Bochtler et al., 2008).

Il midollo osseo dei pazienti con mieloma multiplo contiene plasmacellule cancerose che, direttamente attraverso la produzione di citochine e indirettamente stimolando la secrezione cellulare di altri fattori, contribuiscono allo sbilanciamento tra il riassorbimento osseo e la sua formazione, portando allo sviluppo di lesioni osteolitiche. Le cellule mielomatose provocano un aumento della produzione di fattori che attivano gli osteoclasti e di citochine che inibiscono il differenziamento osteoblastico. Il rimodellamento sbilanciato del midollo osseo è dovuto ad un'aumentata attività degli osteoclasti associata a una riduzione della funzione degli osteoblasti. Tra i fattori coinvolti nell'attivazione degli osteoclasti è stato dimostrato che le plasmacellule cancerose producono il recettore del fattore di necrosi tumorale 6B (noto anche come *decoy receptor 3*, DcR3), IL-3 (interleuchina-3), MIP-1 $\alpha$  (dall'inglese *macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), MIP-1 $\beta$  (dall'inglese *macrophage inflammatory protein-1 $\beta$* ) e TNF- $\alpha$  (dall'inglese *tumor necrosis factor- $\alpha$* ). L'osteolisi incontrastata è anche responsabile dell'ipercalemia (Oranger et al., 2013; Smith e Yong, 2013) (fig. 6). La crescita e la sopravvivenza delle cellule mielomatose dipendono da diversi tipi cellulari quali fibroblasti, osteoblasti, osteoclasti, cellule stromali e cellule dendritiche, questo è il motivo per cui sono stati sviluppati trattamenti clinici il cui target è il microambiente midollare.

Nella maggior parte dei casi le plasmacellule cancerose producono un' immunoglobulina monoclonale, tipicamente IgG o IgA e anche una varietà di catene leggere libere monoclonali. Circa il 20% dei pazienti con mieloma multiplo producono solo catene leggere nel siero e nelle urine, mentre circa il 2% non produce né le catene leggere, né la paraproteina. Le catene leggere sono filtrate nei glomeruli e riassorbite nei tubuli prossimali, ma quando viene oltrepassata la capacità di riassorbimento, esse precipitano nei tubuli distali provocando ostruzione tubulare e infiammazione tubulo-interstiziale portando così a danno renale. Le

nefropatie causano il 90% dei casi di insufficienza renale nel mieloma; altre cause includono deposito di sostanza amiloide, disidratazione, ipercalcemia, iperviscosità, farmaci nefrotossici.



**Figura 6.** Interazione tra le cellule ossee e le cellule dell'ambiente midollare a sostegno della sopravvivenza delle plasmacellule cancerose e delle lesioni ossee nei pazienti con mieloma multiplo.

Le cellule mielomatose possono supportare direttamente la formazione di osteoclasti e la loro attività, così come inibire la differenziazione osteoblastica attraverso il rilascio di numerose citochine. Inoltre, le cellule ossee possono secernere altre molecole che interagiscono con molecole dell'ambiente midollare, supportando la progressione del mieloma multiplo e lo sviluppo di patologie ossee ad esso associate. [Riprodotta da Oranger et al., 2013].

### 4.3 Sintomatologia

Il mieloma multiplo si manifesta comunemente con anemia (osservata nel 75% dei pazienti alla diagnosi), ipercalcemia (30%), insufficienza renale (25%) e patologie ossee (70%) (Bird et al., 2011). Le manifestazioni ossee possono presentarsi come lesioni litiche dolorose, fratture da compressione vertebrale e fratture delle ossa lunghe. Ipercalcemia, crisi renale acuta e compressione midollare rappresentano emergenze mediche per cui una diagnosi immediata e un trattamento tempestivo sono di vitale importanza per minimizzare danni d'organo a lungo termine. Valori eccessivi di paraproteina possono causare sintomi di iperviscosità (mal di testa, epistassi, vista offuscata e confusione), mentre la riduzione

dell'immunità umorale provoca infezioni batteriche ricorrenti. Il 30% dei casi di mieloma multiplo viene diagnosticato dopo la scoperta casuale dell'aumento dell'indice di sedimentazione eritrocitaria, delle proteine totali o delle immunoglobuline (Oranger et al., 2013). I sintomi spesso sono aspecifici e possono ritardare la diagnosi; infatti un report di qualche anno fa mostra che il 56% dei pazienti ha atteso sei mesi prima di consultare un ematologo (Kariyawasan et al., 2007). Un terzo dei casi di mieloma multiplo viene diagnosticato in condizioni di emergenza e tali pazienti hanno una prognosi peggiore (51% di sopravvivenza a un anno rispetto all' 82%) (National Cancer Intelligence Network, 2012).

#### **4.4 Diagnosi e fattori prognostici**

L' *International Myeloma Working Group* ha stabilito i criteri diagnostici per discriminare il mieloma multiplo, il mieloma asintomatico e la MGUS (Palumbo et al., 2009). Quest'ultima è diagnosticata quando l'infiltrazione cellulare nel plasma e la concentrazione di proteine sono basse e i pazienti non mostrano segni tipici del mieloma quali ipercalcemia, insufficienza renale, anemia o lesioni ossee. I soggetti affetti da MGUS hanno l'1% di chance di progredire verso il mieloma entro l'anno.

Quando la concentrazione di plasmacellule o di proteine monoclonali è alta, ma non sono evidenti danni tissutali o d'organo, ci si trova in una condizione di mieloma asintomatico: i soggetti affetti da questa patologia hanno il 10% di chance di progredire verso il mieloma sintomatico ogni anno (Bird et al., 2011).

Il sospetto clinico di mieloma, combinato con la presenza di uno o più fattori tra cui anemia, insufficienza renale, ipercalcemia, lesioni litiche o rilevazione di paraproteina porta alla richiesta di un consulto ematologico. Un'indagine scheletrica approfondita è necessaria per determinare l'entità della patologia a livello osseo.

Sebbene l'introduzione di nuove terapie abbia trasformato le aspettative di vita di molti pazienti, il mieloma multiplo viene considerato una patologia eterogenea.

Sono state definite tre categorie di rischio basate sulle concentrazioni di microglobulina  $\beta_2$  e albumina nel siero (Greipp et al., 2005).

Alterazioni genetiche specifiche sono associate a una prognosi peggiore (Bergsagel et al., 2013). La traslocazione IgH che coinvolge i cromosomi 4 e 16, t(4;14) e t(14;16), sono considerate ad alto rischio e sono associate a un esito peggiore. Il *tumor suppressor gene* p53 è localizzato sul braccio corto del cromosoma 17 e la sua delezione è legata a una prognosi

negativa. I pazienti con una traslocazione IgH t(11;14) o t(6;14) sono considerati soggetti con un rischio ordinario così come i pazienti con iperdiploidia (Smith e Yong, 2013).

#### **4.5 Terapia ed effetti collaterali**

L'ultima decade è stata caratterizzata da un avanzamento senza precedenti nella cura del mieloma multiplo sintomatico con l'introduzione di nuovi farmaci quali bortezomib (un inibitore del proteasoma), talidomide e lenalidomide (farmaci immunomodulatori). Questi composti rappresentano ad oggi il pilastro su cui si basa il trattamento contro tale patologia. Molti dei pazienti rispondono alla prima terapia ed entrano in un periodo di stabilità generalmente associata a una buona qualità di vita (Cavo et al., 2011). L'assenza di farmaci curativi rende inevitabile la ricaduta, ma almeno il 50% dei pazienti risponde una seconda volta al trattamento chemioterapico sia con gli stessi farmaci che con altri. Ulteriori ricadute diventano meno responsive ai trattamenti fino a che lo stadio di malattia refrattario porta a manifestazioni extramidollari e citopenia.

L'approccio al trattamento dei pazienti alla diagnosi dipende sia dall'età che dalla comorbidità. Il regime chemioterapico iniziale permette di ottenere una risposta più profonda con una tossicità inferiore e, per i pazienti che sono giovani (generalmente al di sotto dei 65 anni) e in salute, questo viene consolidato da alte dosi di trattamento chemioterapico e trapianto autologo di cellule staminali. Pazienti più anziani, o quelli che presentano una seria comorbidità e che non godono di buona salute per sostenere un trapianto autologo, sono sottoposti esclusivamente alla chemioterapia. La risposta al trattamento è classificata in base alla riduzione delle paraproteine o delle catene leggere (Smith e Yong, 2013).

I diversi trattamenti chemioterapici presentano una serie di effetti collaterali. Nello specifico, i corticosteroidi sono responsabili di disturbi gastrointestinali, iperglicemia, immunosoppressione, insonnia e sbalzi d'umore. Gli agenti alchilanti (ciclofosfamide e melfalan) provocano nausea e mielosoppressione. La talidomide causa costipazione, sonnolenza, neuropatia periferica sensitivo-motoria, neuropatia autonoma, bradicardia, alterazione della funzione tiroidea, aumento del rischio trombotico. Bortezomib è responsabile dell'insorgenza di neuropatia sensitiva potenzialmente dolorosa, neuropatia autonoma, trombocitopenia e riattivazione del virus della *varicella zoster*. Infine, la lenalidomide causa costipazione, affaticamento, mielosoppressione e aumento del rischio trombotico (Smith e Yong, 2013).

#### 4.6 Modelli in vivo di mieloma multiplo

Ad oggi, un buon numero di modelli animali di mieloma multiplo viene utilizzato per studiare la patologia e l'efficacia dei trattamenti terapeutici al fine di accelerare il processo di sviluppo farmacologico.

Nel 1979 il gruppo di Radl e colleghi (Radl et al., 1979) ha messo a punto un modello murino di Paraproteinemia Idipoiatica (IP) al fine di valutarne l'eziologia, la patogenesi e la relazione con lo sviluppo del mieloma multiplo. Al fine di verificare se tale patologia fosse determinata da fattori intrinseci oppure estrinseci del sistema immunitario, cellule della milza ( $8-10 \times 10^8$ ) e/o del midollo osseo ( $2-5 \times 10^8$ ) di topi maschi anziani C57BL affetti da IP sono state inoculate per via endovenosa in topi maschi dello stesso ceppo di tre mesi di età. Animali inoculati con cellule di animali non affetti da IP e di animali affetti da disordini linforeticolari maligni sono stati usati come controllo. Metà degli animali sono stati irradiati 6 ore prima del trapianto cellulare ad una dose di irradiazione pari a 750 rad (dall'inglese *radiation absorbed dose*). I campioni di sangue sono stati prelevati mensilmente fino a 6 mesi dopo il trapianto e successivamente ogni 3 mesi fino al sacrificio dell'animale. Il periodo di latenza prima che la paraproteina originale fosse rilevata nel siero dei riceventi è variato tra 1 e 9 mesi dopo il trapianto; la frequenza si è ridotta gradualmente con i successivi trapianti. La diffusione della IP per 3 o 4 generazioni sembra costituire il limite finale della proliferazione; al contrario le cellule trapiantate da topi con linfoma a cellule B o mieloma portano alla propagazione continua della malattia con un'alta frequenza, uno sviluppo progressivo di IP e una sopravvivenza più breve degli animali riceventi. Questi risultati hanno indicato che IP rappresenta, nel suo stadio finale, un difetto cellulare intrinseco al clone delle cellule B interessato che, tuttavia, risulta diverso da quello riscontrato nelle neoplasie a cellule B (Radl et al., 1979).

Il primo tentativo di mettere a punto un modello murino di mieloma multiplo è stato fatto nel 1992 da Feo-Zuppari e colleghi (Feo-Zuppari et al., 1992). In questo studio cellule di mieloma multiplo, altamente purificate, prelevate dal midollo osseo di pazienti sono state inoculate ( $2,8-10 \times 10^6$ ) in topi Scid e per più di 299 giorni è stata documentata la secrezione di immunoglobuline monoclonali umane (HuIgs). La monoclonalità delle HuIgs circolanti è stata dimostrata solo nel caso in cui le cellule di mieloma sono state inoculate intraperitonealmente; al contrario l'inoculo di frammenti di midollo ha portato allo sviluppo di HuIgs policlonali. I criteri per stabilire l'attecchimento del mieloma includono la presenza prolungata di HuIgs monoclonali nel siero degli animali inoculati e/o la rilevazione di cellule di mieloma umano nei tessuti attraverso l'utilizzo di analisi immunoistochimiche. In questo

lavoro le cellule purificate di mieloma hanno attecchito nel 69% dei topi sviluppando Ig umane, la monoclonalità è stata riscontrata nel 54% degli animali, il 44% ha manifestato a livello biochimico l'innesto di cellule B umane, ma solo il 33% ha soddisfatto i criteri per stabilire l'attecchimento del mieloma. Studi istopatologici hanno mostrato che la maggior parte delle plasmacellule umane sono localizzate nella cavità peritoneale, mentre gli infiltrati metastatici sono stati trovati anche in altri organi nel 69% dei casi. In conclusione, questo modello chimerico sembrerebbe fornire un valido strumento per la caratterizzazione della modulazione della crescita tumorale e delle interazioni del microambiente e anche per lo studio di nuovi approcci terapeutici al mieloma multiplo (Feo-Zuppari et al., 1992).

Nello stesso anno il gruppo di Suzuki (Suzuki et al., 1992) ha messo a punto un modello in cui la linea cellulare di mieloma multiplo umano S6B45 è stata inoculata per via sottocutanea ( $1 \times 10^7$ ) in topi Scid per valutare l'effetto di IL-6 (interleuchina 6) e del suo recettore sulla crescita tumorale. È stato dimostrato il ruolo di inibitore della crescita tumorale sia di IL-6 che del suo recettore (Suzuki et al., 1992).

Dal momento che fino al 1993 è stato difficoltoso ottenere lo xenotrapianto di cellule umane di mieloma multiplo in topi atimici, Tong e collaboratori (Tong et al., 1993) hanno deciso di esaminare se fosse possibile la crescita tumorale del mieloma multiplo umano in topi Scid grazie all'iniezione sottocute di  $1-2 \times 10^7$  cellule della linea RPMI 8226 (dall'inglese *multiple myeloma cell line*) e ARH-77 (dall'inglese *plasma cell leukemia*). Nel 67% degli animali inoculati con RPMI 8226 e nel 100% di quelli inoculati con ARH-77 si è sviluppata una massa tumorale tra i 19 e i 35 mm di diametro in un periodo di latenza compreso tra i 9 e i 54 giorni dopo l'inoculo. La conferma dell'attecchimento di entrambe le linee cellulari è stata data dall'ibridazione positiva del DNA tumorale primario con la sonda genomica umana Alu (dal latino *Arthrobacter luteus*). Lo xenotrapianto della linea RPMI 8226 comprende cellule plasmacitoidi che esprimono in maniera predominante isotipi delle catene leggere di immunoglobuline citoplasmatiche rilevanti; inoltre le cellule RPMI 8226 esprimono CD10 (marker delle cellule stromali endometriali, 44% delle cellule reattive), CD38 (marker di adesione cellulare, 69% delle cellule reattive), CD5 (marker dei linfociti B1, 49% delle cellule reattive) e sono reattive all'anticorpo monoclonale MM4 (39% delle cellule reattive). La crescita della massa tumorale umana è stata localizzata a livello sottocutaneo in entrambi i casi e non sono state rilevate metastasi renali, cerebrali, cardiache e midollari. Analisi del DNA e immunofenotipiche hanno mostrato che l'origine degli infiltrati osservati nella milza, nei polmoni e nel tratto gastrointestinale sono dovute al soggetto portatore del tumore. Sia le cellule originali della linea RPMI 8226 che i topi trapiantati non hanno espresso sequenze

genomiche del virus Epstein Barr (EBV): questa osservazione indica che la linea cellulare RPMI 8226 può essere trapiantata con successo in topi Scid (Tong et al., 1993).

Alsina e colleghi nel 1996 (Alsina et al., 1996) hanno deciso di utilizzare la linea cellulare ARH-77 per sviluppare un modello di mieloma e valutare i meccanismi coinvolti nell'osteolisi. Topi femmine Scid precedentemente irradiati ad una dose di 400 rad, sono stati inoculati dopo 24 ore, per via endovenosa nella coda, con  $10^6$  cellule della linea ARH-77. Con l'ausilio dell'analisi dei livelli di calcio ionizzato nel sangue, raggi x e l'analisi istologica è stato verificato lo sviluppo del danno osseo. Tutti gli animali inoculati hanno sviluppato paralisi degli arti inferiori tra i 28 e i 35 giorni dopo l'inoculo e hanno sviluppato ipercalcemia in media 5 giorni dopo la comparsa della paraplegia. I raggi x hanno evidenziato in tutti gli animali trattati la comparsa di lesioni osteolitiche a differenza degli animali di controllo. L'analisi istologica ha messo in luce la presenza di infiltrati di cellule mielomatose nel fegato, nella milza, nelle vertebre e nelle ossa lunghe con perdita delle trabecole ossee e aumento del numero di osteoclasti. Nel plasma midollare e nel siero i livelli di IL-6, IL-1 (interleuchina 1) e TGF $\alpha$  (dall'inglese *transforming growth factor alpha*) sono risultati bassi se comparati a quelli rilevati nei controlli nonostante le cellule ARH-77 producano *in vitro* IL-6. L'utilità di questo modello dovrebbe essere quella di permettere lo studio della patogenesi della distruzione ossea dovuta all'insorgenza di mieloma multiplo (Alsina et al., 1996).

L'anno seguente il team di Tsunenari (Tsunenari et al., 1997) ha messo a punto un modello di mieloma multiplo per valutare il ruolo di IL-6 nella patologia e la tumorigenesi delle cellule KPMM2. Topi maschi Scid sono stati inoculati nel fianco con  $10^7$  cellule della linea KPMM2 e hanno sviluppato un tumore solido entro due settimane. Topi maschi Scid sono stati inoculati per via endovenosa con  $3 \times 10^6$  cellule: il tumore si è sviluppato in tutti gli animali ed è stato localizzato prevalentemente nel midollo osseo. Cellule tumorali sono state rilevate anche nei linfonodi, ma non in altri organi. L'immunomarcatura con CD38 ha evidenziato che il 40% delle cellule midollari nel femore era di origine mielomatosa in stadio avanzato. L'analisi istologica ha messo in luce la presenza di un numero consistente di plasmablasti nel midollo osseo e lo sviluppo di lesioni osteolitiche in siti multipli. Contemporaneamente sono stati osservati sia la riduzione della densità ossea in ogni distretto corporeo che un aumento significativo dei livelli di calcio plasmatico. La proteina M (correlata alla progressione tumorale) è stata rilevata nel siero entro 10 giorni dopo il trapianto. Tra il trentesimo e il quarantesimo giorno dopo l'inoculo, i topi presentavano una severa e rapida perdita del peso corporeo, paralisi degli arti inferiori e affaticamento con conseguente morte entro una settimana. Una singola somministrazione per via endovenosa di 0,2mg di hPM1 (anticorpo

anti-recettore per IL-6) il giorno dopo il trapianto ha sostanzialmente evitato l'aumento delle proteine M nel siero e lo sviluppo di anomalie associate al tumore; inoltre ha significativamente aumentato l'aspettativa di vita degli animali portatori di mieloma. Questi dati hanno mostrato l'utilità di questo modello per l'analisi del ruolo patologico di IL-6 nel mieloma multiplo (Tsunenari et al., 1997).

Una delle ragioni per cui non è stato così semplice mettere a punto un modello di mieloma multiplo in topi Scid risiede nell'incapacità di crescita delle cellule mielomatose in assenza di citochine che attivino gp130, il trasduttore di IL-6. Un'altra difficoltà è rappresentata dal fatto che IL-6 umana si lega a IL-6 murina attivando il trasduttore murino gp130: da ciò consegue la comparsa di tossicità associata a IL-6 (infiammazione e sindrome cachettica) (Gadò et al., 2001).

Poiché le citochine murine non sono in grado di attivare il trasduttore umano gp130, nel 1998 Rebouissou e collaboratori (Rebouissou et al., 1998) hanno sviluppato un modello di mieloma multiplo umano tenendo conto della dipendenza da gp130 per la crescita e cercando di evitare la comparsa di tossicità associata a IL-6. Topi Scid sono stati inoculati intraperitonealmente con  $50 \times 10^6$  di cellule di mieloma multiplo umano. In questo studio la crescita cellulare è stata favorita dall'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-trasduttore gp130 umano: l'anticorpo oltre a non legarsi a gp130 murino, ha evitato la comparsa di tossicità indotta generalmente da IL-6. L'utilizzo di tale anticorpo ha reso possibile la crescita *in vivo* di cellule mielomatose umane esogene dipendenti da IL-6. La comparsa della massa tumorale è avvenuta in un periodo compreso tra la quarta e la decima settimana successiva all'impianto con la presenza di metastasi al fegato, pancreas, milza e midollo osseo. Le cellule tumorali attecchite nei topi Scid hanno mostrato il fenotipo caratteristico delle cellule originali dimostrando che per la crescita *in vitro* è richiesta la presenza di IL-6 o dell'agonista anti-gp130 (Rebouissou et al., 1998).

Al fine di rilevare i siti di lesione e la loro progressione in fase di malattia, Mitsiades e colleghi nel 2003 hanno messo a punto un modello di mieloma multiplo in cui topi SCID/NOD sono stati prima irradiati ad una dose di 300 rad e dopo 24 ore inoculati per via endovenosa con  $5 \times 10^6$  cellule della linea RPMI 8226 transfettate stabilmente con GFP (dall'inglese *green fluorescent protein*). Attraverso analisi di *imaging*, istologiche e di citofluorimetria a flusso sono stati monitorati lo sviluppo e la progressione tumorale. La distribuzione anatomica e le manifestazioni patofisiologiche sono risultate coerenti con quello che avviene in clinica (coinvolgimento dello scheletro assiale, sviluppo di paralisi secondaria a lesioni spinali senza una significativa diffusione a polmoni, fegato, milza e reni). Questo

modello è risultato utile per riassumere la diffusione ossea della patologia e la sua progressione. Inoltre potrebbe permettere di chiarire i meccanismi molecolari che stanno alla base dell'insorgenza dell'osteotropismo del mieloma multiplo e di valutare *in vivo* l'attività di nuovi approcci terapeutici (Mitsiades et al., 2003).

L'anno seguente nel laboratorio di Miyakawa (Miyakawa et al., 2004) è stato sviluppato un modello in cui topi NOD/SCID/ $\gamma_c^{\text{null}}$  (NOG), CB17Scid e NOD/SCID sono stati inoculati per via endovenosa con  $2 \times 10^6$  cellule della linea cellulare di mieloma U266 previa irradiazione alla dose di 2,4 Gy (dall'inglese *Gray*). Tutti i topi NOG hanno sviluppato paralisi degli arti inferiori e sindrome da distress circa 6 settimane dopo il trapianto; inoltre studi istopatologici hanno evidenziato la presenza di infiltrati nel midollo osseo. Al contrario, non sono state rilevate cellule U266 nei topi CB17Scid e tantomeno nei NOD/SCID. Il test enzimatico ELISA (dall'inglese *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) ha messo in luce la presenza di IgE umane nel siero dei topi NOG: questo risultato indica che il modello di mieloma multiplo in animali NOG potrebbe essere utile per lo studio della patogenesi del mieloma e delle lesioni osteolitiche correlate, oltre che potrebbe essere valido per lo studio di nuovi approcci farmacologici (Miyakawa et al., 2004).

Da ultimo, nel 2013, il gruppo di Fryer (Fryer et al., 2013) ha deciso di mettere a punto un modello di mieloma multiplo che riassume le condizioni che si manifestano in clinica. La peculiarità di un modello simile deve essere la rapidità di progressione dopo l'inoculo oltre alla presenza di markers per monitorare la malattia durante il trattamento. Pertanto topi NOD/SCID/ $\gamma_c^{\text{null}}$  (NOG) sono stati inoculati per via intraossea nella tibia con  $1 \times 10^5$  o  $2 \times 10^6$  della linea cellulare di mieloma U266 coniugate con l'enzima luciferasi. La progressione della malattia è stata monitorata attraverso analisi BLI (dall'inglese *bioluminescence imaging*) e dalla valutazione dei livelli di paraproteina. I risultati ottenuti sono stati successivamente paragonati con la risonanza magnetica e l'analisi istologica. I tumori derivati hanno presentato dal punto di vista fenotipico, di diffusione e crescita analogie con quanto avviene comunemente nell'uomo. Per valutare l'idoneità del modello e il suo possibile utilizzo per testare nuovi farmaci, gli animali sono stati trattati con bortezomib, melfalan e due nuovi composti. La somministrazione di agenti noti per l'efficacia contro il mieloma multiplo o quella dei due nuovi composti ha attenuato l'aumento dei markers di malattia. Inoltre, l'impianto di plasmacellule primarie da pazienti a livello intratibiale ha portato allo sviluppo di mieloma nel midollo osseo. In conclusione, sia attraverso l'utilizzo di linee cellulari di mieloma che cellule primarie di pazienti, è stato sviluppato un modello che riassume il

mieloma multiplo umano assicurando l'interazione delle cellule tumorali con il microambiente (Fryer et al., 2013).

## MATERIALI E METODI

### A. STUDIO DELL'AZIONE NEUROTOSSICA DI BORTEZOMIB IN MODELLI MURINI

#### A.1 ANIMALI

Nel nostro studio sono stati utilizzati topi Balb/c, CD1, Hsd NuNu e Scid femmine (fornitori Charles River, Calco e Harlan Italia, Correzzana, Italia) di peso corporeo iniziale compreso tra i 19 ed i 21 grammi.

Gli animali vengono stabulati in 5 o 6 per gabbia, in un ambiente caratterizzato da un ciclo di luce-buio artificiale di 12 ore, da una temperatura di  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e da un'umidità del  $55\pm 10\%$  e dispongono, per tutta la durata dell'esperimento, di cibo ed acqua *ad libitum*.

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).

#### A.2 MODALITA' DI SOMMINISTRAZIONE

Il bortezomib (venduto da LC Laboratories, Woburn, MA) si trova sottoforma di polvere pura, priva di eccipienti, che viene conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Bortezomib è stato utilizzato fresco, sciolto in tween80 (5%), etanolo assoluto (5%) e fisiologica alle concentrazioni di 0.8 mg/Kg e 1 mg/Kg (10ml/kg animale) e mantenuto in ghiaccio fino al momento della somministrazione, avvenuta per via endovenosa (i.v.) nella vena caudale dell'animale, con ago N. 25G .

La linea cellulare umana di mieloma multiplo RPMI 8226 gentilmente fornita dal Dr. Maurizio D'Incalci (Istituto di Ricerca Farmacologica Mario Negri, Milano, Italia) è stata iniettata ( $1 \times 10^6$  cellule risospese in PBS) con una siringa (ago N. 25G) sottocute nel fianco di ogni animale all'inizio dello studio (giorno 1).

#### A.3 EXPERIMENTAL DESIGN

Questa parte del lavoro ha previsto dapprima la valutazione dell'azione neurotossica di bortezomib in due ceppi murini immunocompetenti (esperimento 1, 2) e in due ceppi murini

immunodeficienti (esperimento 3, 4), seguita dalla valutazione dell'azione neurotossica e dell'attività antineoplastica di bortezomib in un ceppo murino immunodeficiente inoculato con la linea cellulare umana di mieloma multiplo RPMI 8226 (esperimento 5).

### ***A.3.1 Studio dell'azione neurotossica di bortezomib nel topo Balb/c, CD1, Hola Hsd NuNu e Scid***

Per la caratterizzazione dell'azione neurotossica di bortezomib nei diversi ceppi murini sono stati eseguiti quattro esperimenti distinti aventi pressoché il medesimo disegno sperimentale.

Nell'esperimento 1 sono stati utilizzati 20 topi Balb/c femmine divisi casualmente in due gruppi di trattamento da 10 animali ciascuno: un gruppo di animali sani di controllo (CTRL) e un gruppo di animali trattato con bortezomib.

Nell'esperimento 2 sono stati utilizzati 32 topi CD1 femmine divisi casualmente in due gruppi di trattamento da 16 animali ciascuno: un gruppo di animali sani di controllo (CTRL) e un gruppo di animali trattato con bortezomib.

Nell'esperimento 3 sono stati utilizzati 25 topi Hola Hsd NuNu femmine divisi casualmente in due gruppi di trattamento: un gruppo di 10 animali sani di controllo (CTRL) e un gruppo di 15 animali trattato con bortezomib.

Nell'esperimento 4 sono stati utilizzati 25 topi Scid femmine divisi casualmente in due gruppi di trattamento: un gruppo di 14 animali sani di controllo (CTRL) e un gruppo di 11 animali trattato con bortezomib.

In tabella (2) sono riassunti la randomizzazione degli animali, i ceppi murini e gli schemi di trattamento per ciascun gruppo.

In tutti gli esperimenti la tossicità generale del trattamento farmacologico è stata valutata attraverso un controllo quotidiano della mortalità e dello stato di salute degli animali ed una misura bisettimanale del peso corporeo.

La neurotossicità periferica indotta dal trattamento con bortezomib è stata invece valutata attraverso analisi elettrofisiologiche rappresentate dalla misura della velocità di conduzione nervosa (VDC) nel fascio di nervi caudale (considerata di tipo misto, sia sensitiva che motoria), e nel nervo digitale (considerata puramente sensitiva) e attraverso analisi morfologiche al microscopio ottico ed elettronico dei DRG e del nervo sciatico e analisi morfometriche del nervo sciatico e dei neuroni dei DRG.

Al termine del trattamento gli animali sono stati sacrificati attraverso esposizione a eccesso di CO<sub>2</sub> e da ciascun animale sono stati prelevati i nervi sciatici e i DRG per la caratterizzazione istopatologica della neurotossicità.

<b>NUMERO DELL'ESPERIMENTO</b>	<b>CEPPO MURINO</b>	<b>TRATTAMENTO FARMACOLOGICO</b>
1	Balb/c	controlli, non trattati
		bortezomib 0,8 mg/Kg 2qw/4 i.v.
2	CD1	controlli, non trattati
		bortezomib 0,8 mg/Kg 2qw/6 i.v.
3	Hola Hsd NuNu	controlli, non trattati
		bortezomib 0,8 mg/Kg 2qw/6 i.v.
4	Scid	controlli, non trattati
		bortezomib 1 mg/Kg 1qw/5 i.v.

**Tabella (2).**  
**Suddivisione dei gruppi di animali negli esperimenti 1, 2, 3**

### ***A.3.2 Studio combinato dell'azione neurotossica ed antineoplastica di bortezomib in un modello murino di mieloma multiplo.***

Lo studio combinato dell'azione neurotossica ed antineoplastica di bortezomib è stato eseguito in un modello murino di mieloma multiplo.

Nell'esperimento 5 sono stati utilizzati 25 topi Scid femmine divisi casualmente in tre gruppi di trattamento: un gruppo di 9 animali sani di controllo (CTRL), un gruppo di 8 animali inoculato con la linea cellulare umana di mieloma multiplo RPMI 8226 e un gruppo di 8 animali inoculato con la linea cellulare umana di mieloma multiplo RPMI 8226 e trattato con bortezomib.

In tabella (3) sono riassunti la randomizzazione degli animali, il ceppo murino e gli schemi di trattamento per ciascun gruppo. È stato stabilito di iniziare il trattamento farmacologico con bortezomib quando la massa tumorale ha raggiunto una dimensione in media di 125 mm<sup>3</sup>.

La tossicità generale del trattamento farmacologico è stata valutata attraverso un controllo quotidiano della mortalità e dello stato di salute degli animali ed una misura bisettimanale del peso corporeo.

La neurotossicità periferica indotta dal trattamento con bortezomib è stata invece valutata attraverso analisi elettrofisiologiche rappresentate dalla misura della velocità di conduzione nervosa (VDC) nel fascio di nervi caudale (considerata di tipo misto, sia sensitiva che motoria), e nel nervo digitale (considerata puramente sensitiva) e attraverso analisi morfologiche al microscopio ottico ed elettronico dei DRG e del nervo sciatico e analisi morfometriche del nervo sciatico e dei neuroni dei DRG.

L'azione antineoplastica del trattamento farmacologico è stata determinata attraverso la valutazione settimanale della crescita tumorale.

Al termine del trattamento gli animali sono stati sacrificati attraverso esposizione a eccesso di CO<sub>2</sub> e da ciascun animale sono stati prelevati i nervi sciatici e i DRG per la caratterizzazione istopatologica della neurotossicità.

<b>NUMERO DELL'ESPERIMENTO</b>	<b>CEPPO MURINO</b>	<b>TRATTAMENTO FARMACOLOGICO</b>
5	Scid	controlli, non trattati
		mieloma
		mieloma + bortezomib 1 mg/Kg 1qw/5 i.v.

**Tabella (3).**  
**Suddivisione dei gruppi di animali nell' esperimento 4**

#### **A.4 METODI DI VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA', NEUROTOSSICITA' E AZIONE ANTINEOPLASTICA DEL TRATTAMENTO FARMACOLOGICO**

##### ***A.4.1 Tossicità generale: monitoraggio dello stato di salute dell'animale***

Lo stato di salute degli animali è stato monitorato quotidianamente attraverso l'osservazione da parte di uno stesso operatore sia del comportamento (movimento e reattività a stimoli esterni) che dell'aspetto generale dell'animale (pelo e mucose esterne).

##### ***A.4.2 Tossicità generale: monitoraggio del peso corporeo***

La variazione dell'incremento del peso corporeo di ogni animale, durante il periodo di trattamento, è stata considerata come parametro in grado di stimare la tossicità generale indotta dai farmaci. La valutazione ponderale di ogni animale è stata effettuata all'inizio della sperimentazione e bisettimanalmente, per tutta la durata del trattamento. La bilancia impiegata fornisce il peso dell'animale con un'accuratezza pari al decimo di grammo.

##### ***A.4.3 Neurotossicità: misura della velocità di conduzione nervosa***

La velocità di conduzione nervosa (VDC) è utilizzata nella gran parte degli studi di neurotossicità come indicatore della gravità dell'azione tossica di un farmaco in esame a livello del SNP. In letteratura, diversi studi riportano un decremento della VDC in ratti trattati con diversi chemioterapici tra i quali il bortezomib stesso (Authier, 2000; Cavaletti et al., 1997; Cavaletti et al., 2007 b).

In questo lavoro le valutazioni sono state effettuate, previa anestesia degli animali, al termine del trattamento farmacologico.

Le misurazioni sono state effettuate in accordo con le metodiche applicate da Verdù ed Ozturk (Verdù et al., 1999; Ozturk et al., 2004) con qualche modifica. Le valutazioni elettrofisiologiche sono state eseguite con l'impiego della strumentazione elettromiografica (Myto2 ABN Neuro) ed hanno previsto una stimolazione del fascio di nervi caudale e del nervo digitale per le misurazioni rispettivamente della conduzione sensitiva/motoria e unicamente sensitiva. La VDC caudale è stata determinata posizionando una coppia di elettrodi di registrazione ad ago alla base della coda e una coppia di elettrodi di stimolazione a 3,5 cm di distanza dagli elettrodi di registrazione. In maniera simile, la VDC digitale è stata determinata posizionando gli elettrodi di registrazione a livello della zampa posteriore/caviglia dell'animale e gli elettrodi di stimolazione nel quarto dito della zampa, in prossimità del nervo digitale. Entrambe le VDC sono state calcolate sulla base della formula

velocità=spazio/tempo utilizzando come “tempo” la differenza di latenza tra l’artefatto iniziale di stimolazione e la nascita del primo potenziale d’azione (calcolato in msec) e come “spazio” la distanza tra i punti di registrazione e i punti di stimolazione.

La stimolazione è stata di un’intensità pari a 3 mA, di una durata di 0,04 msec e di una frequenza di 0,75 sec.

Tutte le misurazioni sono state eseguite in un ambiente con temperatura ed umidità controllate (temperatura  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidità del  $55\pm 10\%$ ).

#### ***A.4.4 Neurotossicità: analisi morfologiche dei gangli delle radici dorsali (DRG) e del nervo sciatico***

I DRG e i nervi sciatici prelevati da 3 animali per ogni gruppo di trattamento farmacologico sono stati processati seguendo il protocollo d’inclusione in resina epossidica, per una successiva analisi al microscopio ottico ed elettronico.

I campioni sono stati fissati utilizzando, nel caso dei DRG, la miscela di *Mohr*, una soluzione di paraformaldeide 4% + glutaraldeide 2%, e, nel caso dei nervi sciatici, una soluzione di glutaraldeide 3%, entrambe preparate in tampone fosfato 0.12M pH 7.4.

Dopo la fissazione aldeidica, i campioni sono stati lavati in tampone fosfato 0.12M pH 7.4, in tampone cacodilato 0.12M e sottoposti a fissazione con tetrossido di osmio 2% in tampone cacodilato 0.12M per 1 ora, allo scopo di preservare i lipidi presenti nei tessuti e a livello di membrana, e successivamente lavati nello stesso tampone per allontanare l’eccesso di fissativo.

La resina epossidica, o *epon*, è un mezzo di inclusione adatto all’indagine ultrastrutturale. L’*epon* può facilmente ed uniformemente polimerizzare a basse temperature grazie alla preparazione di una miscela contenente composti anidri ed un agente catalizzatore. Essendo l’*epon* una resina idrofobica, i campioni sono stati progressivamente disidratati in una scala alcolica crescente (da 50 al 100%) con un passaggio finale in ossido di propilene che allontana i residui alcolici incompatibili con la resina stessa. L’infiltrazione graduale dei campioni in resina epossidica si è ottenuta incubando i campioni in miscele di ossido di propilene e resina a concentrazioni crescenti fino a resina pura. Una volta posti in apposite formelle ed orientati secondo la superficie di taglio, i campioni sono stati lasciati polimerizzare in resina a  $55^{\circ}\text{C}$ .

Per l’osservazione al microscopio ottico, i campioni inclusi sono stati tagliati con un microtomo con l’uso di una lama di vetro, in sezioni dello spessore di  $1\mu\text{m}$ , lasciate aderire su

piastra calda su un vetrino portaoggetti, colorate con Blu di Toluidina e montate con un vetrino coprioggetto con DPX.

Gli stessi campioni vengono tagliati attraverso l'uso di un microtomo dotato di una lama di diamante che permette l'ottenimento di sezioni dello spessore di 80 nm. Le sezioni vengono quindi raccolte mediante retini, e colorate in acetato con acetato di uranile, e citrato di piombo per essere osservate al microscopio elettronico a trasmissione. Le immagini d'interesse sono state acquisite con software ITEM e telecamera Mega View II.

#### ***A.4.5 Neurotossicità: analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico***

L'analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG è stata effettuata acquisendo al microscopio ottico diversi campi di sezioni seriate ottenute al microtomo. Allo scopo di escludere errori di misurazione sono state raccolte e fotografate sezioni seriate distanti tra loro circa 50µm.

Attraverso il software *ImageJ* si è eseguita una misurazione manuale dell'area di soma, nucleo e nucleolo dei neuroni presenti in ciascuna immagine, contando circa 300 neuroni in ciascun campione. L'analisi morfometrica è stata eseguita sui DRG di tre animali per ciascun gruppo di trattamento. Al termine delle misurazioni è stata effettuata un'analisi statistica dei dati raccolti attraverso l'uso del software *Prism*.

Per l'analisi morfometrica della fibre mieliniche, le sezioni ottenute sono state osservate al microscopio all'ingrandimento 60× e l'analisi morfometrica è stata effettuata utilizzando come programma d'analisi il "QWin automatic image analyzer".

Per ogni campione sono state scelte 3 porzioni casuali della medesima sezione e per ogni porzione sono state contate le fibre mieliniche presenti nello spazio analizzato e misurati i rispettivi diametri esterni (diametro della fibra) e interni (diametro dell'assone) al fine di misurare almeno 500 fibre/nervo (Cavaletti et al., 1992). Il programma ha permesso di calcolare la distribuzione del diametro delle fibre e dell'assone e di calcolare la g-ratio (Rushton, 1951; Smith and Koles, 1970).

#### ***A.4.6 Test comportamentali: dynamic test***

Al fine di valutare nei nostri modelli sperimentali la comparsa di dolore neuropatico sotto forma di allodinia, è stato impiegato il Dynamic Aesthesiometer Test. 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 15gr che vengono raggiunti in 15sec.

Nell'esperimento 1 , nell'esperimento 4 e nell'esperimento 5 il Dynamic test è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento degli animali con bortezomib (valori basali) e successivamente al termine del trattamento.

Nell'esperimento 2 e nell'esperimento 3 il Dynamic test è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento degli animali con bortezomib (valori basali), successivamente al termine della quarta settimana di somministrazione per valutare il grado di neuropatia insorta ed infine al termine del trattamento.

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 viene posizionata sotto una griglia sulla 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. L'unità di controllo dello strumento rileva i grammi di risposta dell'animale allo stimolo esercitata dal filamento metallico. 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. 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 (fig. 7).



**Figura 7 . Strumentazione del Dynamic Test**

#### ***A.4.7 Azione antineoplastica: misura della crescita tumorale***

La crescita tumorale è stata valutata tramite un calibro digitale mediante la misura settimanale delle dimensioni della massa. Il volume del tumore è stato ricavato misurando il lato corto (W) e il lato lungo (L) della massa tumorale e applicando la formula  $(L \times W^2)/2$ . E' stato previsto il sacrificio *in extremis* degli animali in caso di ulcerazione del tumore o del suo incremento superiore al 10% del peso corporeo dell'animale.

#### **A.5 ANALISI STATISTICHE**

Alla fine delle analisi, 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.

## **B. ANALISI DI LOCALIZZAZIONE DEI TRASPORTATORI DEL Ca<sup>2+</sup> PARVALBUMINA E CALBINDINA**

### **B.1 ANIMALI**

Per le analisi di immunomarcatura eseguite in questa parte dello studio sono stati prelevati, al momento del sacrificio, i DRG sia dagli animali di controllo che dagli animali trattati con bortezomib.

Il sacrificio dell'animale è avvenuto mediante dislocazione cervicale con previa esposizione prolungata ad anidride carbonica.

### **B.2 ANALISI DI LOCALIZZAZIONE: IMMUNOISTOCHEMICA**

#### ***B.2.1 Preparazione del campione***

I DRG in posizione L4-L5 prelevati sono stati fissati per 2 ore in formalina, lavati in PBS per 3 volte e inclusi in paraffina con un ciclo standard per mezzo di un inclusore automatico.

#### ***B.2.2 Reazione di immunostochimica***

Sezioni seriali da 3 µm dei DRG inclusi in paraffina sono state chiarificate in xylene e reidratate mediante una scala di etanolo a concentrazione decrescente. Per il recupero dell'antigenicità, le sezioni sono state immerse in EDTA 1mM, pH 8.0 e la soluzione è stata portata ad ebollizione (3×5 minuti) mediante l'impiego di un microonde. L'attività delle perossidasi endogene è stata inibita tramite incubazione con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% in PBS per 5 min a RT. Successivamente le sezioni sono state incubate con Normal Goat Serum al 5% (NGS 5% in PBS) per 1h a RT. Infine le sezioni sono state incubate per tutta la notte a 4 °C con gli anticorpi primari (anti-parvalbumin, 1:1000; anti-calbindin 1:1000; diluiti in NGS 1% in PBS). Il giorno seguente le sezioni sono state incubate per 1h a RT con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP): anti-rabbit (1:200 in NGS 1%).

Al fine di rilevare il complesso Antigene-Anticorpo primario-Anticorpo secondario, le sezioni sono state incubate con una soluzione di 3,3'-Diaminobenzidina (DAB tablet 10mg) alla concentrazione 0,3mg/ml in PBS a cui è stata aggiunta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allo 0,001%.

Sezioni di DRG incubate solo con l'anticorpo secondario sono state utilizzate come controllo negativo.

Infine le sezioni sono state contro-colorate con Ematossilina ed Eosina, disidratate, montate in DPX ed esaminate e fotografate mediante microscopio Nikon E200.

### ***B.2.3 Analisi morfometrica***

Per l'analisi morfometrica, i campioni inclusi sono stati tagliati con un microtomo, in sezioni dello spessore di 3 $\mu$ m. Allo scopo di escludere errori di misurazione sono state raccolte e fotografate sezioni seriate distanti tra loro circa 18  $\mu$ m.

Attraverso il software *ImageJ* si è eseguita una misurazione manuale dell'area del soma delle cellule marcate in cui era visibile la struttura nucleolare.

### **B.3 ANALISI STATISTICHE**

Alla fine delle analisi, i dati raccolti sono stati comparati tra loro e su di essi sono stati svolti test statistici mediante "ANOVA test" ("Tukey's Multiple Comparison Test") e "STUDENT'S T-TEST" ("Unpaired t-test") fissando una soglia di significatività a  $p < 0.05$ , e validando la significatività dei risultati ottenuti attraverso il software Prism.

## C. MATERIALI

I materiali impiegati in questo lavoro e la loro provenienza sono riportati in tabella (4).

<b>Anticorpi</b>	<b>Provenienza</b>
Ab I anti-parvalbumin e Ab I anti-calbindin	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Ab II anti rabbit	Perkinelmer, Monza, Italia
<b>Farmaci, Reagenti</b>	<b>Provenienza</b>
Bortezomib	LC Laboratoires, Woburn, MA, USA
Blu di Toluidina	Sigma-Aldric, St. Louis, USA
DAB	Sigma-Aldric, St. Louis, USA
Epon	Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo
Ematossilina/Eosina	Bio-Optica, Milano, Italia
Etanolo	Sigma-Aldric, St. Louis, USA
Montante per vetrini DPX	Sigma-Aldric, St. Louis, USA
Linea cellulare umana RPMI 8226	Fornita dal Dr. D'Incalci, Istituto di Ricerca Farmacologica Mario Negri, Milano, Italia
Tween 80	Sigma-Aldric, St. Louis, USA
<b>Strumentazione e software</b>	<b>Provenienza</b>
Analisi statistica	Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, Ca, USA
Analisi morfometrica DRG	Image J, web
Analisi morfometrica nervo sciatico	Leica QWin automatic image analyzer, Wetzlar, Deutschland
Calibro	Borletti, Milano, Italia
Dynamic Aesthesiometer Test	Modello 37400, Ugo Basile Biological Instruments, Comerio, Varese, Italia
Elettromiografo per la misurazione della VdC	Myto II EBN-Neuro, Firenze, Italia
Inclusore automatico Leica Asp 300	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microscopio ottico per l'analisi morfologica	Eclipse E200, Nikon, Italia.
Microtomo RM2255 per paraffina	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microtomo RM2265 per resina	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Animali</b>	<b>Provenienza</b>
Topi Balb/c. CD1, Hsd NuNu, Scid femmine	Harlan Italia, Correzzana, Italia Charles River, Calco, Italia

**Tabella (4).**

**Elenco dei principali materiali utilizzati in questo lavoro con la loro provenienza.**

NB: Tutte le procedure relative al trattamento e alla cura degli animali sono in accordo con la direttiva Europea 86/609 del 1992.

## RISULTATI

### A. STUDIO DELL'AZIONE NEUROTOSSICA DI BORTEZOMIB IN MODELLI MURINI

Negli ultimi 20 anni sono stati messi a punto diversi modelli in ratto di neuropatia periferica indotta da farmaci antineoplastici, che hanno consentito di chiarire i meccanismi fisiopatologici coinvolti nella degradazione delle fibre nervose e nella sofferenza dei neuroni dei DRG responsabili della neurotossicità periferica e di identificare delle strategie di neuroprotezione utili a contrastare o a curarne gli effetti. Tuttavia, questo modello animale non rappresenta il mezzo più efficace per studiare, contemporaneamente, l'attività antineoplastica e gli effetti neurotossici dei chemioterapici poiché solo un numero limitato di linee tumorali è in grado di indurre lo sviluppo di tumori nel ratto. Ciò è invece possibile in un modello murino, al contrario del ratto, grazie alla capacità di sviluppare tumori solidi in seguito all'inoculo di linee cellulari tumorali di diversa origine.

Tra i differenti farmaci antineoplastici comunemente usati in clinica, responsabili dell'insorgenza di una neuropatia periferica, il bortezomib suscita un particolare interesse in quanto rappresenta il trattamento d'eccellenza nei pazienti affetti da mieloma multiplo.

Seppur non esistano in clinica farmaci in grado di prevenire o curare i sintomi dolorosi associati al trattamento con bortezomib, negli ultimi anni si stanno studiando strategie di neuroprotezione al fine di ridurre il fattore limitante nella terapia antitumorale.

Meregalli e colleghi nel 2010 (Meregalli et al., 2010) hanno caratterizzato sia dal punto di vista comportamentale che neurofisiologico e istopatologico la neuropatia periferica indotta da bortezomib nel ratto. Tale caratterizzazione costituisce il punto di partenza sia per la messa a punto di modelli murini di neuropatia periferica da bortezomib che consentano in futuro lo studio contemporaneo dell'attività e della neurotossicità del farmaco in presenza di una massa tumorale che per la valutazione dell'efficacia di eventuali composti neuroprotettori utilizzati in associazione al farmaco chemioterapico con possibilità di verificare che il loro uso contemporaneo non comporti la perdita di efficacia dell'antineoplastico.

Come già accennato nella sezione "*Materiali e metodi*", al fine di ben caratterizzare dal punto di vista neurofisiologico, istopatologico e comportamentale la neuropatia periferica associata al trattamento con bortezomib, abbiamo scelto due ceppi murini immunocompetenti (Balb/c e

CD1) e due ceppi immunodeficienti (Hsd Hsd NuNu e Scid). Dapprima abbiamo valutato l'azione neurotossica di due dosi di bortezomib 0,4mg/Kg (dati non mostrati) e 0,8 mg/Kg somministrate per via intravenosa due volte alla settimana per quattro settimane in topi femmine Balb/c (Esperimento 1). Tale studio ci ha consentito di stabilire quale fosse la dose che meglio mimava l'azione neurotossica di bortezomib in clinica (0,8 mg/Kg) e con la quale abbiamo proseguito la caratterizzazione nei ceppi CD1 e Hsd Hsd NuNu (Esperimenti 2 e 3). In questi due esperimenti la valutazione della neurotossicità avvenuta dopo quattro settimane di trattamento ha evidenziato la necessità di proseguire con altre due settimane di somministrazioni.

Per la caratterizzazione nei topi Scid (Esperimento 4) abbiamo utilizzato una diversa schedula di trattamento che prevedeva la somministrazione di bortezomib alla dose di 1mg/Kg una volta a settimana per 5 settimane, sulla base dei dati ottenuti precedentemente da una collaborazione con un'azienda esterna (dati non pubblicati).

Durante il periodo di trattamento sono stati valutati parametri indicatori della tossicità generale e della neurotossicità del farmaco. Per la tossicità generale si è valutata la mortalità, lo stato di salute dell'animale giornaliero e le variazioni del peso corporeo. Per la valutazione della neurotossicità periferica, invece, sono state eseguite analisi elettrofisiologiche della conduzione dell'impulso nervoso (VDC) nel fascio di nervi caudale e nel nervo digitale, analisi morfologiche dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico e analisi morfometriche dei neuroni sensitivi dei DRG e, nel caso dell'esperimento 4, anche del nervo sciatico e la valutazione dell'allodinia meccanica (percezione dolorosa di uno stimolo non doloroso) per mezzo del dynamic test.

Una volta caratterizzati dal punto di vista morfologico e neurotossico i quattro ceppi murini, abbiamo proseguito con la messa a punto di un modello di mieloma multiplo in topi femmine Scid (Esperimento 5). Oltre alle valutazioni dei parametri indicatori della tossicità generale e della neurotossicità di bortezomib, è stata valutata l'azione antineoplastica del farmaco attraverso la misura della crescita tumorale durante il periodo di trattamento.

Come descritto nel capitolo "*Materiali e metodi*", in ciascun protocollo sperimentale della prima parte dello studio (esperimenti 1, 2, 3, 4), gli animali sono stati divisi in modo casuale in due gruppi: un gruppo di animali sani, non trattati, che ha rappresentato il gruppo di animali controllo (CTRL) e un gruppo di animali trattati con bortezomib (BTZ).

- Nell'esperimento 1: un gruppo di 10 animali è stato trattato con bortezomib 0.8 mg/Kg 2qwx4.

- Negli esperimenti 2 e 3: un gruppo di 16 e 15 animali, rispettivamente, è stato trattato con bortezomib 0.8 mg/Kg 2qwx6.
- Nell'esperimento 4: un gruppo di 11 animali è stato trattato con bortezomib 1mg/Kg 1qwx5.

#### **A.1 STUDIO DELL'AZIONE NEUROTOSSICA DI BORTEZOMIB IN TOPI BALB/C, CDI, HOLA HSD NuNu E SCID**

##### ***A.1.1 Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo***

Il peso corporeo degli animali di controllo e degli animali trattati è stato misurato due volte a settimana (esperimenti 1, 2, 3) e una volta a settimana nel caso dell' esperimento 4, al momento della somministrazione del farmaco. La bilancia impiegata (Adventurer SL, Ohaus, Pine Brook, NJ, USA) fornisce il peso dell'animale con un'accuratezza pari al decimo di grammo. L'analisi statistica è stata effettuata considerando la media dell'incremento di peso corporeo all'interno del gruppo trattato rispetto agli animali controllo, ed è stata effettuata mediante STUDENT'S T-TEST, "Unpaired t-test" fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

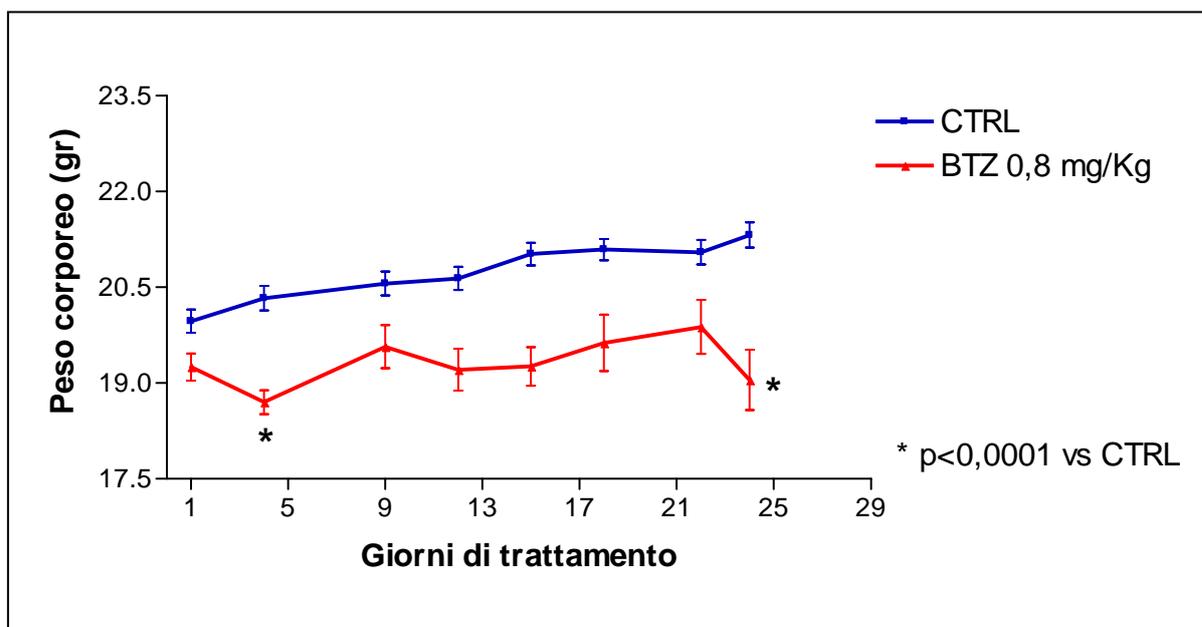
In tutti e quattro gli esperimenti l'andamento ponderale nei topi di controllo è stato in continua crescita fino all'età adulta, in quanto sani con libero accesso ad acqua e cibo.

Esperimento 1

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati e nessun animale è morto durante il periodo di trattamento.

Gli animali, all'arrivo, avevano un peso corporeo compreso tra i 19 ed i 21 grammi.

La Fig. 8 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso del trattamento. Negli animali di controllo (profilo blu) si è osservato un incremento del peso corporeo continuo nel tempo, mentre gli animali trattati con bortezomib (profilo rosso) hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa del peso corporeo dopo la prima somministrazione (riduzione dell' 8% rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) seguita da un recupero e ancora una riduzione statisticamente significativa al termine dell'esperimento (riduzione del 10,65% rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired).



**Figura 8. Valutazione del peso corporeo nell'esperimento 1.**

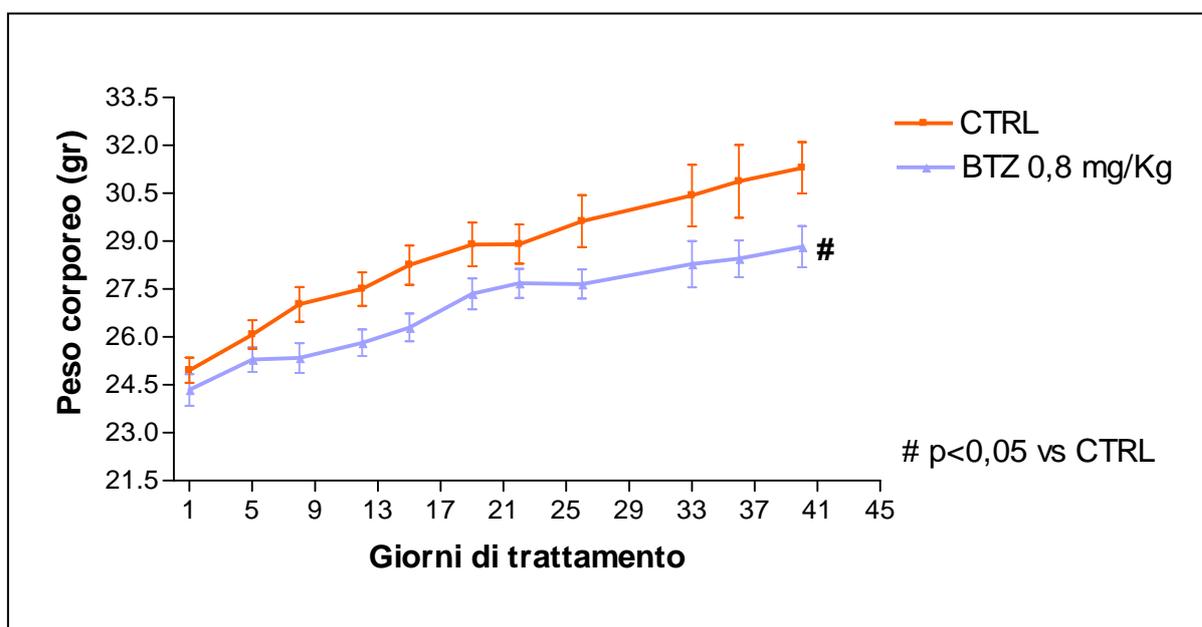
Andamento del peso corporeo nel corso dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, profilo blu), animali trattati con bortezomib 0,8 mg/Kg 2 volte a settimana per 4 settimane (BTZ 0,8 mg/Kg 2qw x 4, profilo rosso).

## Esperimento 2

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati e nessun animale è morto durante il periodo di trattamento.

Gli animali, all'arrivo, avevano un peso corporeo compreso tra i 19 ed i 21 grammi.

La Fig. 9 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso del trattamento. Negli animali di controllo (profilo arancione) si è osservato un incremento del peso corporeo continuo nel tempo; gli animali trattati con bortezomib (profilo lilla) hanno mostrato una buona tolleranza al trattamento e un incremento del peso corporeo non paragonabile a quello dei controlli (riduzione del 7,9% rispetto ai CTRL,  $p < 0,05$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired).



**Figura 9. Valutazione del peso corporeo nell'esperimento 2.**

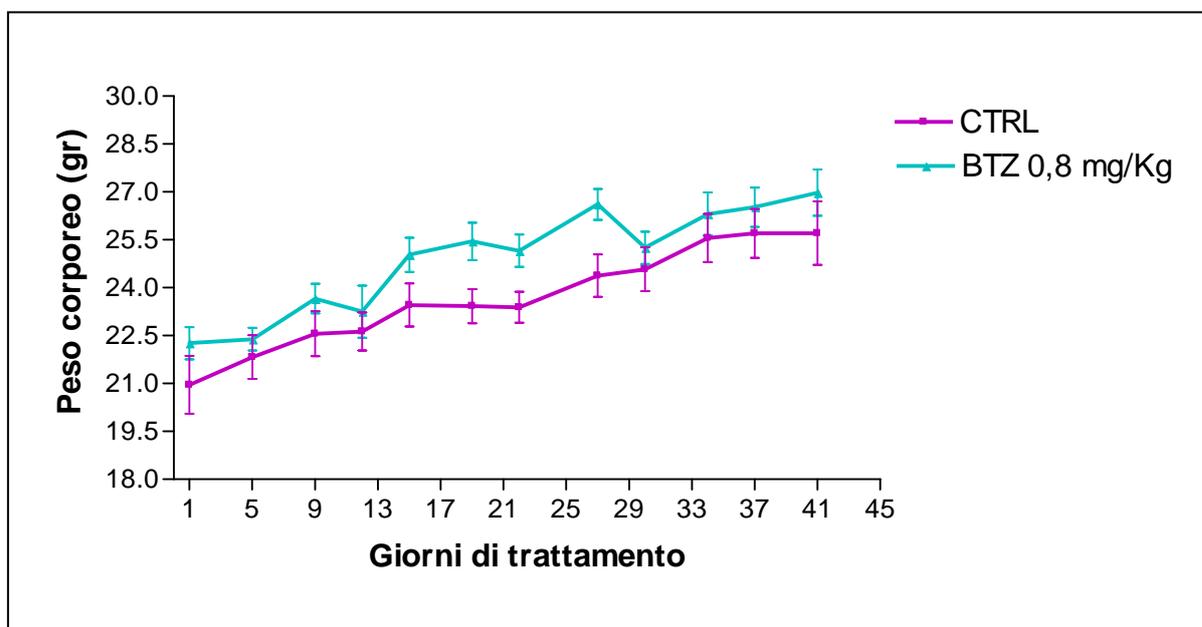
Andamento del peso corporeo nel corso dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, profilo arancione), animali trattati con bortezomib 0,8 mg/Kg 2 volte a settimana per 6 settimane (BTZ 0,8 mg/Kg 2qw x 4, profilo lilla).

### Esperimento 3

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati e nessun animale è morto durante il periodo di trattamento.

Gli animali, all'arrivo, avevano un peso corporeo compreso tra i 19 ed i 21 grammi.

La Fig. 10 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso del trattamento. Negli animali di controllo (profilo viola) si è osservato un incremento del peso corporeo continuo nel tempo; gli animali trattati con bortezomib (profilo azzurro) hanno mostrato una buona tolleranza al trattamento e un incremento del peso corporeo paragonabile a quello dei controlli (aumento del 4,9% rispetto ai CTRL, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired).



**Figura 10. Valutazione del peso corporeo nell'esperimento 3.**

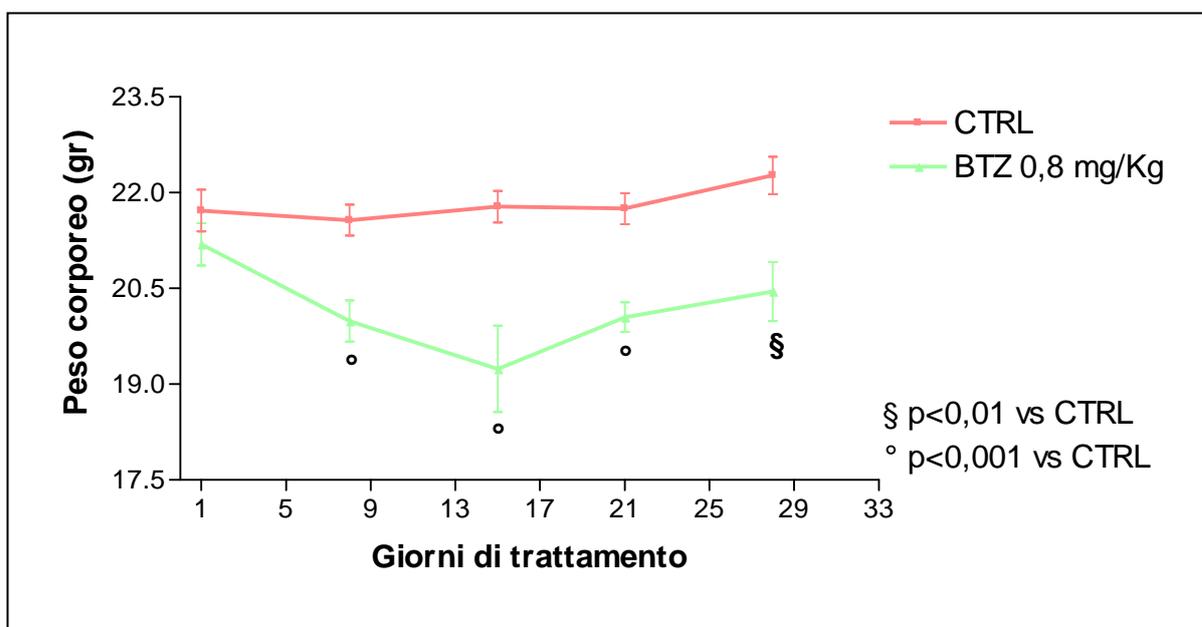
Andamento del peso corporeo nel corso dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, profilo viola), animali trattati con bortezomib 0,8 mg/Kg 2 volte a settimana per 6 settimane (BTZ 0,8 mg/Kg 2qw x 4, profilo azzurro).

#### Esperimento 4

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati, ma tre animali sono morti durante il periodo di trattamento.

Gli animali, all'arrivo, avevano un peso corporeo compreso tra i 19 ed i 21 grammi.

La Fig. 11 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso del trattamento. Negli animali di controllo (profilo rosa) si è osservato un incremento del peso corporeo continuo nel tempo, mentre gli animali trattati con bortezomib (profilo verde) hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa del peso corporeo dopo la prima somministrazione (riduzione del 7,32 % rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) che si è protratta sino al termine della sperimentazione (riduzione dell' 8,17 % rispetto ai CTRL,  $p < 0,01$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired).



**Figura 11. Valutazione del peso corporeo nell'esperimento 4.**

Andamento del peso corporeo nel corso dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, profilo rosa), animali trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, profilo verde).

### ***A.1.2 Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa***

Le valutazioni elettrofisiologiche della velocità di conduzione nervosa (VDC) sono state eseguite mediante l'impiego di una strumentazione elettromiografica (Myto ABN Neuro), in condizioni di temperatura e umidità controllate e previa anestesia dell'animale.

L'analisi statistica è stata effettuata considerando la media della VDC all'interno del gruppo trattato rispetto agli animali controllo, ed è stata effettuata mediante STUDENT'S T-TEST, "Unpaired t-test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

Studi di letteratura e dati ottenuti nel nostro laboratorio (non riportati in questo lavoro) hanno dimostrato che topi sani, e di età omologa a quelli impiegati nei nostri modelli, presentano una VDC caudale media basale di 25 m/sec ( $\pm 1.8$ ), e una VDC media digitale basale di circa 20 m/sec ( $\pm 1.5$ ).

Nel corso dell'esperimento 1 e dell'esperimento 4 le misurazioni delle VDC sono state eseguite solamente al termine del trattamento farmacologico (quarta e quinta settimana, rispettivamente); al contrario negli esperimenti 2 e 3 le misurazioni delle VDC al termine della quarta settimana di trattamento hanno evidenziato la necessità di proseguire con le somministrazioni per altre due settimane.

Il trattamento con bortezomib nei topi Balb/c (esperimento 1) ha determinato una riduzione statisticamente significativa della conduzione dell'impulso nervoso sia nel nervo caudale (riduzione del 27,3%, rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) che nel nervo digitale (riduzione del 17,9% rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) rispetto agli animali non trattati.

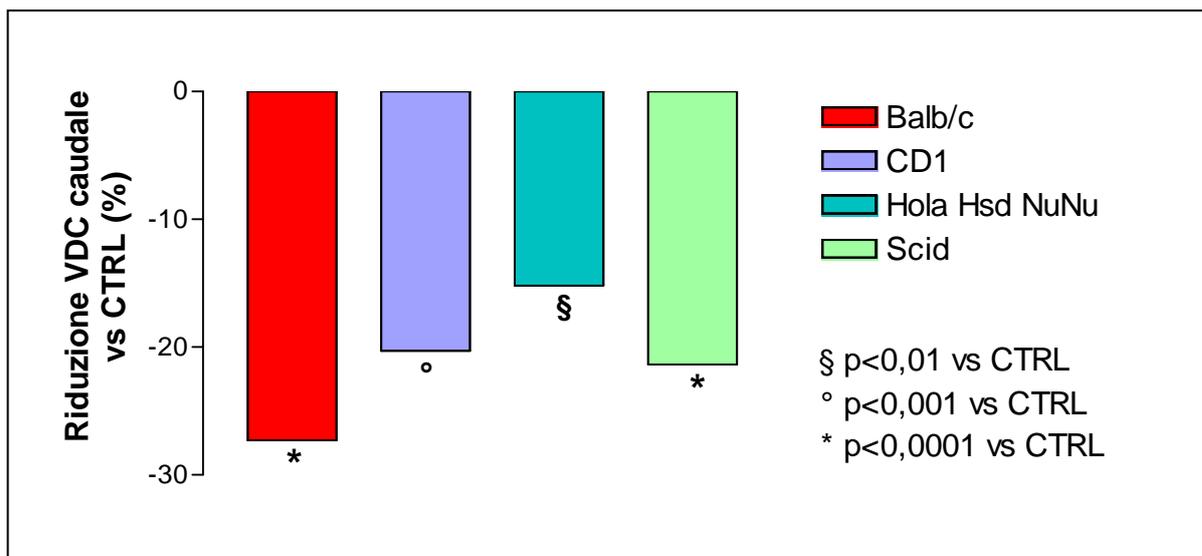
Nei topi CD1 (esperimento 2) trattati con il chemioterapico si è evidenziata una riduzione statisticamente significativa della conduzione dell'impulso nervoso sia nel nervo caudale (riduzione del 20,3% rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), che nel nervo digitale (riduzione del 26,9% rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) rispetto agli animali di controllo.

Come atteso, anche nei topi Hsd NuNu (esperimento 3), il trattamento con bortezomib ha provocato una riduzione statisticamente significativa della conduzione dell'impulso nervoso sia nel nervo caudale (riduzione del 15,2% rispetto ai CTRL,  $p < 0,01$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), che nel nervo digitale (riduzione del 13,5% rispetto ai CTRL,  $p < 0,05$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) rispetto agli animali non trattati.

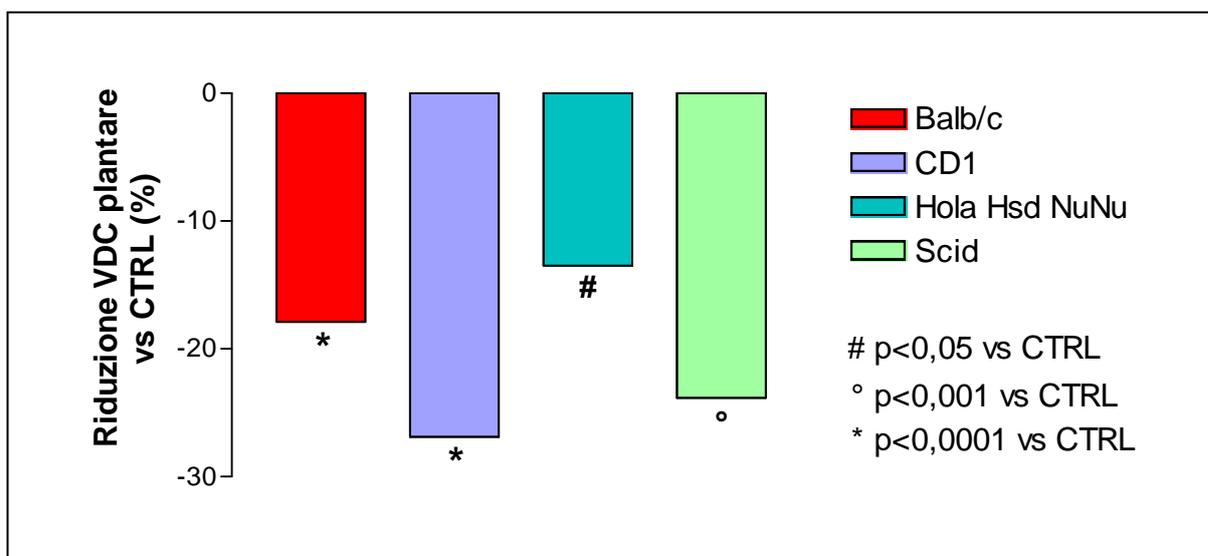
Nei topi Scid (esperimento 4) il trattamento con bortezomib ha causato una riduzione statisticamente significativa della conduzione dell'impulso nervoso sia nel nervo caudale

(riduzione del 21,35 % rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), che nel nervo digitale (riduzione del 23,83 % rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) rispetto agli animali di controllo.

La Fig. 12 riporta la riduzione percentuale della VDC del fascio di nervi caudale dei diversi ceppi rispetto ai propri controlli, mentre la fig. 13 mostra la riduzione percentuale della VDC del nervo digitale dei diversi ceppi rispetto ai controlli.



**Figura 12. Riduzione percentuale (%) della VDC caudale indotta da bortezomib, rispetto ai propri controlli. (CTRL: controlli).**



**Figura 13. Riduzione percentuale (%) della VDC plantare indotta da bortezomib, rispetto ai propri controlli. (CTRL: controlli).**

### ***A.1.3 Neurotossicità: analisi morfologica dei DRG e del nervo sciatico***

Al fine di valutare la neurotossicità indotta da bortezomib, abbiamo eseguito analisi delle alterazioni morfologiche a carico dei DRG e del nervo sciatico utilizzando la microscopia ottica (fig. 14) e, nel caso dell'esperimento 1 anche la microscopia elettronica (fig. 15).

#### **DRG**

Come riportato in fig. 14, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato delle alterazioni morfologiche dei neuroni sensitivi dei DRG negli animali trattati con bortezomib.

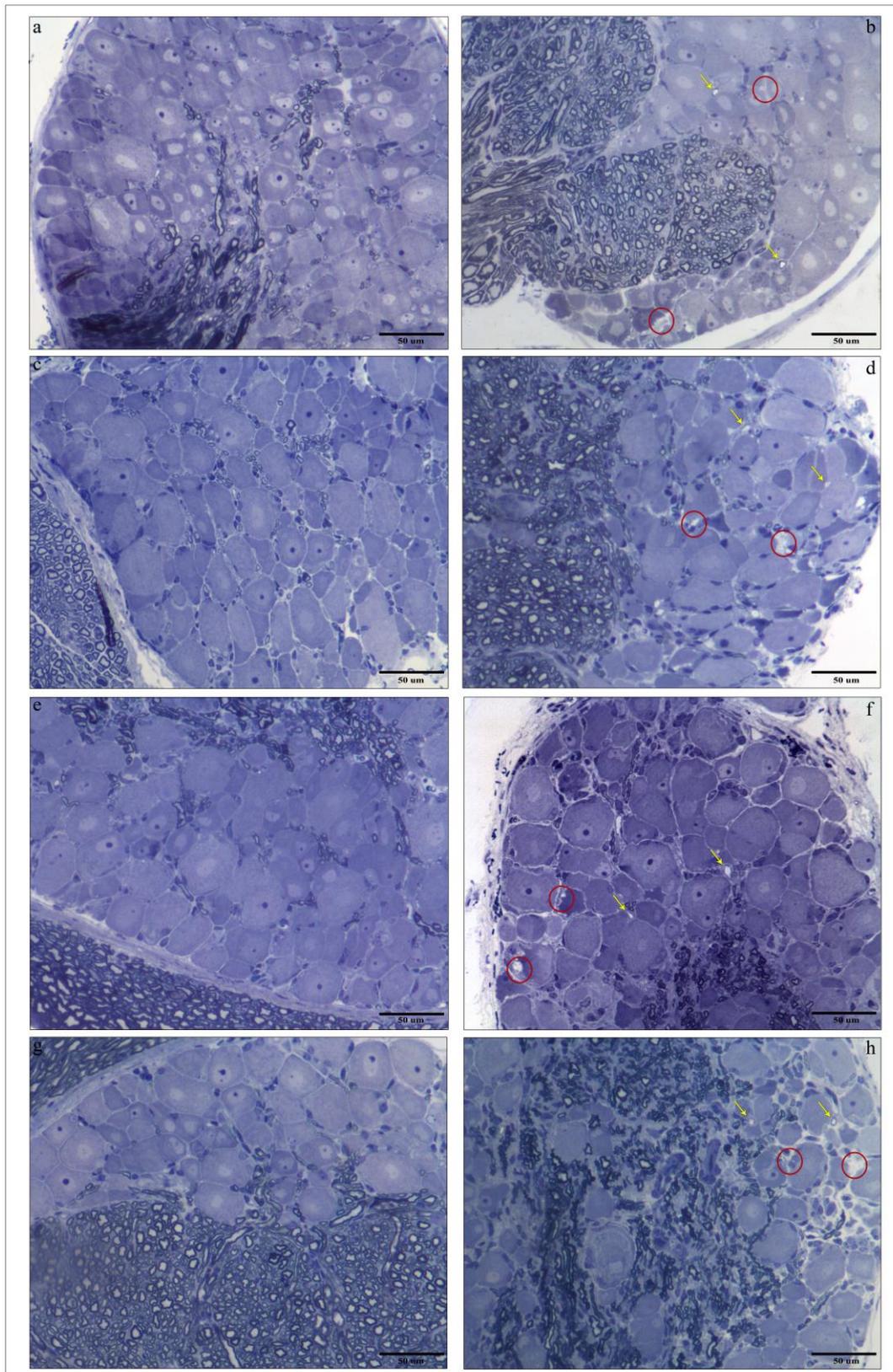
Nei topi Balb/c il trattamento farmacologico ha provocato la frequente degenerazione dei neuroni sensitivi e delle cellule satellite (indicati rispettivamente con i cerchi rossi e le frecce gialle).

Nei topi CD1 bortezomib ha causato la degenerazione dei neuroni sensitivi e delle cellule satellite (indicati rispettivamente con i cerchi rossi e le frecce gialle).

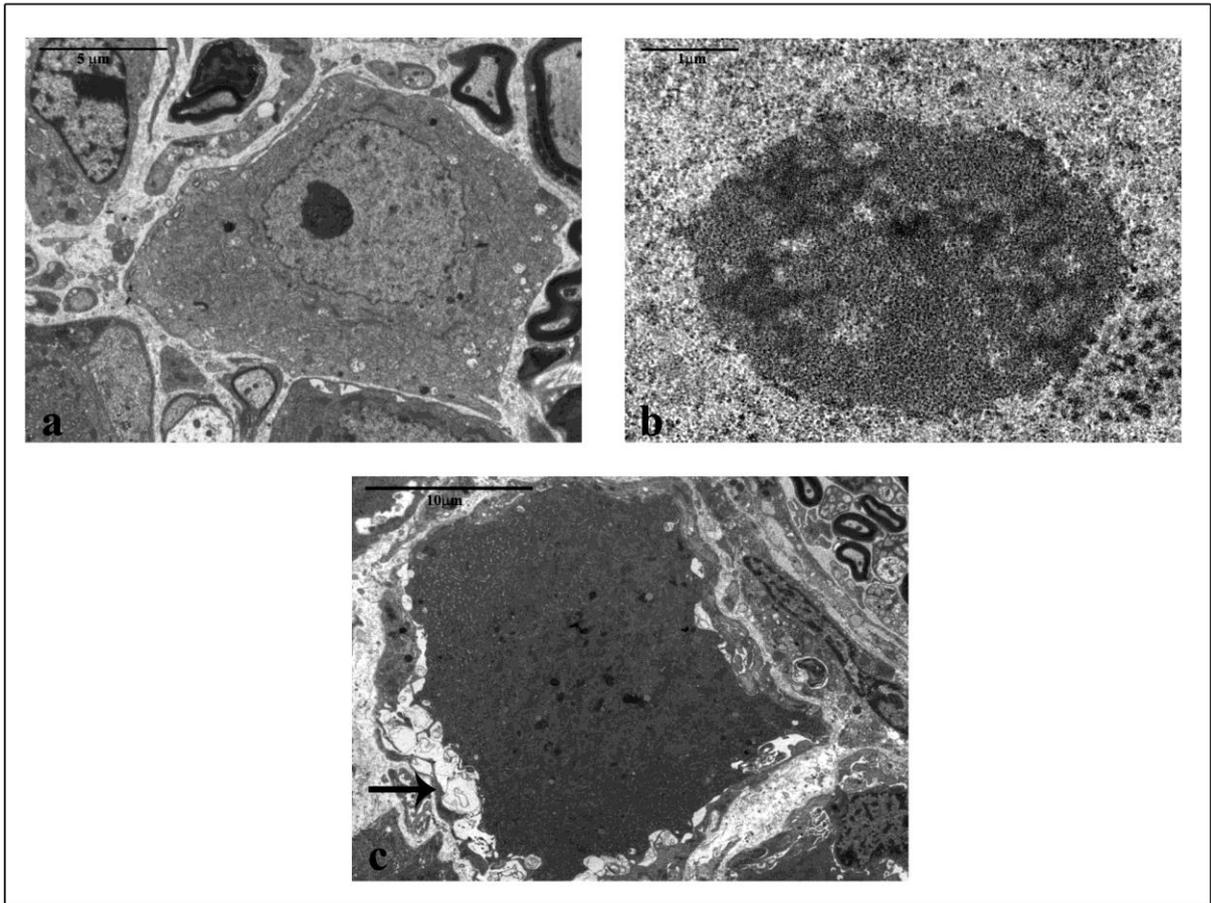
Negli animali Hsd NuNu sono risultati evidenti gli episodi di degenerazione neuronale e delle cellule satellite (indicati rispettivamente con i cerchi rossi e le frecce gialle).

Nei topi Scid il chemioterapico ha provocato la degenerazione dei neuroni sensitivi e delle cellule satellite (indicati rispettivamente con i cerchi rossi e le frecce gialle).

Secondo l'analisi di microscopia elettronica (fig. 15) il bortezomib nei topi Balb/c ha determinato la presenza di citoplasma condensato circondato da cellule satelliti degenerate con l'estensione dello spazio intercellulare che non si evidenzia nei controlli (indicato con la freccia nera).



**Figura 14.** Analisi morfologica dei DRG al microscopio ottico. Balb/c: (a) CTRL e (b) BTZ 0,8 mg/Kg; CD1: (c) CTRL e (d) BTZ 0,8 mg/Kg; Hsd NuNu (e) CTRL e (f) BTZ 0,8 mg/Kg; Scid (g) CTRL e (h) BTZ 1 mg/Kg.



**Figura 15.** Analisi morfologica dei DRG al microscopio elettronico. (a) e (b) CTRL; (c) BTZ 0,8 mg/Kg. (Immagini riprodotte in Carozzi et al., 2010).

## **NERVO SCIATICO**

Come riportato in fig. 16, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato alterazioni morfologiche del nervo sciatico negli animali trattati con bortezomib.

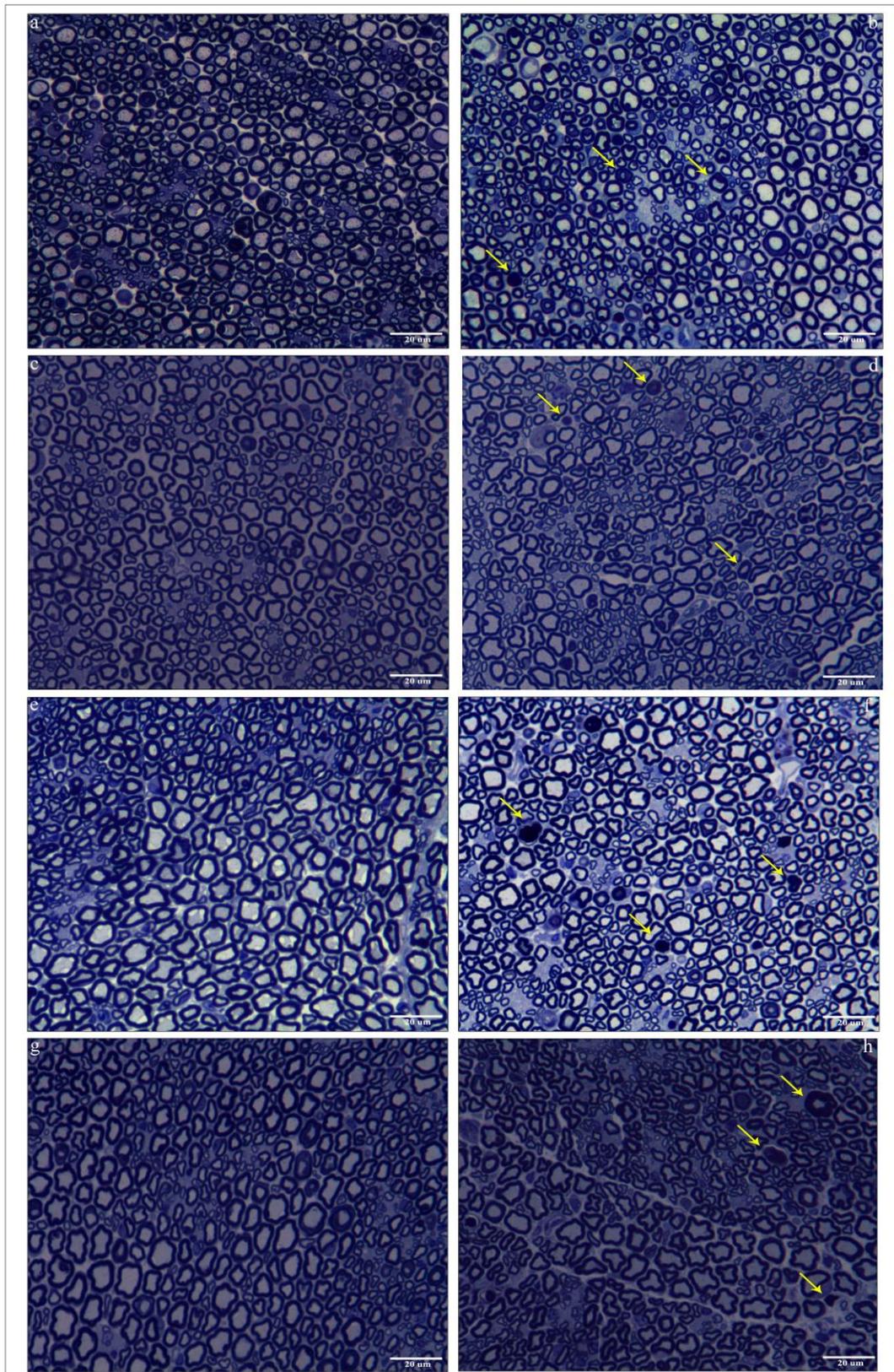
Nei topi Balb/c bortezomib ha provocato la severa e frequente degenerazione assonale delle fibre mieliniche (indicate con le frecce gialle).

Nei topi CD1 il trattamento farmacologico ha causato la degenerazione assonale delle fibre mieliniche (indicate con le frecce gialle).

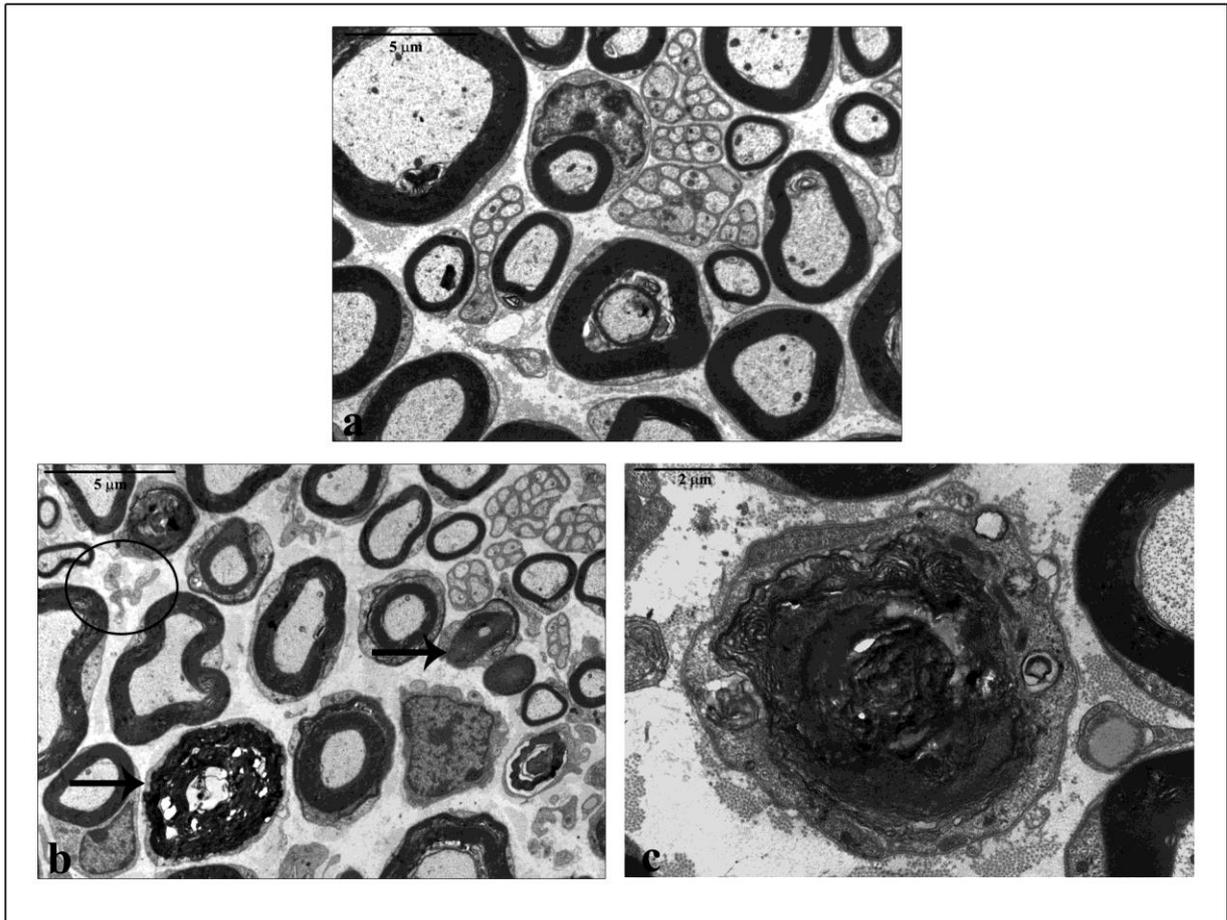
Negli animali Hsd NuNu bortezomib ha evidenziato una degenerazione delle fibre mieliniche da moderata a severa (indicata con le frecce gialle).

Nei topi Scid il chemioterapico ha causato la frequente degenerazione delle fibre mieliniche (indicata con le frecce gialle).

L'analisi di microscopia elettronica (fig. 17) conferma la degenerazione assonale ed evidenzia la presenza di fibre mieliniche con vacuolizzazione assonale e disorganizzazione delle fibre assoplasmatiche (indicati rispettivamente con le frecce nere e il cerchio nero).



**Figura 16.** Analisi morfologica del nervo sciatico al microscopio ottico. Balb/c: (a) CTRL e (b) BTZ 0,8 mg/Kg; CD1: (c) CTRL e (d) BTZ 0,8 mg/Kg; Hsd NuNu (e) CTRL e (f) BTZ 0,8 mg/Kg; Scid: (g) CTRL e (h) BTZ 1 mg/Kg.



**Figura 17.** Analisi morfologica del nervo sciatico al microscopio elettronico. (a) CTRL; (b) e (c) BTZ 0,8 mg/Kg. (Immagini riprodotte in Carozzi et al., 2010).

#### ***A.1.4 Neurotossicità: analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico***

##### **DRG**

L'analisi morfometrica consiste in una misura delle superfici di soma, nucleo e nucleolo di almeno 300 neuroni sensitivi per ciascun DRG ed è un buon parametro per valutare la neurotossicità di un composto farmacologico a livello di questo distretto del SNP.

L'analisi statistica è stata effettuata considerando ciascun valore delle superfici di soma, nucleo e nucleolo di 3 DRG per ciascun gruppo di animali, ed è stata effettuata mediante STUDENT'S T-TEST, "Unpaired t-test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

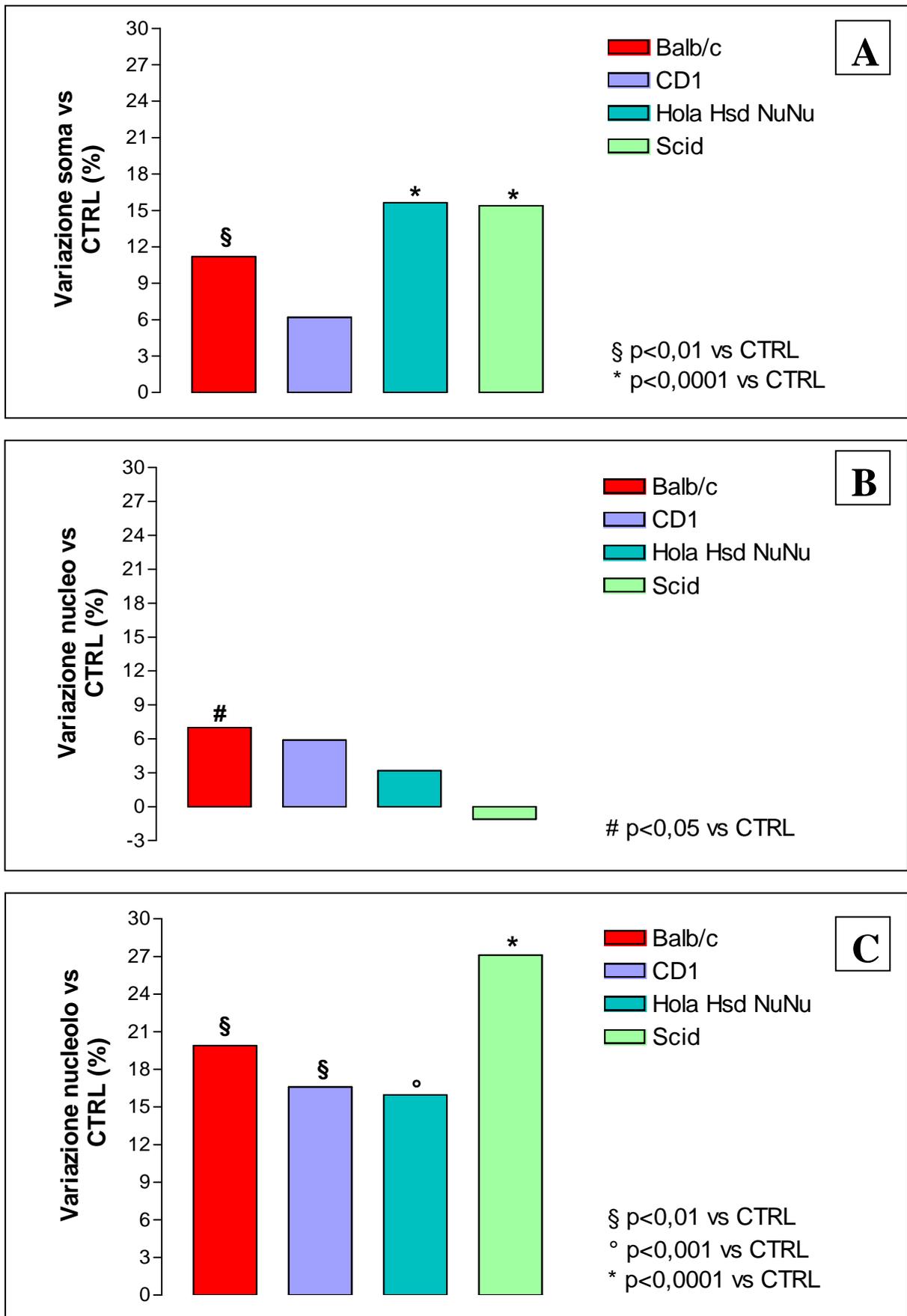
La Fig. 18 a, b, c riporta le variazioni percentuali, rispettivamente, della superficie somatica, nucleare e nucleolare dei neuroni dei DRG degli animali trattati con bortezomib rispetto ai propri controlli.

Secondo l'analisi statistica dei dati, il trattamento con bortezomib nei topi Balb/c (esperimento 1) ha indotto un aumento statisticamente significativo delle superfici somatiche (aumento dell' 11,1% rispetto ai CTRL,  $p < 0,01$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), nucleari (aumento del 7% rispetto ai CTRL,  $p < 0,05$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) e nucleolari (aumento del 19,9% rispetto ai CTRL,  $p < 0,01$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired).

Nei topi CD1 (esperimento 2) trattati con il chemioterapico si è evidenziato un aumento statisticamente significativo della superficie nucleolare (aumento del 16,6% rispetto ai CTRL,  $p < 0,01$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), ma non di quella somatica (aumento del 6,5% rispetto ai CTRL, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired) né di quella nucleare (aumento del 5,9% rispetto ai CTRL, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired).

Nei topi Hsd Hsd NuNu (esperimento 3) il trattamento con bortezomib ha provocato un aumento statisticamente significativo della superficie somatica (aumento del 15,6%, rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), di quella nucleolare (aumento del 15,9% rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), ma non di quella nucleare (aumento del 3,2% rispetto ai CTRL, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired).

Secondo l'analisi statistica dei dati, il trattamento con bortezomib nei topi Scid (esperimento 4) ha indotto un aumento statisticamente significativo della superficie somatica (aumento del 15,4%, rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) e di quella nucleolare (aumento del 27,1% rispetto ai CTRL,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired). La superficie nucleare è risultata ridotta in maniera non statisticamente significativa (riduzione dell' 1,1% rispetto ai CTRL, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired).



**Figura 18.** Aumento percentuale (%) delle superfici somatiche (A), nucleari (B) e nucleolari (C) dei neuroni dei DRG indotte da bortezomib, rispetto ai propri controlli. (CTRL: controlli)

## **NERVO SCIATICO**

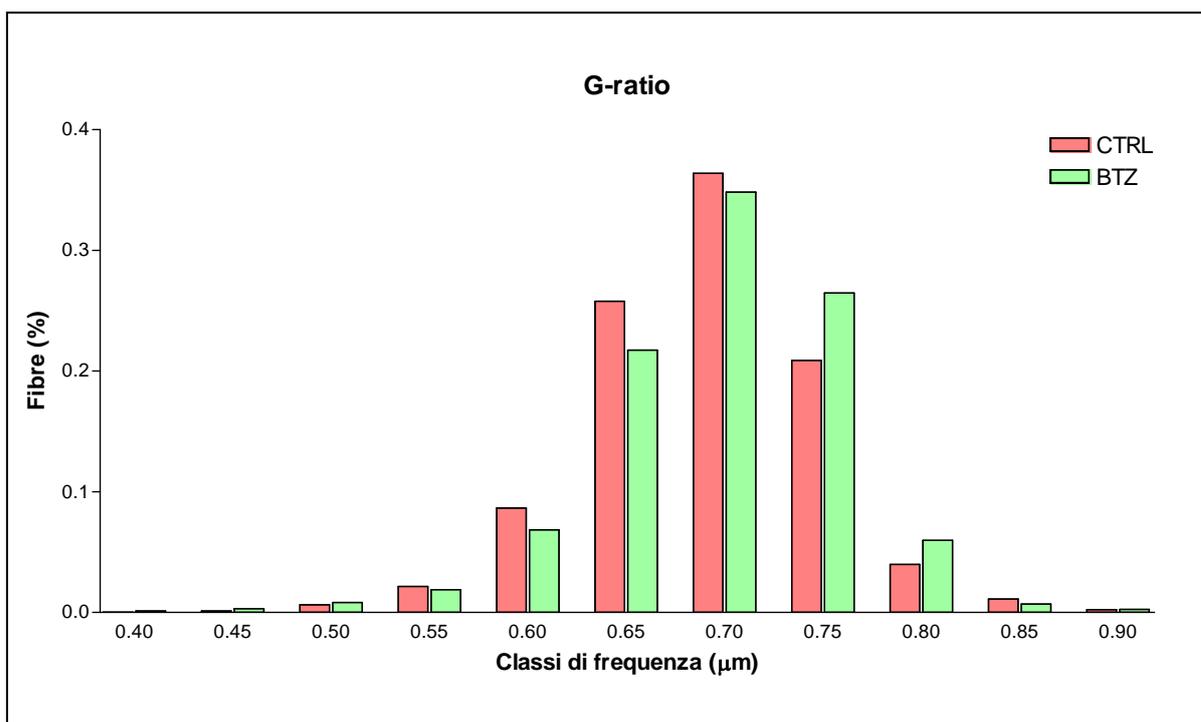
Al fine di valutare quantitativamente l'effetto neurotossico di bortezomib a carico del nervo sciatico, in previsione di un eventuale confronto con l'analisi morfometrica dell'esperimento 5, è stata eseguita l'analisi morfometrica del nervo dell'esperimento 4.

L'analisi morfometrica consiste in una misura dei diametri esterni (diametro della fibra) e dei diametri interni (diametro dell'assone) di almeno 500 fibre per ogni nervo ed è anche questo un buon parametro per valutare la neurotossicità di un composto farmacologico a livello di questo distretto.

L'analisi statistica è stata effettuata considerando ciascun valore (diametro esterno e diametro interno) delle fibre misurate di 3 nervi per ciascun gruppo di animali ed è stata effettuata mediante STUDENT'S T-TEST, "Unpaired t-test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

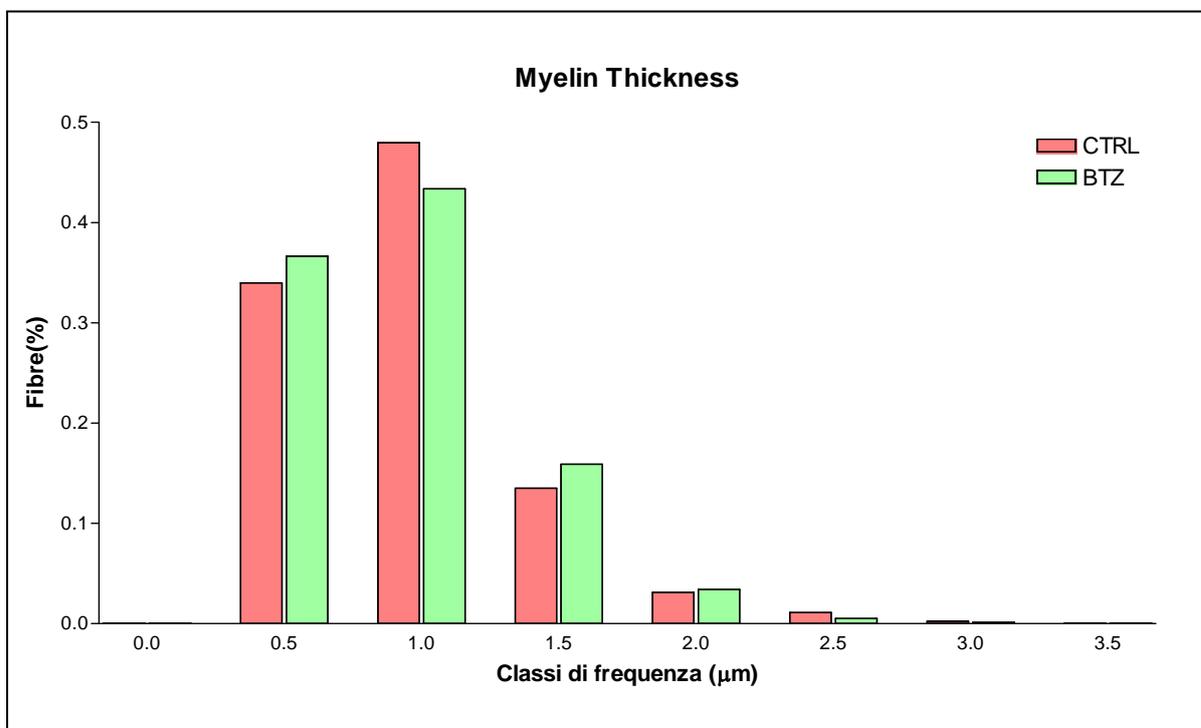
Le Fig. 19 e 20 riportano le distribuzioni di frequenza dei valori di *g-ratio* (rapporto tra il diametro dell'assone rispetto a quello della fibra) e della *myelin thickness* (spessore della guaina mielinica).

Secondo l'analisi dei dati bortezomib causa un aumento statisticamente significativo della *g-ratio* (aumento rispetto ai CTRL,  $p < 0,01$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired), e una lieve tendenza alla riduzione dello spessore della guaina mielinica.



**Figura 19. Distribuzione di frequenza della g-ratio.**

Andamento della distribuzione di frequenza dei valori di g-ratio dell'esperimento 4. Animali di controllo (CTRL, profilo rosa), animali trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, profilo verde).



**Figura 20. Distribuzione di frequenza della myelin thickness.** Andamento della distribuzione di frequenza dei valori di myelin thickness dell'esperimento 4. Animali di controllo (CTRL, profilo rosa), animali trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, profilo verde).

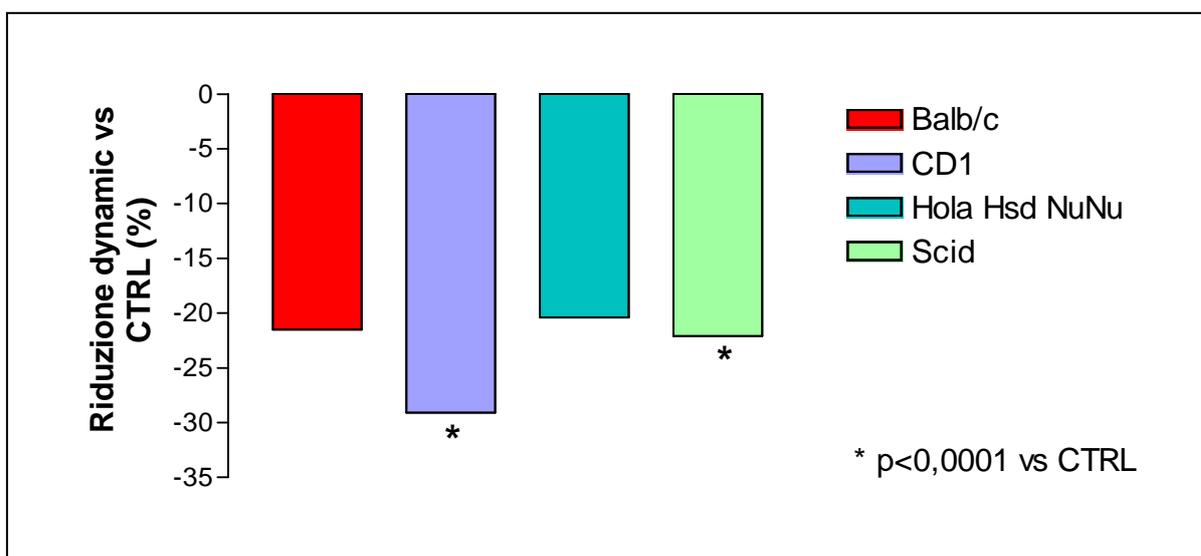
#### A.1.4 Neurotossicità: dynamic test

In tutti i protocolli sperimentali la misurazione della soglia allodinica degli animali è stata valutata mediante il dynamic test.

Nell'esperimento 1 e nell'esperimento 4 il dynamic test è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento degli animali con bortezomib (valori basali) e successivamente al termine del trattamento (quarta settimana e quinta settimana, rispettivamente), mentre nell'esperimento 2 e nell'esperimento 3 oltre ai valori basali sono stati raccolti i dati alla quarta settimana e al termine del trattamento (sesta settimana).

L'analisi statistica è stata effettuata considerando la media dei valori di latenza all'interno del gruppo trattato rispetto agli animali controllo, ed è stata effettuata mediante STUDENT'S T-TEST, "Unpaired t-test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

Il trattamento con bortezomib nei topi Balb/c (esperimento 1) non ha determinato una riduzione statisticamente significativa dei valori di latenza di risposta rispetto ai controlli (riduzione del 21,5% rispetto ai controlli, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired), così come nei topi Hola Hsd NuNu (esperimento 3) (riduzione del 20,4% rispetto ai controlli, non significativo, Student's t-test, Test Unpaired); al contrario il trattamento farmacologico nei topi CD1 (esperimento 2) ha causato una riduzione statisticamente significativa dei valori di latenza rispetto ai controlli (riduzione del 29,1% rispetto ai controlli,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) e nei topi Scid (esperimento 4) ha provocato una riduzione statisticamente significativa dei valori di latenza rispetto ai controlli (riduzione del 22,1% rispetto ai controlli,  $p < 0,0001$  vs CTRL, Student's t-test, Test Unpaired) (Fig. 21).



**Figura 21. Riduzione percentuale (%) della risposta al dynamic test indotta da bortezomib, rispetto ai propri controlli. (CTRL: controlli).**

## **A.2 STUDIO COMBINATO DELL'AZIONE NEUROTOSSICA ED ANTINEOPLASTICA DI BORTEZOMIB IN UN MODELLO MURINO DI MIELOMA MULTIPLO**

Come descritto nel capitolo “*Materiali e metodi*”, nella seconda parte dello studio (esperimento **5**), gli animali sono stati divisi in modo casuale in tre gruppi: un gruppo di animali sani, non trattati, che ha rappresentato il gruppo di animali controllo (CTRL), un gruppo di animali inoculato con cellule tumorali di mieloma (MM, RPMI 8226) e un gruppo di animali inoculato con cellule tumorali di mieloma e tratto con bortezomib (MM+BTZ).

- Nell'esperimento **5**: un gruppo di 8 animali con mieloma multiplo è stato trattato con bortezomib 1 mg/Kg 1qwx5.

### ***A.2.1 Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo***

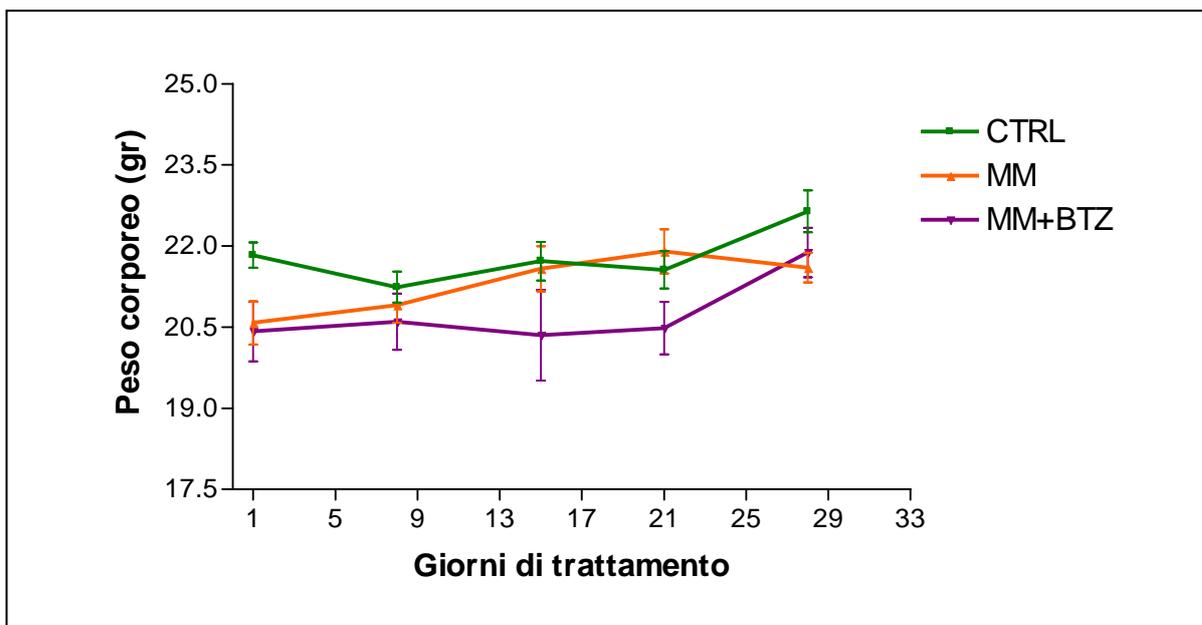
Il peso corporeo degli animali di controllo e degli animali trattati è stato misurato una volta a settimana al momento della somministrazione del farmaco. L'analisi statistica è stata effettuata considerando la media dell'incremento di peso corporeo all'interno dei gruppi trattati rispetto agli animali controllo, ed è stata effettuata mediante TEST ANOVA, “Tukey's Multiple Comparison post-Test” fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

L'andamento ponderale nei topi di controllo è stato in continua crescita fino all'età adulta, in quanto sani con libero accesso ad acqua e cibo.

Osservazioni cliniche quotidiane non hanno evidenziato alcuna insorgenza di malessere negli animali trattati ed un solo animale è morto durante il periodo di trattamento.

Gli animali, all'arrivo, avevano un peso corporeo compreso tra i 19 ed i 21 grammi.

La Fig. 22 riporta l'andamento del peso corporeo degli animali nel corso del trattamento. Negli animali di controllo (profilo verde) si è osservato un incremento del peso corporeo continuo nel tempo; negli animali inoculati con mieloma multiplo (profilo arancione) si è osservato un incremento del peso con una lieve riduzione dopo la terza settimana (riduzione del 4,6% rispetto ai controlli, non significativo, TEST ANOVA, “Tukey's Multiple Comparison post-Test”), mentre gli animali inoculati con mieloma multiplo e trattati con bortezomib (viola) hanno mantenuto costante il peso corporeo con un lieve incremento dopo la quarta somministrazione (riduzione del 3,36% rispetto ai controlli, non significativo, TEST ANOVA, “Tukey's Multiple Comparison post-Test”).



**Figura 22. Valutazione del peso corporeo nell'esperimento 5.**

Andamento del peso corporeo nel corso dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, profilo verde), animali inoculati con mieloma multiplo (profilo arancione) e animali trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, profilo viola).

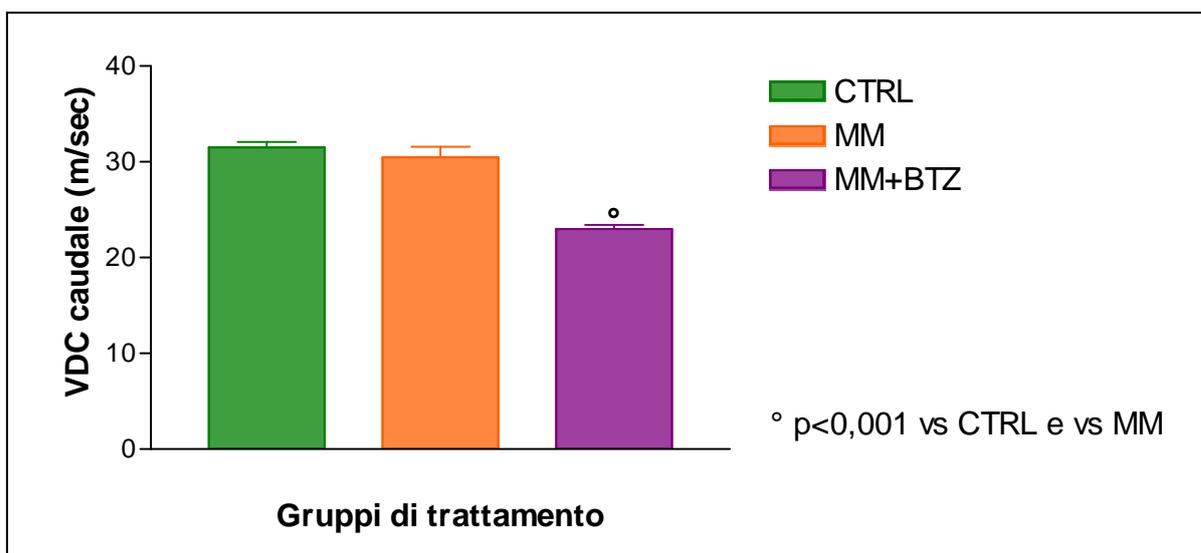
### ***A.2.2 Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa***

Nel corso dell'esperimento 5 le misurazioni delle VDC sono state eseguite solamente al termine del trattamento farmacologico (quinta settimana).

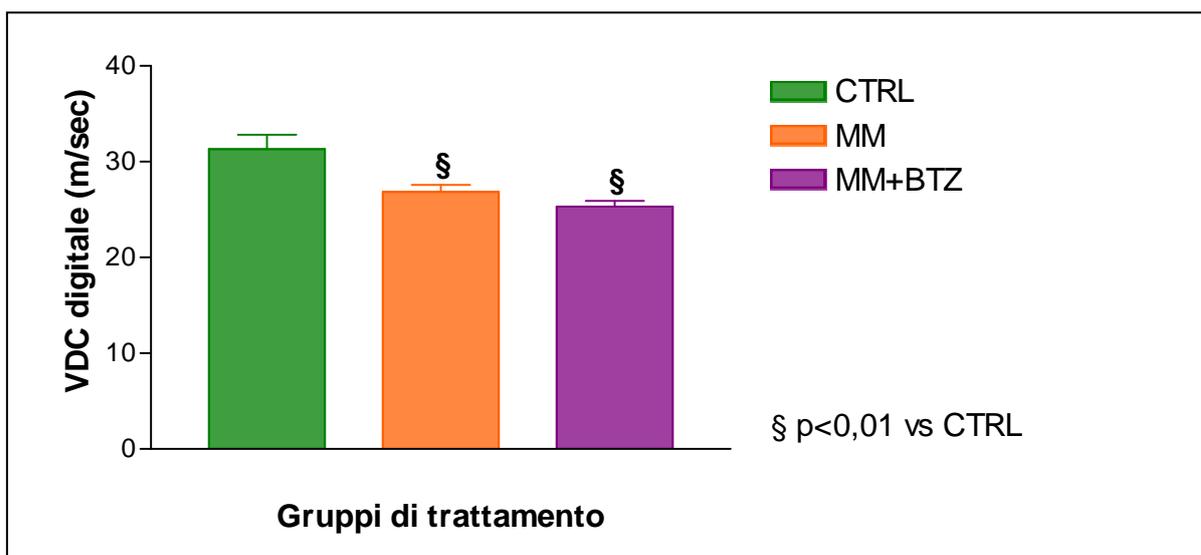
Come illustrato in fig. 23 e in fig. 24 gli animali inoculati con mieloma multiplo mostrano una conduzione dell'impulso nervoso del nervo caudale paragonabile a quella dei controlli; al contrario la conduzione dell'impulso nervoso nel nervo digitale risulta ridotta (riduzione del 14,21%,  $p < 0,0001$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test).

Gli animali portatori di mieloma multiplo presentano una conduzione dell'impulso nervoso nel fascio di nervi caudale pressoché paragonabile a quella degli animali di controllo; al contrario la velocità di conduzione nel nervo digitale risulta ridotta in maniera statisticamente significativa (riduzione del 14,21% rispetto ai controlli,  $p < 0,01$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test).

Nei topi portatori di mieloma multiplo e trattati con bortezomib si è evidenziata una riduzione statisticamente significativa della conduzione dell'impulso nervoso sia nel fascio di nervi caudale (riduzione del 27,1% rispetto ai controlli,  $p < 0,001$  vs CTRL, riduzione del 24,6% rispetto ai portatori di mieloma,  $p < 0,001$  vs MM, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test), che nel nervo digitale (riduzione del 19,1% rispetto ai controlli,  $p < 0,01$  vs CTRL, riduzione del 5,7% rispetto ai portatori di mieloma, non significativo, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test).



**Figura 23.** Grafico delle medie ( $\pm$ DEVIAZIONE STANDARD) delle velocità di conduzione (VDC) misurate nel fascio di nervi caudale al termine del trattamento farmacologico. Animali di controllo (CTRL, istogramma verde), animali inoculati con mieloma multiplo (MM, istogramma arancione) e animali inoculati con mieloma multiplo trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (MM+BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, istogramma viola).



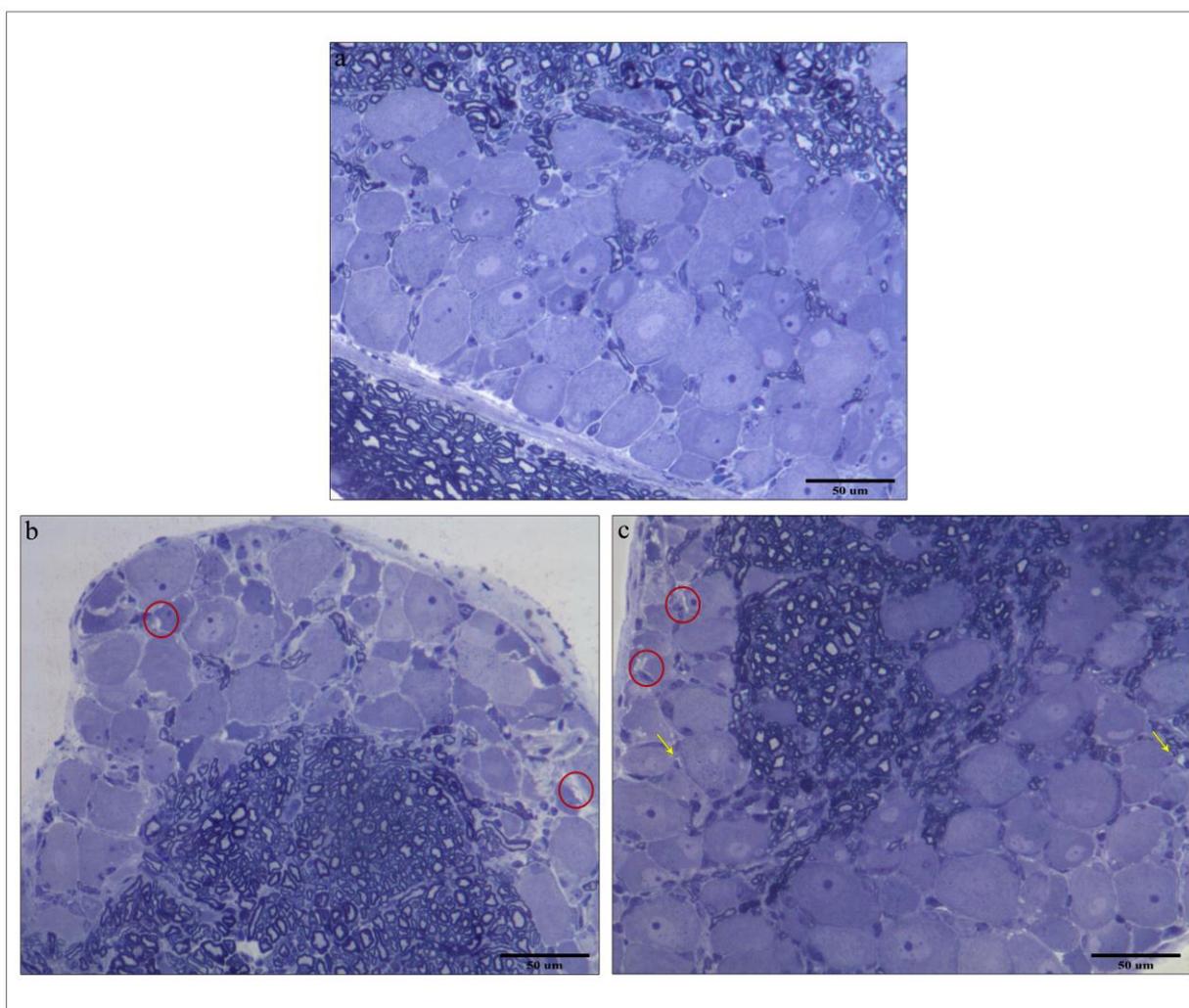
**Figura 24.** Grafico delle medie ( $\pm$ DEVIAZIONE STANDARD) delle velocità di conduzione (VDC) misurate nel nervo digitale al termine del trattamento farmacologico. Animali di controllo (CTRL, istogramma verde), animali inoculati con mieloma multiplo (MM, istogramma arancione) e animali inoculati con mieloma multiplo trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (MM+BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, istogramma viola).

### A.2.3 Neurotossicità: analisi morfologica dei DRG e del nervo sciatico

#### DRG

Come riportato in fig. 25, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato delle alterazioni morfologiche dei neuroni sensitivi dei DRG negli animali portatori di mieloma multiplo e negli animali portatori di mieloma multiplo e trattati con bortezomib.

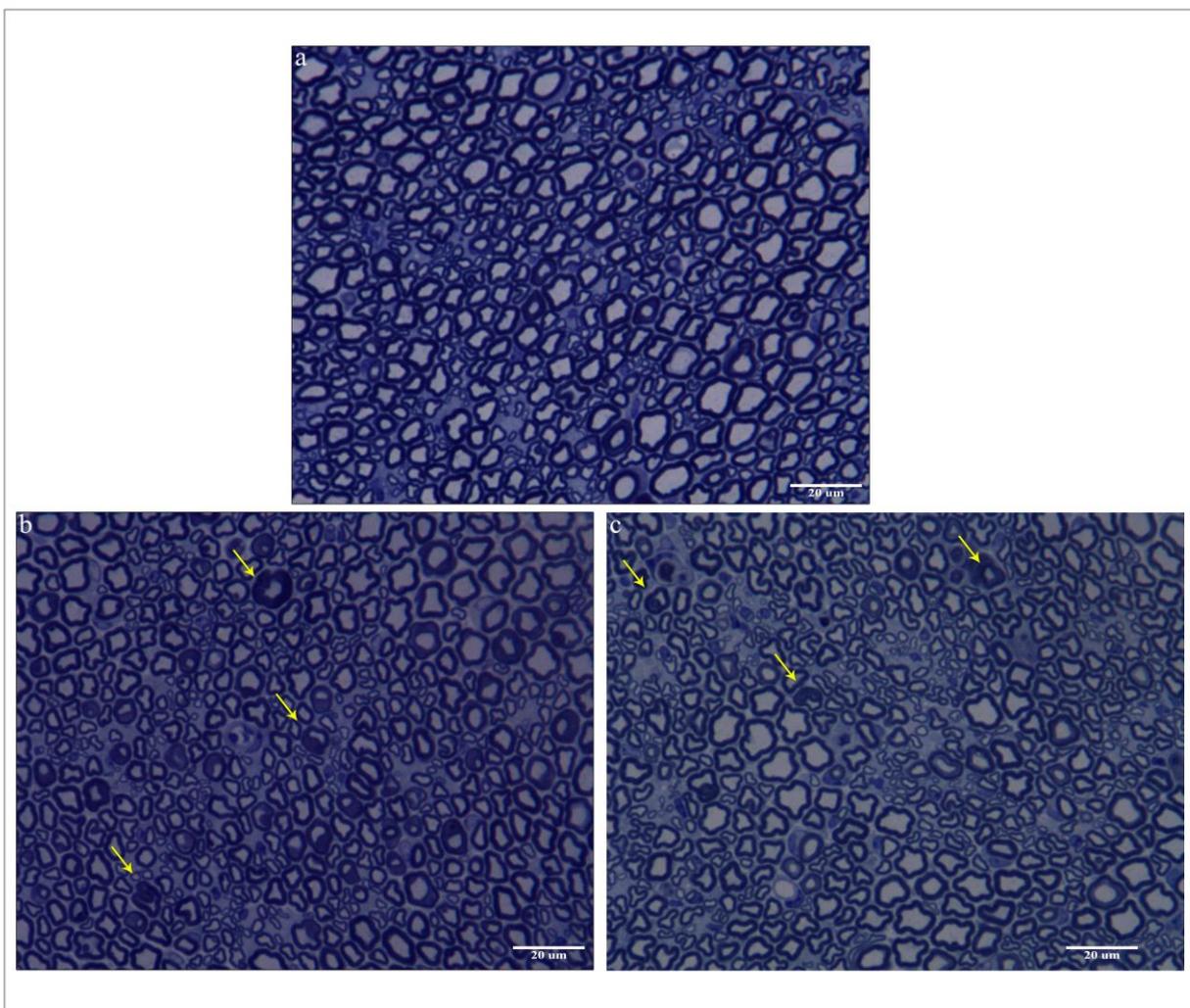
Negli animali portatori di mieloma multiplo è risultata frequente la degenerazione dei neuroni sensitivi (indicati rispettivamente con i cerchi rossi); la degenerazione neuronale è risultata più evidente negli animali portatori di mieloma multiplo trattati con bortezomib associata alla degenerazione delle cellule satellite (indicati rispettivamente con i cerchi rossi e le frecce gialle).



**Figura 25.** Analisi morfologica dei DRG al microscopio ottico. (a) CTRL; (b) MM; (c) MM + BTZ 1mg/Kg.

**NERVO SCIATICO**

Come riportato in fig. 26, l'analisi di microscopia ottica ha evidenziato la severa e frequente degenerazione assonale delle fibre mieliniche sia negli animali portatori di mieloma che in quelli portatori di mieloma sottoposti a trattamento con bortezomib (indicata con le frecce gialle).



**Figura 26.** Analisi morfologica del nervo sciatico al microscopio ottico. (a) CTRL; (b) MM; (c) MM + BTZ 1mg/Kg.

#### ***A.2.4 Neurotossicità: analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG e del nervo sciatico***

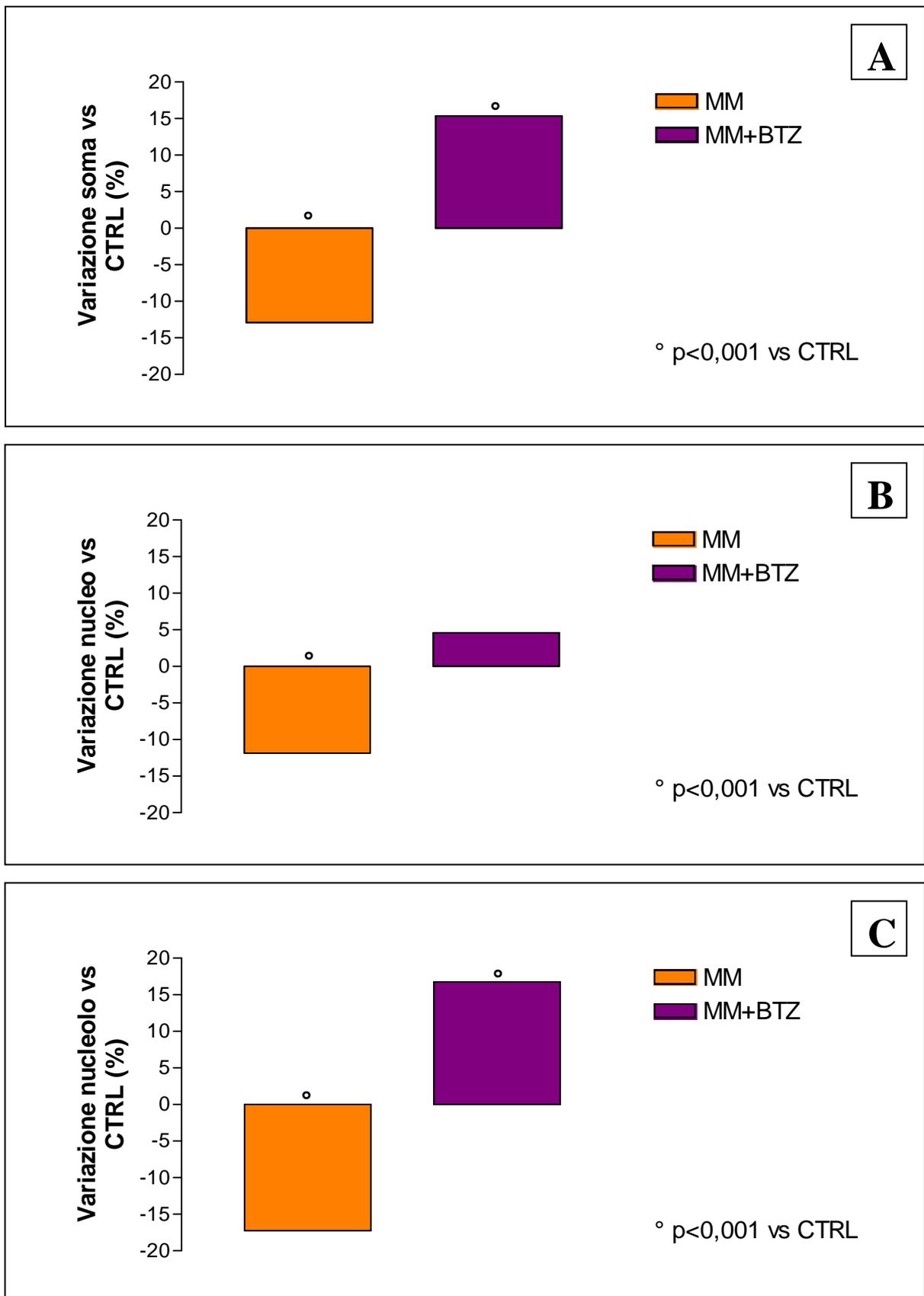
##### **DRG**

L'analisi statistica è stata effettuata considerando ciascun valore delle superfici di soma, nucleo e nucleolo di 3 DRG per ciascun gruppo di animali, ed è stata effettuata mediante TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

I grafici in fig. 27 a, b, c riportano rispettivamente i valori medi ( $\pm$  Errore Standard) delle superfici di soma (a), nucleo (b) e nucleolo (c) dei neuroni dei DRG di animali di controllo, degli animali inoculati con mieloma multiplo e degli animali inoculati con mieloma multiplo e trattati con bortezomib.

Secondo l'analisi statistica dei dati, gli animali inoculati con mieloma multiplo presentano una riduzione statisticamente significativa delle superfici somatiche (riduzione del 12,91% rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test), nucleari (riduzione dell' 11,84% rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test) e nucleolari (riduzione del 17,24% rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test).

Negli animali inoculati con mieloma multiplo e sottoposti a trattamento chemioterapico, bortezomib ha provocato l'aumento statisticamente significativo delle superfici somatiche (aumento del 15,36%, rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test) e nucleolari (aumento del 16,75%, rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test), mentre l'aumento della superficie nucleare non è risultato statisticamente significativo (aumento del 4,57%, rispetto ai CTRL, non significativo, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test).



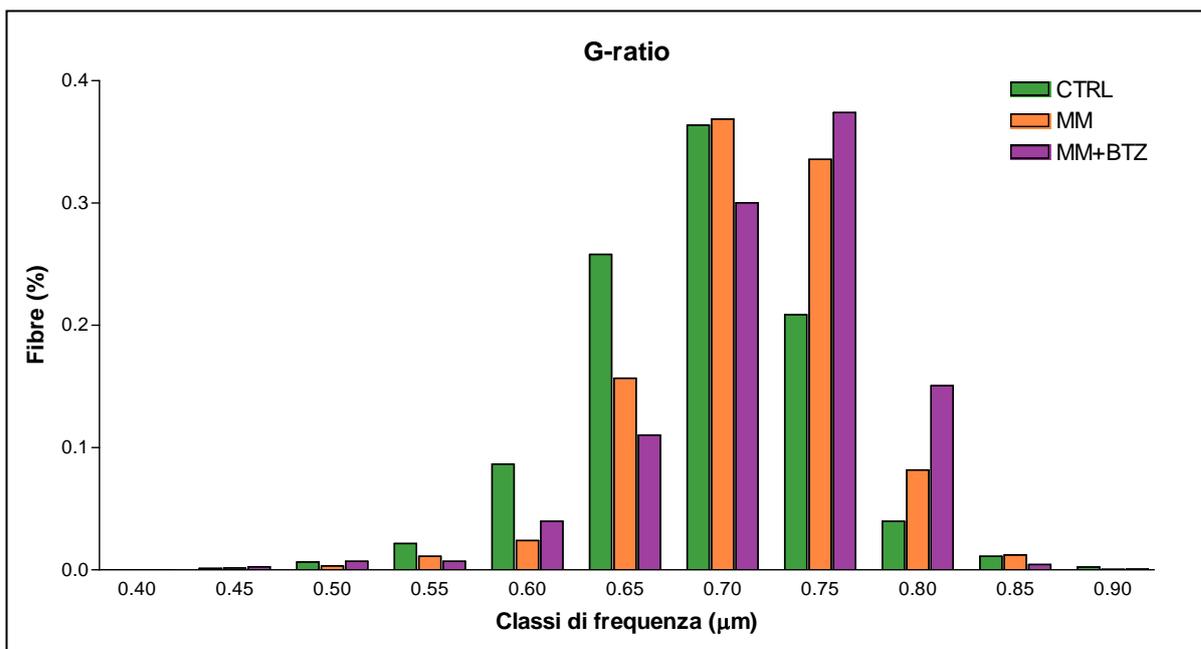
**Figura 27. Variazione percentuale (%) delle superfici somatiche (A), nucleari (B) e nucleolari (C) dei neuroni dei DRG indotte da mieloma multiplo e da mieloma multiplo associato a trattamento con bortezomib, rispetto ai propri controlli. (CTRL: controlli)**

## **NERVO SCIATICO**

L'analisi statistica è stata effettuata considerando ciascun valore (diametro esterno e diametro interno) delle fibre misurate di 3 nervi per ciascun gruppo di animali ed è stata effettuata mediante TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

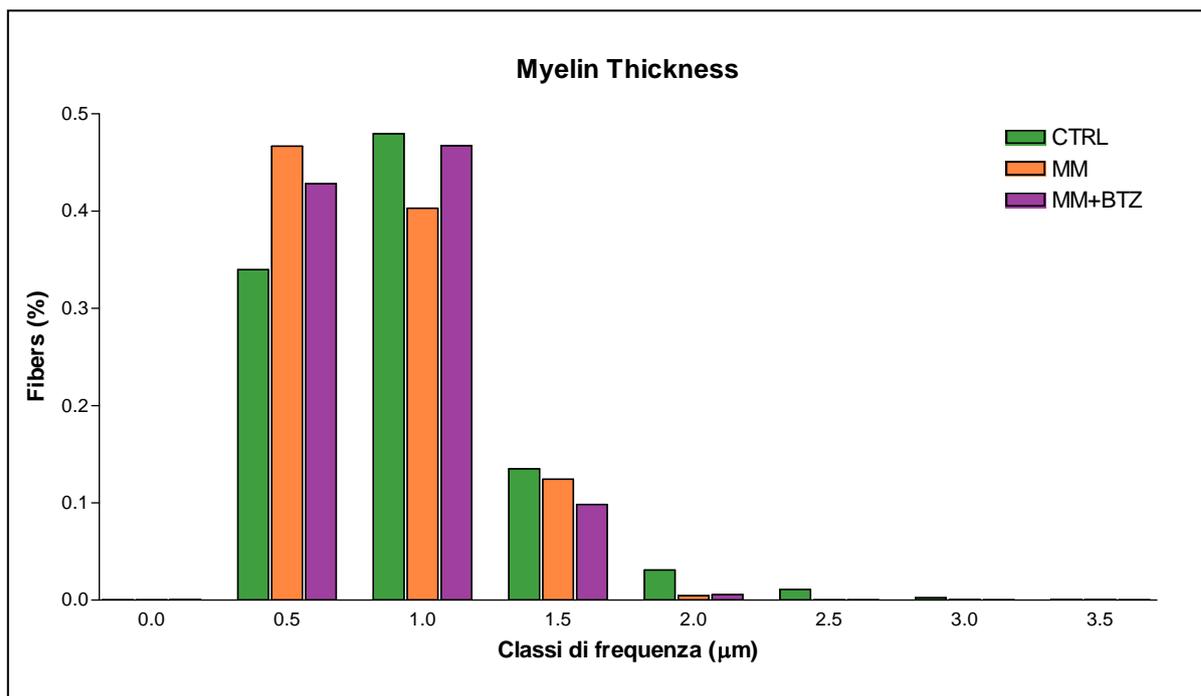
Le Fig. 28 e 29 riportano le distribuzioni di frequenza dei valori di *g-ratio* (rapporto tra il diametro dell'assone rispetto a quello della fibra) e della *myelin thickness* (spessore della guaina mielinica).

Secondo l'analisi dei dati il mieloma multiplo induce un aumento statisticamente significativo della *g-ratio* (aumento rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  rispetto ai CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test) incrementato dal trattamento con bortezomib (aumento rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  rispetto ai CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test). La riduzione dello spessore della guaina mielinica provocato dal mieloma multiplo è statisticamente significativo (riduzione rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  rispetto ai CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test) ed è incrementato dal trattamento farmacologico con bortezomib (riduzione rispetto ai CTRL,  $p < 0,001$  rispetto ai CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test).



**Figura 28. Distribuzione di frequenza della g-ratio.**

Andamento della distribuzione di frequenza dei valori di g-ratio dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, istogramma verde), animali inoculati con mieloma multiplo (MM, istogramma arancione) e animali inoculati con mieloma multiplo trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (MM+BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, istogramma viola).



**Figura 29. Distribuzione di frequenza della myelin thickness.**

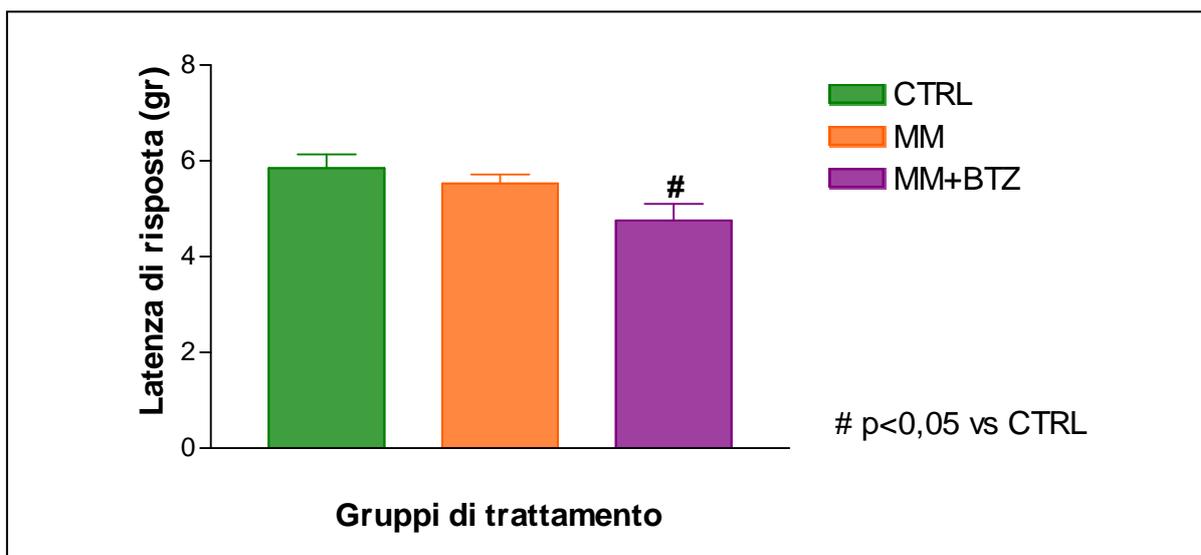
Andamento della distribuzione di frequenza dei valori della myelin thickness dell'esperimento. Animali di controllo (CTRL, istogramma verde), animali inoculati con mieloma multiplo (MM, istogramma arancione) e animali inoculati con mieloma multiplo trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (MM+BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, istogramma viola).

### A.2.5 Neurotossicità: dynamic test

Nell'esperimento 5 il dynamic test è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento degli animali con bortezomib (valori basali) e successivamente al termine del trattamento (quinta settimana).

L'analisi statistica è stata effettuata considerando la media dei valori di latenza all'interno del gruppo trattato rispetto agli animali controllo, ed è stata effettuata mediante TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .

Gli animali portatori di mieloma multiplo presentano una latenza di risposta pressochè paragonabile a quella degli animali di controllo, mentre negli animali portatori di mieloma trattati con bortezomib si è evidenziata una riduzione statisticamente significativa dei valori di latenza rispetto ai controlli (riduzione del 14,53% rispetto ai controlli,  $p < 0,05$  vs CTRL, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test), ma non rispetto agli animali portatori di mieloma multiplo (riduzione del 9,6% rispetto ai portatori di mieloma, non significativo, TEST ANOVA, "Tukey's Multiple Comparison post-Test). (Fig. 30).



**Figura 30. Grafico delle medie ( $\pm$ DEVIAZIONE STANDARD) delle latenze di risposta misurate al termine del trattamento farmacologico.** Animali di controllo (CTRL, istogramma verde), animali inoculati con mieloma multiplo (MM, istogramma arancione) e animali inoculati con mieloma multiplo trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (MM+BTZ 1 mg/Kg 1qw x 5, istogramma viola).

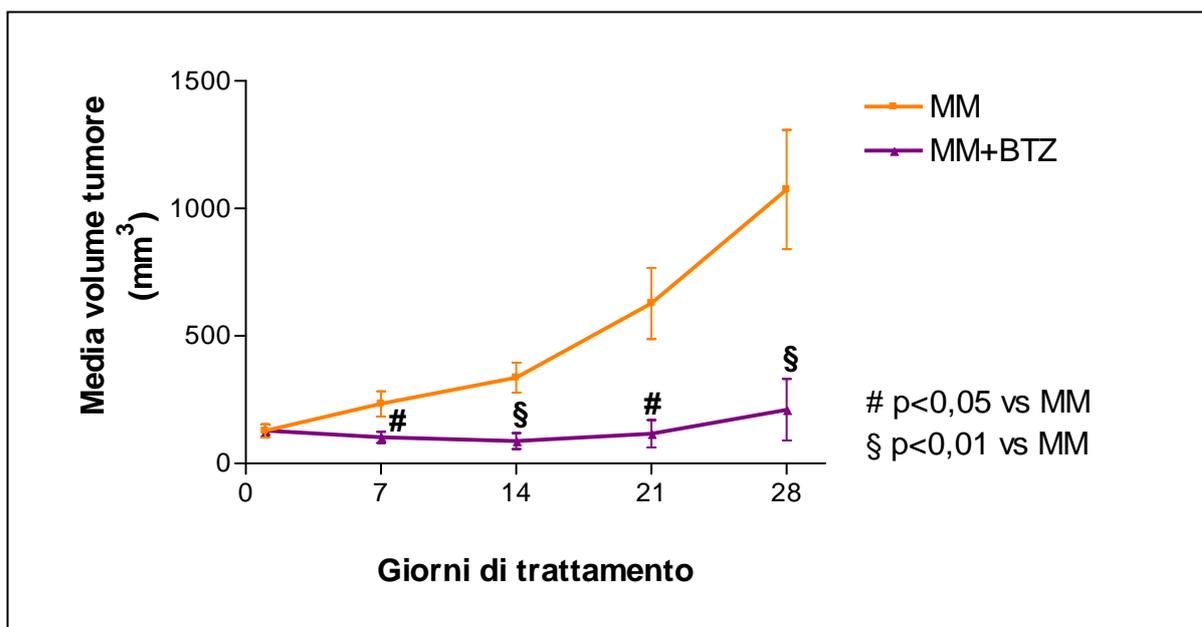
### A.2.6 Azione antineoplastica: misura della crescita tumorale

Al fine di valutare l'azione antineoplastica di bortezomib, è stata monitorata una volta a settimana l'andamento della crescita tumorale attraverso l'uso di un calibro digitale.

Il volume del tumore è stato ricavato misurando il lato corto (W) e il lato lungo (L) della massa tumorale e applicando la formula  $(L \times W^2)/2$ .

Il grafico in fig. 31 mostra l'andamento della crescita tumorale durante le cinque settimane di trattamento con bortezomib.

Gli animali portatori di mieloma multiplo presentano un incremento progressivo della massa tumorale, al contrario degli animali portatori di mieloma trattati con bortezomib che mostrano un rallentamento statisticamente significativo della crescita tumorale ( $p < 0,05$  vs MM al giorno 7 e al giorno 21,  $p < 0,01$  vs MM al giorno 14 e al giorno 28, Student's t-test, Test Unpaired).



**Figura 31. Valutazione della crescita tumorale.**

Andamento della crescita tumorale nel corso dell'esperimento. Animali portatori di mieloma multiplo (MM, profilo arancione), animali portatori di mieloma multiplo e trattati con bortezomib 1 mg/Kg 1 volta a settimana per 5 settimane (MM+BTZ 1 mg/Kg 1qw x , profilo viola).

## **B. ANALISI DI LOCALIZZAZIONE DEI TRASPORTATORI DEL $\text{Ca}^{2+}$ PARVALBUMINA E CALBINDINA**

L'analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG ha evidenziato alterazioni statisticamente significative a carico delle superfici somatiche, nucleari e nucleolari, a differenza dei dati riportati in letteratura nel ratto (Cavaletti et al., 2007 a).

L'aumento delle superfici di soma, nucleo e nucleolo rispetto a quelle dei controlli ci ha fatto ipotizzare la presenza di un danno maggiore in una sottopopolazione neuronale, nella fattispecie quella di neuroni piccoli, per cui l'analisi morfometrica potrebbe aver determinato una sovrastima delle superfici somatiche, nucleari e nucleolari.

Dopo un'attenta analisi dei dati riportati in letteratura, abbiamo deciso di valutare la distribuzione delle sottopopolazioni neuronali (piccoli e grandi neuroni) attraverso un'analisi di localizzazione dei due trasportatori del  $\text{Ca}^{2+}$  parvalbumina e calbindina.

Secondo Celio (Celio M.R., 1990) e Honda (Honda C.N., 1995) calbindina e parvalbumina si distribuiscono in due differenti sottopopolazioni neuronali dei DRG (rispettivamente neuroni piccoli e neuroni grandi) che possono essere distinte dall'estensione della superficie cellulare. Per poter valutare la distribuzione delle sottopopolazioni neuronali è stata condotta l'analisi morfometrica delle superfici somatiche delle cellule marcate con i due anticorpi.

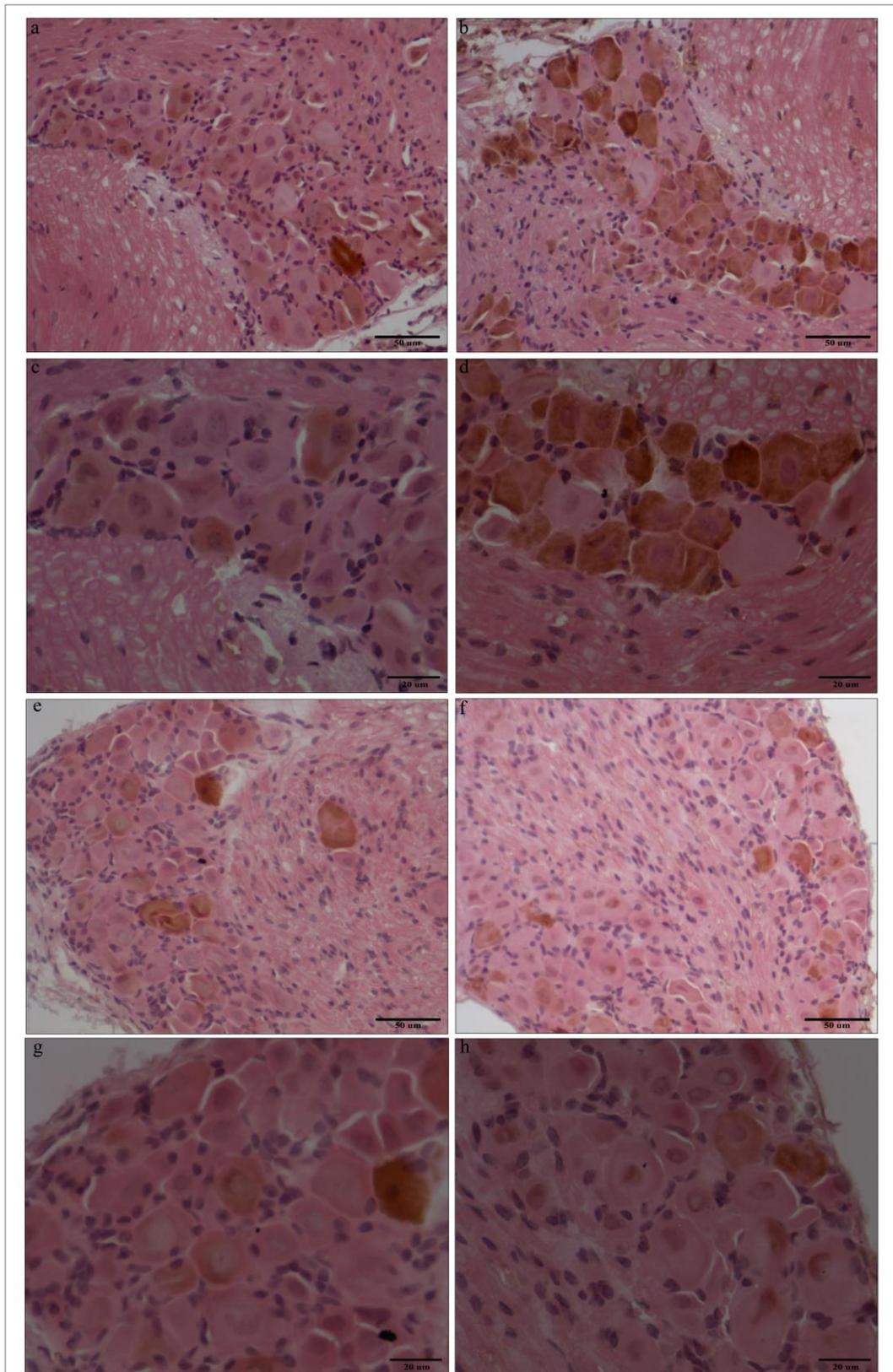
### **DRG**

Per l'analisi immunoistochimica sono stati utilizzati i DRG prelevati dai topi CD1 (Esperimento 2).

Le immunomarcature per i trasportatori del  $\text{Ca}^{2+}$  hanno rivelato una positività parziale nelle cellule in analisi e assenza di colocalizzazione dei due marcatori (fig. 32).

L'analisi morfometrica consiste in una misura delle superfici somatiche dei neuroni sensitivi marcati in cui è visibile la struttura nucleolare.

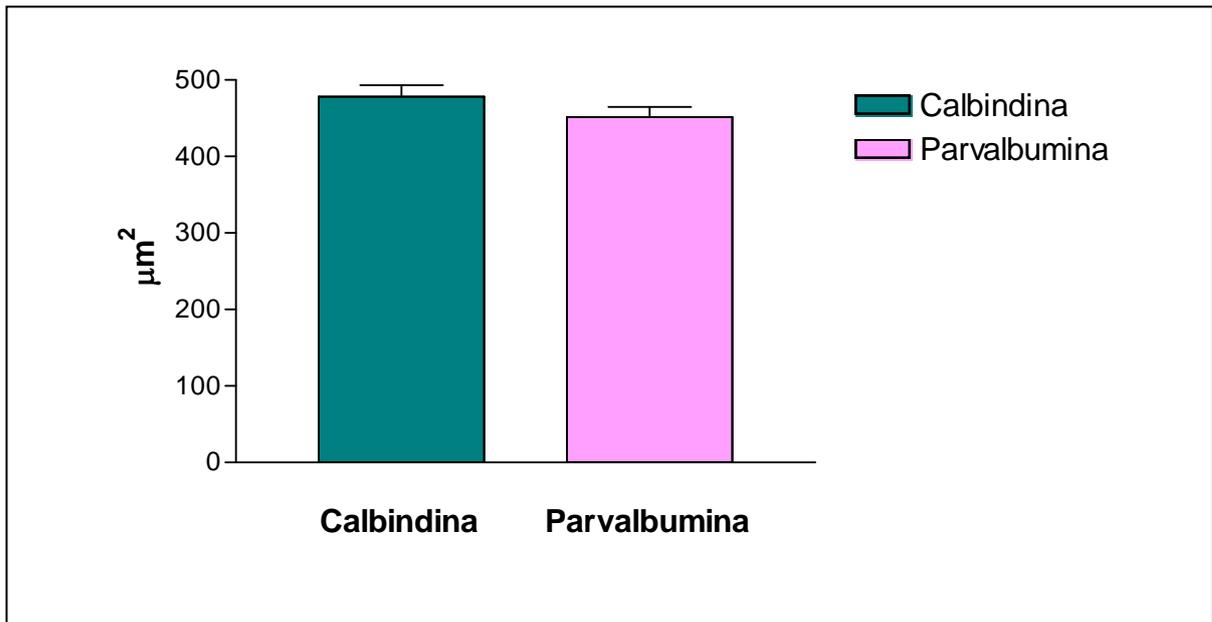
L'analisi statistica è stata effettuata considerando ciascun valore delle superfici di soma di 3 DRG per ciascun gruppo di animali, ed è stata effettuata mediante STUDENT'S T-TEST, "Unpaired t-test", fissando la soglia di significatività a  $p < 0,05$ .



**Figura 32.** Analisi immunoistochimica dei marcatori Calbindina e Parvalbumina. (a,c) CTRL Calbindina; (b,d) CTRL Parvalbumina; (e,g) BTZ Calbindina; (f,h) BTZ Parvalbumina.

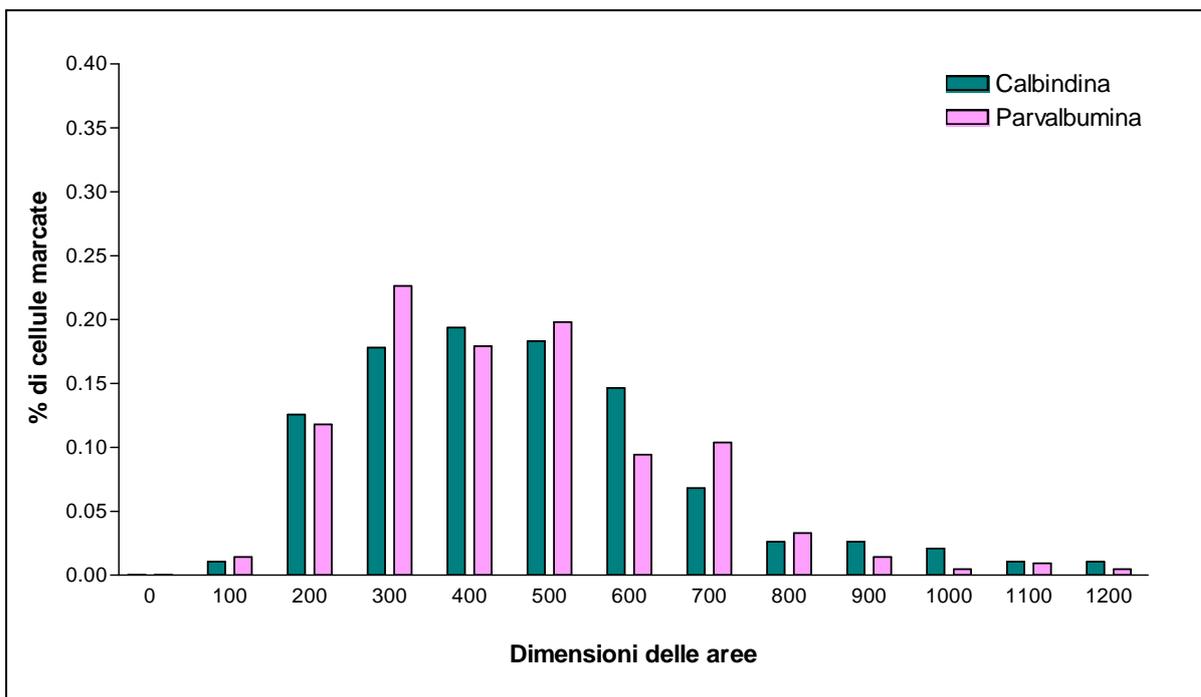
Animali controllo

Il grafico in fig. 33 riporta i valori medi ( $\pm$  Errore Standard) delle superfici somatiche dei neuroni dei DRG di animali di controllo immunomarcanti con calbindina e parvalbumina. Secondo l'analisi statistica dei dati, l'immunomarcatura con calbindina (istogramma verde) interessa neuroni con una superficie somatica di  $478,1 \pm 210,5 \mu\text{m}^2$  (26,9% di cellule marcate), mentre quella con parvalbumina (istogramma rosa) interessa cellule con una superficie somatica di  $451,5 \pm 193,5 \mu\text{m}^2$  (33,13% di cellule marcate).



**Figura 33.** Grafico delle medie ( $\pm$ errore standard) delle superfici somatiche dei neuroni sensitivi di 3 DRG. Animali di controllo immunomarcanti con calbindina (istogramma verde) e con parvalbumina (istogramma rosa).

Il grafico in fig. 34 riporta la distribuzione di frequenza dei neuroni immunomarcati con calbindina (istogramma verde) e parvalbumina (istogramma rosa).

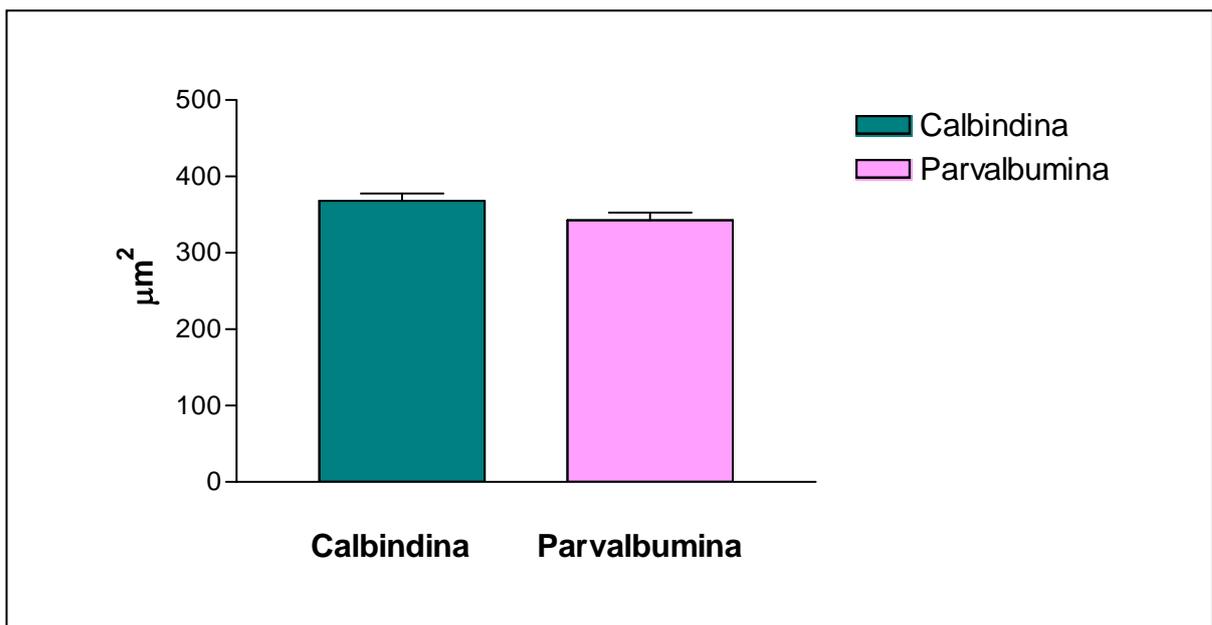


**Figura 34. Grafico della frequenza di distribuzione delle superfici somatiche dei neuroni sensitivi di 3 DRG.** Animali di controllo immunomarcati con calbindina (istogramma verde) e con parvalbumina (istogramma rosa).

Animali trattati con bortezomib

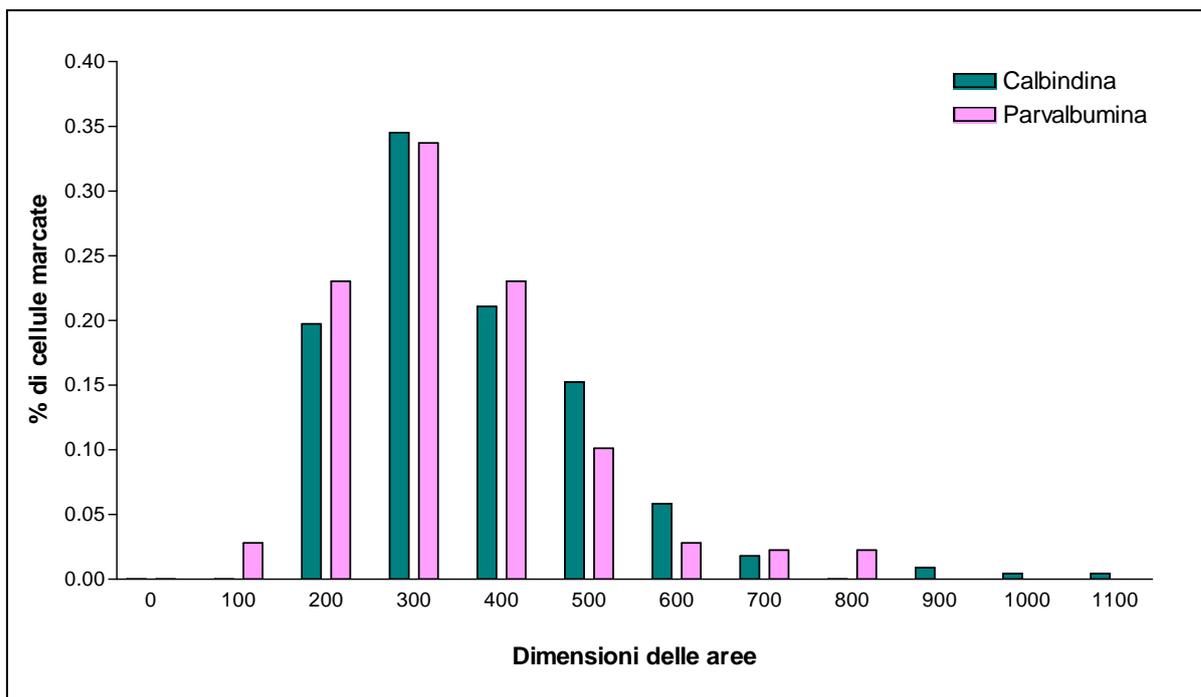
Il grafico in fig. 35 riporta i valori medi ( $\pm$  Errore Standard) delle superfici somatiche dei neuroni dei DRG di animali trattati con bortezomib immunomarcati con calbindina e parvalbumina.

Secondo l'analisi statistica dei dati, l'immunomarcatura con calbindina (istogramma verde) interessa neuroni con una superficie somatica di  $368,2 \pm 144,1 \mu\text{m}^2$  (21,16% di cellule marcate), mentre quella con parvalbumina (istogramma rosa) interessa cellule con una superficie somatica di  $342,6 \pm 136 \mu\text{m}^2$  (15,36% di cellule marcate).



**Figura 35. Grafico delle medie ( $\pm$ errore standard) delle superfici somatiche dei neuroni sensitivi di 3 DRG.** Animali trattati con bortezomib immunomarcati con calbindina (istogramma verde) e con parvalbumina (istogramma rosa).

Il grafico in fig. 36 riporta la distribuzione di frequenza dei neuroni immunomarcati con calbindina (istogramma verde) e parvalbumina (istogramma rosa).



**Figura 36. Grafico della frequenza di distribuzione delle superfici somatiche dei neuroni sensitivi di 3 DRG.** Animali trattati con bortezomib immunomarcati con calbindina (istogramma verde) e con parvalbumina (istogramma rosa).

I dati dell' esperimento 1 sono stati in parte pubblicati nel lavoro “Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies.” Carozzi V., Canta A, Oggioni N., **Sala B.**, Chiorazzi A., Meregalli C., Bossi M., Marmiroli P., Cavaletti G. Exp Neurol. 2010 Dec;226(2):301-9.

## DISCUSSIONE

Le neuropatie periferiche indotte da chemioterapici (CIPN dall'inglese *chemotherapy-induced peripheral neuropathies*) rappresentano uno dei fattori limitanti l'utilizzo di tali farmaci nella terapia antitumorale, in quanto spesso possono compromettere in modo significativo la qualità di vita dei pazienti. L'azione antineoplastica di tali farmaci, infatti, determina effetti tossici sul sistema nervoso periferico (SNP) il quale, però, possiede la capacità di rigenerarsi in seguito a lesione solo se il corpo cellulare dei neuroni rimane illeso anche dopo il termine della chemioterapia.

La sintomatologia associata alle CIPN dipende dal tipo di nervo interessato: i nervi sensitivi presentano un rischio maggiore di danno associato a chemioterapia rispetto ai nervi motori, dal momento che i farmaci utilizzati non sono in grado di passare la barriera ematoencefalica e raggiungere il sistema nervoso centrale (SNC).

I sintomi associati ad una neuropatia sensitiva sono generalmente sonnolenza, formicolii ed un aumento della sensibilità dolorosa.

La sintomatologia, però, non è sempre in grado di risolversi: nella maggior parte dei casi la neuropatia indotta da chemioterapici è solo parzialmente reversibile (Peltier e Russel, 2002).

I meccanismi coinvolti nell'insorgenza delle neuropatie periferiche sono ancora poco chiari, nonostante sia noto che la neurotossicità sia correlata alla dose, al tipo di farmaco utilizzato, al tumore e alla presenza di complicanze cliniche (Cata et al., 2006).

Nonostante gli effetti collaterali riscontrati, la terapia antitumorale si rende necessaria in patologie di estrema gravità e ad oggi non esistono terapie che possano sostituirla benché per una percentuale di pazienti, variabile a seconda della tipologia, del dosaggio e della durata della terapia, l'insorgenza della CIPN sia motivo di sospensione del trattamento chemioterapico (Windebank, 1999; Quasthoff e Hartung., 2002).

L'impegno della ricerca in questo senso è quindi rivolto sia allo studio dei meccanismi di neurotossicità indotti dai farmaci antineoplastici in modo da aumentare la selettività di quelli già in uso, sia allo studio di eventuali farmaci neuroprotettori da affiancare nella terapia antitumorale.

Attualmente, molti studi in letteratura (Jaggannath et al., 2004; Pace, 2005; Cavaletti et al., 2006) dimostrano che l'efficacia antitumorale di ciascun chemioterapico sia legata alla dose e al meccanismo d'azione della classe a cui esso appartiene; diversi studi inoltre hanno caratterizzato modelli *in vivo* in ratto di CIPN riproducendo gli effetti collaterali che possono

insorgere durante il trial clinico, al termine del ciclo di trattamento o progredire anche a distanza di tempo da esso. Al contrario, dati di letteratura che riguardano lo studio della neurotossicità dei composti chemioterapici in modelli murini di CIPN sono ad oggi molto scarsi. I modelli *in vivo*, infatti, sono necessari per riprodurre, e meglio comprendere, i meccanismi che sono alla base di alcune patologie all'interno di un organismo complesso e paragonabile a quello umano. I modelli animali di tossicità sono in grado di fornire informazioni riguardo la biodistribuzione del farmaco di interesse, che può pesantemente influire sull'attività ed efficacia del farmaco stesso, evidenziare, e successivamente caratterizzare, l'insorgenza di possibili effetti collaterali in determinati distretti corporei.

Tra i farmaci di ultima generazione, l'inibitore del proteasoma bortezomib, ha manifestato la comparsa di neurotossicità associata al trattamento inducendo una marcata neuropatia periferica dose-dipendente spesso accompagnata anche da dolore neuropatico che reverte, nella maggior parte dei pazienti, dopo la sospensione della terapia (Jaggannath et al., 2004; Cavaletti e Nobile-Orazio, 2007).

Bortezomib è un composto sintetico che inibisce in modo reversibile l'attività chimotriptica del proteasoma, in grado di inibire la proliferazione cellulare e indurre apoptosi nelle cellule di mieloma multiplo (Kane et al., 2006; Chari et al., 2010). Inoltre è coinvolto nei meccanismi di down-regolazione del pathway molecolare del fattore nucleare NFκB e nell'induzione intrinseca ed estrinseca di pathways di morte cellulare (Roccaro et al., 2006; Hideshima et al., 2011).

Trials clinici hanno dimostrato che bortezomib è in grado di indurre il 35% di risposta positiva in pazienti affetti da mieloma refrattario e recidivato quando viene utilizzato come singolo agente, mentre la risposta positiva è del 57% in associazione a desametasone e lenalidomide (Richardson et al., 2003, 2010).

La neuropatia periferica indotta da bortezomib è caratterizzata dalla comparsa di parestesia, sensazione di bruciore, disestesia, propriocezione ridotta e addormentamento degli arti. Inoltre i riflessi tendinei appaiono ridotti, mentre l'indebolimento motorio si manifesta generalmente ad un livello subclinico (Argyriou et al., 2008; Chaudhry et al., 2008). La neuropatia periferica da bortezomib è facilmente diagnosticabile seppur rimanga non chiara la sua patofisiologia. Il dolore neuropatico associato al trattamento con il farmaco (l'effetto collaterale più rilevante dal punto di vista clinico) viene attribuito alle alterazioni plastiche subite dalle fibre afferenti primarie o dalle loro sinapsi nel SNC. Tali alterazioni riguardano le funzioni dei centri del SNC coinvolti nell'elaborazione delle informazioni nocicettive ed

includono la sensibilizzazione periferica e centrale (Guilbaud et al., 1990; Cervero e Laird, 1996). Risulta ancora da chiarire se e come bortezomib causi alterazioni nei pathways sensitivi del SNC pur non attraversando la barriera ematoencefalica (Carozzi et al., 2013).

Il mieloma multiplo è una neoplasia sostenuta dalla proliferazione di un clone neoplastico di natura plasmacellulare. In particolare, le plasmacellule neoplastiche si accumulano nel midollo osseo e producono una proteina monoclonale che viene rilevata nel sangue o nelle urine (o in entrambi) e che causa un danno tissutale o un danno d'organo (Smith e Yong, 2013). L'ultima decade è stata caratterizzata da un avanzamento senza precedenti nella cura del mieloma multiplo sintomatico con l'introduzione di nuovi farmaci quali bortezomib (un inibitore del proteasoma), talidomide e lenalidomide (farmaci immunomodulatori). Questi composti rappresentano ad oggi il pilastro su cui si basa il trattamento contro tale patologia. Molti dei pazienti rispondono alla prima terapia ed entrano in un periodo di stabilità generalmente associata a una buona qualità di vita (Cavo et al., 2011). L'assenza di farmaci curativi rende inevitabile la ricaduta, ma almeno il 50% dei pazienti risponde una seconda volta al trattamento chemioterapico sia con gli stessi farmaci che con altri. Ulteriori ricadute diventano meno responsive ai trattamenti fino a che lo stadio di malattia refrattario porta a manifestazioni extramidollari e citopenia.

Precedentemente a questo lavoro, nel nostro laboratorio sono stati sviluppati modelli di CIPN in ratto indotta dal trattamento con bortezomib. Il primo modello è stato messo a punto attraverso la somministrazione di bortezomib (0,20 mg/Kg 3 volte a settimana per via endovenosa) in ratti Wistar per 4 settimane ed è stato in grado di evidenziare alcune caratteristiche patologiche quali la demielinizzazione e l'alterazione dei gangli delle radici dorsali (DRG) negli animali trattati, seppur non abbastanza severe da riprodurre la sintomatologia clinica (Cavaletti et al., 2007 a). Lo studio successivo ha previsto la somministrazione di bortezomib per 8 settimane, mantenendo la stessa frequenza e la stessa dose di trattamento. Le alterazioni patologiche riscontrate, tra cui la degenerazione assonale, sono state più rilevanti ed è stata accertata l'insorgenza di dolore neuropatico associato alla neuropatia periferica (Meregalli et al., 2010).

La messa a punto di un modello di CIPN nel ratto è sicuramente decisiva sia per caratterizzare l'entità degli effetti negativi dei composti antineoplastici sul SNP, sia per valutare in fase pre-clinica l'efficacia di farmaci neuroprotettori utilizzati per prevenire e/o contrastare l'effetto invalidante del trattamento chemioterapico in pazienti già di per sé

sofferenti. Tuttavia, poiché solamente un limitato numero di linee tumorali sono in grado di indurre lo sviluppo di tumori nel ratto, questo modello animale non rappresenta il mezzo più efficace per studiare, contemporaneamente e nel medesimo contesto sperimentale, l'attività antineoplastica e gli effetti neurotossici dei farmaci antineoplastici. Al contrario, diversi ceppi murini immunodeficienti, capaci di sviluppare tumori solidi di diversa origine, rappresentano non solo buoni modelli sperimentali per lo studio dei meccanismi legati all'attività dei composti antineoplastici e alla farmaco-resistenza dei tumori, ma anche per l'analisi concomitante dei loro effetti tossici.

Il lavoro svolto nell'ambito del percorso di Dottorato in Neuroscienze ha permesso di mettere a punto, attraverso una caratterizzazione neurofisiologica, istopatologica e comportamentale, quattro modelli murini (Balb/c, CD1, Hsd Hsd NuNu e Scid) di neuropatia periferica indotta dalla somministrazione dell'inibitore del proteasoma bortezomib. Il modello murino, infatti, grazie alla capacità di sviluppare tumori solidi in seguito all'inoculo di linee cellulari tumorali di diversa origine, rappresenta, al contrario del ratto, un contesto sperimentale che consente una concomitante analisi degli effetti collaterali dei composti antineoplastici, tra cui la neurotossicità periferica, e dei meccanismi legati alla loro efficacia antitumorale e alla farmacoresistenza. Nello stesso contesto è stato possibile utilizzare il modello murino messo a punto in topi Scid per procedere alla messa a punto di un modello di mieloma multiplo associato al trattamento con bortezomib per valutare contemporaneamente l'attività antineoplastica e neurotossica del farmaco.

In questo lavoro, il disegno sperimentale adottato è stato studiato con l'obiettivo di creare modelli di neuropatia periferica di tipo cronica, in grado di mimare ciò che in clinica avviene a pazienti in trattamento prolungato con farmaci chemioterapici.

I trattamenti farmacologici dei topi con bortezomib sono stati quindi eseguiti con due diverse schedule e si sono prolungati per quattro, cinque o sei settimane. Durante tale periodo è stata valutata la tossicità generale dei trattamenti farmacologici attraverso un controllo quotidiano della mortalità e dello stato di salute degli animali ed una misura bisettimanale del peso corporeo. Al termine del trattamento farmacologico è stata valutata la tossicità sul SNP attraverso analisi neurofisiologiche, rappresentate dalla misura della velocità di conduzione nervosa (VDC) nel fascio di nervi caudale (considerata di tipo misto, sia sensitiva che motoria), e nel nervo digitale (considerata puramente sensitiva), attraverso analisi morfologiche al microscopio ottico ed elettronico dei DRG e del nervo sciatico, attraverso analisi morfometriche dei neuroni dei DRG e del nervo sciatico. Inoltre, nel modello di

mieloma multiplo, è stata valutata l'azione antineoplastica di bortezomib attraverso il monitoraggio della crescita tumorale.

Come già accennato, nella prima fase di questo lavoro sono stati sviluppati quattro modelli di neuropatia periferica indotta da bortezomib utilizzando topi Balb/c, CD1, Hsd NuNu e Scid femmine (peso iniziale di 19-21 gr.) attraverso la conduzione di quattro esperimenti consecutivi.

Il primo esperimento ha previsto la somministrazione bisettimanale per un periodo di 4 settimane di bortezomib (0,8 mg/Kg) per via endovenosa in topi femmine Balb/c (peso iniziale di 19-21 gr.). Gli animali sottoposti a trattamento farmacologico non hanno manifestato segni di malessere. È stata osservata una riduzione statisticamente significativa del peso corporeo dopo la prima somministrazione (8% rispetto agli animali di controllo), seguita da un recupero e dalla successiva riduzione al termine del trattamento (10,65% rispetto agli animali di controllo).

Il secondo esperimento ha previsto la somministrazione bisettimanale per un periodo di 6 settimane di bortezomib (0,8 mg/Kg) per via endovenosa in topi femmine CD1 (peso iniziale di 19-21 gr.). Gli animali sottoposti a trattamento farmacologico non hanno manifestato segni di malessere ed hanno mostrato un incremento del peso corporeo seppur non paragonabile a quello degli animali di controllo (riduzione del 7,9% rispetto ai controlli).

Il terzo esperimento ha previsto la somministrazione bisettimanale per un periodo di 6 settimane di bortezomib (0,8 mg/Kg) per via endovenosa in topi femmine Hsd NuNu (peso iniziale di 19-21 gr.). Gli animali sottoposti a trattamento farmacologico non hanno manifestato segni di malessere ed hanno mostrato un incremento del peso corporeo paragonabile a quello degli animali di controllo.

Il quarto esperimento ha previsto la somministrazione bisettimanale per un periodo di 5 settimane di bortezomib (1 mg/Kg) per via endovenosa in topi femmine Scid (peso iniziale di 19-21 gr.). Gli animali sottoposti a trattamento farmacologico non hanno manifestato segni di malessere, ma è stata osservata una mortalità del 27%. È stata osservata una riduzione statisticamente significativa del peso corporeo dopo la prima somministrazione (7,32% rispetto agli animali di controllo), che si è protratta sino al termine del trattamento (8,17% rispetto agli animali di controllo).

Dal momento che i quattro esperimenti sono stati eseguiti separatamente e al fine di poter uniformare e quindi paragonare i risultati, abbiamo eseguito un confronto tra le alterazioni indotte da bortezomib nei diversi ceppi esprimendo ogni parametro quantitativo come variazione percentuale rispetto ai propri controlli non trattati.

Le valutazioni neurofisiologiche hanno evidenziato in tutti i ceppi una significativa riduzione, seppur di diversa entità, della conduzione dell'impulso nervoso negli animali sottoposti a trattamento farmacologico sia lungo il fascio di nervi caudale che lungo il nervo digitale, rispettivamente espressione di conduzione sensitivo/motoria e conduzione puramente sensitiva.

La VDC caudale ha evidenziato una maggiore tossicità associata a bortezomib nei topi Balb/c (riduzione della VDC del 27,3%) seguita da quella nei topi Scid (riduzione della VDC del 21,35%) e nei topi CD1 (riduzione della VDC del 20,3%). La minore tossicità è a carico dei topi Hsd NuNu nei quali la riduzione della VDC caudale è del 15,2%.

La VDC digitale ha invece evidenziato una maggiore tossicità nei topi CD1 (riduzione della VDC del 26,9%), leggermente superiore a quella riscontrata nei topi Scid (riduzione della VDC del 23,83%). Nei topi Balb/c la riduzione è stata del 17,9% mentre nei topi Hsd NuNu è stata del 13,5%.

La tossicità indotta da bortezomib sia nella conduzione dell'impulso nervoso di tipo sensitivo/motoria che nella conduzione di tipo sensitiva risulta statisticamente significativa in tutti e quattro i ceppi, seppur con delle evidenti differenze: queste potrebbero essere dovute alle differenze intrinseche esistenti tra i ceppi e di conseguenza a un effetto differente, seppur tossico, del farmaco.

Sebbene nel ratto i neuroni sensitivi dei DRG non mostrino evidenti alterazioni morfologiche dovute al trattamento con bortezomib e le cellule satellite risultino moderatamente alterate (Meregalli et al., 2012), abbiamo deciso di procedere con le valutazioni morfologiche al microscopio ottico e, per quanto riguarda il primo esperimento, anche al microscopio elettronico che hanno messo in evidenza alterazioni a carico dei neuroni sensitivi e delle cellule satellite.

In tutti e quattro i ceppi bortezomib ha provocato la degenerazione da moderata a severa dei neuroni sensitivi dei DRG e delle cellule satellite; nei topi Balb/c la microscopia elettronica ha evidenziato la presenza di citoplasma condensato circondato da cellule satelliti degenerate con l'estensione dello spazio intercellulare.

Al fine di confermare questo dato è stata effettuata l'analisi morfometrica sui neuroni dei DRG. Questa analisi consiste in una misura della dimensione delle superfici di soma, nucleo e nucleolo dei neuroni sensitivi dei DRG e ha dimostrato che il trattamento con bortezomib provoca un inusuale aumento statisticamente significativo delle superfici nucleolari di tutti e quattro i ceppi, un aumento statisticamente significativo delle superfici somatiche nei topi Balb/c, Hsd NuNu e Scid e l'aumento statisticamente significativo delle superfici

nucleari nei topi Balb/c. Il confronto delle misurazioni dell'analisi morfometrica dei neuroni dei DRG ha messo in luce che il maggior aumento delle superfici nucleolari è riscontrato nei topi Scid (27,1% rispetto agli animali di controllo), seguito dai Balb/c (19,9%), dai CD1 16,6% e dagli Hsd NuNu (15,9%). L'aumento delle superfici somatiche è pressoché identico nei topi Hsd NuNu e Scid (rispettivamente 15,9% e 15,4%) ed è inferiore nei topi Balb/c (11,1%).

Questo dato inusuale e inaspettato, che non ha riscontri in letteratura, ci ha spinto alle ulteriori indagini che sono state effettuate nella terza fase di questo lavoro e che verranno discusse successivamente.

Dal momento che nel ratto bortezomib ha causato una moderata assonopatia, mentre la degenerazione della mielina è stata osservata raramente (Meregalli et al., 2012), abbiamo effettuato l'analisi morfologica del nervo sciatico al microscopio ottico e, per quanto riguarda il primo esperimento, anche al microscopio elettronico.

Anche in questo caso in tutti e quattro i ceppi bortezomib ha provocato la degenerazione assonale delle fibre mieliniche da moderata a severa; inoltre nei topi Balb/c è stata confermata al microscopio elettronico la degenerazione assonale ed è stata evidenziata la presenza di fibre mieliniche con vacuolizzazione assonale e disorganizzazione delle fibre assoplasmatiche.

Sempre nel modello in ratto di Meregalli e colleghi, è risultata evidente l'insorgenza di dolore neuropatico dovuto al trattamento con bortezomib (Meregalli et al., 2012). Attraverso l'utilizzo del dynamic test è stata indagata la misura della soglia allodinica (percezione dolorosa di uno stimolo meccanico non doloroso) associata a bortezomib: in tutti e quattro i ceppi è stata riscontrata una riduzione dei valori di latenza di risposta rispetto agli animali di controllo che è risultata statisticamente significativa solo nei topi CD1 e nei topi Scid (rispettivamente con una riduzione del 29,1% e del 22,1%).

I risultati ottenuti nel complesso ci hanno portato a concludere che il modello messo a punto nei topi Scid è in grado di riprodurre al meglio le condizioni patologiche osservate in clinica in pazienti neuropatici in terapia con bortezomib e che risulta essere più idoneo per essere utilizzato come standard di riferimento per la messa a punto di un modello murino di mieloma multiplo associato al trattamento chemioterapico. Inoltre questi risultati confermano che, nell'ottica della creazione di un modello di patologia cronica, il dosaggio da noi scelto (1 mg/Kg) è compatibile con la sopravvivenza degli animali a lungo termine.

I gruppi di ricerca che in passato si sono dedicati allo studio del mieloma multiplo hanno focalizzato la loro attenzione sulla messa a punto di un modello idoneo per lo studio dei meccanismi di insorgenza della patologia.

Nella seconda fase di questo lavoro è stato messo a punto un modello murino di mieloma multiplo (inoculo sottocute di  $1 \times 10^6$  cellule della linea cellulare di mieloma multiplo RPMI 8226) in topi femmine Scid (peso iniziale 19-21 gr.) che ha previsto la somministrazione per via endovenosa di bortezomib alla dose di 1mg/Kg una volta a settimana per 5 settimane.

Dal momento che i dati ottenuti precedentemente nei topi Scid sono stati espressi come variazione percentuale rispetto ai propri controlli non trattati, al fine di poter paragonare i risultati ottenuti anche i dati di questa seconda fase sono stati espressi nello stesso modo.

Sia gli animali portatori di mieloma multiplo che quelli sottoposti a trattamento farmacologico non hanno manifestato segni di malessere. È stato osservato un incremento del peso corporeo costante nel tempo fino alla terza settimana in entrambi i gruppi; durante la quarta settimana gli animali solo portatori di mieloma hanno manifestato una lieve riduzione del peso mentre gli animali sottoposti a trattamento farmacologico hanno mostrato un lieve incremento.

Le valutazioni neurofisiologiche hanno evidenziato nel gruppo di animali sottoposto a trattamento una significativa riduzione della conduzione dell'impulso nervoso sia lungo il fascio di nervi caudale che lungo il nervo digitale, rispettivamente espressione di conduzione sensitivo/motoria e conduzione puramente sensitiva. Al contrario, il gruppo di animali portatori di mieloma multiplo ha manifestato una riduzione statisticamente significativa solo della conduzione dell'impulso nervoso nel nervo digitale.

Nello specifico la VDC caudale ha evidenziato la tossicità solo a carico di bortezomib (riduzione del 27,1% rispetto ai topi di controllo e del 24,6% rispetto ai topi portatori di mieloma) mentre la VDC digitale ha mostrato una tossicità associata alla presenza di mieloma multiplo (riduzione del 14,21% rispetto ai controlli) incrementata negli animali sottoposti a trattamento con bortezomib (riduzione del 19,1% rispetto ai controlli).

Le valutazioni morfologiche dei neuroni sensitivi dei DRG hanno confermato le alterazioni sia a carico dei neuroni sensitivi che delle cellule satellite negli animali sottoposti a trattamento. Inoltre è risultata evidente la degenerazione neuronale provocata dal mieloma multiplo.

Per valutare la gravità del danno a carico dei neuroni sensitivi dei DRG è stata effettuata l'analisi morfometrica. Per quanto riguarda gli animali portatori di mieloma multiplo e sottoposti a trattamento con bortezomib è stato confermato il dato ottenuto nei topi Scid della

fase precedente con l'aumento statisticamente significativo delle superfici somatiche (15,36% rispetto ai controlli) e nucleolari (16,75%), mentre negli animali solo portatori di mieloma è risultata statisticamente significativa la riduzione delle superfici somatiche (12,91%), nucleari (11,84%) e nucleolari (17,24%). Secondo i dati dell'analisi morfometrica sembrerebbe essere evidente il ruolo del mieloma multiplo nella degenerazione neuronale osservata a livello morfologico, inoltre la riduzione della superficie nucleolare ad esso associata potrebbe aver contrastato l'aumento delle superfici nucleolari associate al trattamento con bortezomib, risultato statisticamente significativo ma in percentuale ridotta rispetto all'aumento riscontrato nei topi utilizzati nella prima fase di questo lavoro e sottoposti solo a trattamento chemioterapico.

L'analisi morfologica del nervo sciatico al microscopio ottico ha evidenziato la degenerazione assonale delle fibre mieliniche sia negli animali portatori solo di mieloma multiplo che in quelli sottoposti a trattamento con bortezomib.

Per quantificare il danno subito dal nervo sciatico è stata eseguita l'analisi morfometrica che consiste nella misura dei diametri degli assoni e delle fibre e del loro rapporto. Bortezomib da solo (esperimento 4 della prima fase di questo lavoro) ha provocato un aumento statisticamente significativo della *g-ratio* (rapporto tra il diametro dell'assone e il diametro della fibra), mentre ha causato solo una lieve tendenza alla riduzione della *myelin thickness* (spessore della guaina mielinica). Quest'ultimo dato risulta non completamente in accordo con quello riportato nel lavoro di Bruna e colleghi (Bruna et al., 2010) nel quale la riduzione dello spessore della guaina mielinica dovuto a bortezomib risulta statisticamente significativo: questo potrebbe essere dovuto al fatto che si tratta di un ceppo diverso e di una scheda di trattamento differente (0,8 mg/Kg due volte a settimana per 6 settimane somministrato sottocute). Negli animali portatori di mieloma multiplo l'aumento della *g-ratio* e la riduzione della *myelin thickness* sono risultati statisticamente significativi e negli animali sottoposti anche a trattamento farmacologico tale aumento e tale riduzione sono risultati incrementati. Questi dati indicano l'insorgenza di mielinopatia sia negli animali portatori di mieloma multiplo che in quelli sottoposti a trattamento chemioterapico.

Questi risultati possono avallare l'ipotesi secondo cui il mieloma multiplo può causare da solo neurotossicità periferica (ipotesi che potrebbe essere confermata anche dalla riduzione della VDC digitale dovuta al mieloma multiplo) che viene peggiorata dall'effetto sinergico di bortezomib.

La valutazione della comparsa di allodinia meccanica ha confermato il ruolo di bortezomib nell'insorgenza di dolore neuropatico (riduzione dei valori di latenza di risposta rispetto ai controlli del 14,53%), non associato invece al mieloma multiplo.

Per valutare l'efficacia dell'azione antineoplastica di bortezomib è stata valutata la crescita della massa tumorale settimanalmente: il rallentamento della crescita dovuto all'azione di bortezomib è risultato statisticamente significativo sin dalla prima somministrazione. Sebbene l'indagine dell'azione antineoplastica del farmaco sia stata condotta in maniera del tutto differente dai metodi utilizzati da Fryer e colleghi (Fryer et al., 2013) i quali hanno valutato la bioluminescenza delle cellule di mieloma transfettate con l'enzima luciferasi, i livelli di paraproteine nel siero e la quantificazione della massa tumorale attraverso l'utilizzo della risonanza magnetica, i nostri dati possono comprovare l'efficacia di bortezomib nel trattamento del mieloma multiplo.

Al termine di questa seconda fase di sperimentazione possiamo affermare di aver messo a punto un buon modello di mieloma multiplo che è in grado di riprodurre al meglio sia le condizioni patologiche osservate in clinica nei pazienti che le condizioni neuropatiche associate al trattamento con bortezomib.

La terza fase di questo lavoro è stata incentrata sull'approfondimento dei risultati anomali ottenuti con l'analisi morfometrica dei neuroni sensitivi dei DRG nelle prime due fasi.

Per motivare l'anomalo aumento delle superfici somatiche, nucleari e nucleolari dei neuroni sensitivi dei DRG degli animali trattati con bortezomib, la prima ipotesi fatta è stata quella di un possibile danno a carico della sottopopolazione di neuroni piccoli che portasse a una sovrastima della sottopopolazione di neuroni grandi.

Dopo un'accurata ricerca bibliografica, sono stati identificati due trasportatori del  $\text{Ca}^{2+}$ , calbindina e parvalbumina, rispettivamente marcatori dei neuroni piccoli ( $504 \pm 7 \mu\text{m}^2$ ) e dei neuroni grandi ( $1094 \pm 12 \mu\text{m}^2$ ) (Honda, 1995).

Sono state effettuate analisi immunohistochimiche dei neuroni sensitivi dei DRG dei topi CD1 (esperimento 2) per procedere successivamente all'analisi morfometrica delle superfici somatiche dei neuroni marcati in cui risultasse visibile la struttura nucleolare.

Inaspettatamente, i risultati ottenuti da questa analisi hanno evidenziato la marcatura di sottopopolazioni di superficie simili tra loro sia nei controlli (calbindina  $478,1 \pm 210,5 \mu\text{m}^2$  e parvalbumina  $451,5 \pm 193,5 \mu\text{m}^2$ ) che nei trattati (calbindina  $368,2 \pm 144,1 \mu\text{m}^2$  e parvalbumina  $342,6 \pm 136 \mu\text{m}^2$ ). Il fatto che i due trasportatori non siano utili per discriminare le due

sottopopolazioni in studio non ci permette di validare la nostra prima ipotesi, ma l'osservazione che ci siano delle differenze di marcatura tra i controlli e i trattati ci ha portato ad effettuare una conta cellulare dei neuroni sensitivi marcati per verificare un'eventuale differenza di distribuzione dovuta ai due marcatori. Le cellule marcate con calbindina nei controlli risultano essere il 26,9% delle cellule totali marcate, mentre quelle marcate con parvalbumina rappresentano il 33,13%. Negli animali sottoposti a trattamento con bortezomib rimane pressoché costante la percentuale di cellule marcate con calbindina (21,16% delle cellule marcate totali), mentre risulta particolarmente ridotto il numero di cellule marcate con parvalbumina (15,36% delle cellule totali marcate).

Questo dato risulta di particolare interesse, non solo dal punto di vista dell'utilizzo dei due marcatori che non sembrano avere il ruolo descritto in letteratura, ma per il fatto che sembra comunque sussistere una differenza notevole tra gli animali di controllo e gli animali sottoposti a trattamento con bortezomib immunomarcanti con parvalbumina. Questo risultato costituisce il punto di partenza per un'ulteriore indagine che coinvolga l'uso di altri marcatori neuronali al fine di valutare il ruolo di calbindina e parvalbumina nei neuroni sensitivi dei DRG e che permetta di capire il meccanismo che sta alla base dell'aumento anomalo, in particolare, delle superfici nucleolari negli animali trattati con bortezomib.

Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare di aver messo a punto un modello murino di CIPN che mima la somministrazione cronica di bortezomib utilizzata in clinica. Il nostro modello è servito come base per lo sviluppo di nuovi disegni sperimentali volti allo studio dell'attività antineoplastica di un farmaco in presenza di una massa tumorale.

Questo lavoro proseguirà con ulteriori studi che, in generale, avranno l'obiettivo di:

√ Valutare l'eventuale neuroprotezione di un farmaco.

√ Studiare l'effetto combinato di un farmaco antineoplastico e di un farmaco neuroprotettore al fine di valutare l'attività del chemioterapico, determinare l'attività di neuroprotezione di alcuni farmaci e verificare che il loro uso combinato non comporti la perdita di efficacia dell'antineoplastico.

√ Chiarire i meccanismi coinvolti nella degenerazione dei neuroni sensitivi dei DRG causata da bortezomib.

## **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 Research, 1999

Adams J.

Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer.  
Drug Discovery Today, 2003

Adams J, Kauffman M.

Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib).  
Cancer Investigation, 2004

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.  
Clinical Cancer Research, 2002

Alsina M, Boyce B, Devlin RD, Anderson JL, Craig F, Mundy GR, Roodman GD.

Development of an in vivo model of human multiple myeloma bone disease.  
Blood, 1996

Argyriou AA, Iconomou G, Kalofonos HP.

Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature.

Blood, 2008

Aronson LI, Davies FE.

DangER: protein overERload. Targeting protein degradation to treat myeloma.  
Haematologica, 2012

Authier N.

Description of short-term taxol induce nociceptive neuropathy in rats.  
Brain Research, 2000

Bergsagel PL, Mateos MV, Gutierrez NC, Rajkumar SV, San Miguel JF.

Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma.

Blood, 2013

Bird JM, Owen RG, D'Sa S, Snowden JA, Pratt G, Ashcroft J, Yong K, Cook G, Feyler S, Davies F, Morgan G, Cavenagh J, Low E, Behrens J; Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology (BCSH) and UK Myeloma Forum.

Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011.

British Journal of Haematology, 2011

Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW, Heiss C, Benner A, Hose D, Moos M, Bila J, Bartram CR, Ho AD, Goldschmidt H, Jauch A, Schonland SO.

Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability.

Blood, 2008

Boyd M.R., Paull K.D.

Some practical considerations and applications of the national cancer institute in vitro anticancer drug discovery screen.

Drug Development Research, 1995

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.

Experimental Neurology, 2010

Cao B, Mao X.

The ubiquitin-proteasomal system is critical for multiple myeloma: implications in drug discovery.

American Journal of Blood Research, 2011

Carozzi VA, Canta A, Oggioni N, Sala B, Chiorazzi A, Meregalli C, Bossi M, Marmiroli P, Cavaletti G.

Neurophysiological and neuropathological characterization of new murine models of chemotherapy-induced chronic peripheral neuropathies.

Experimental Neurology, 2010

Carozzi VA, Renn CL, Bardini M, Fazio G, Chiorazzi A, Meregalli C, Oggioni N,

Shanks K, Quartu M, Serra MP, Sala B, Cavaletti G, Dorsey SG.

Bortezomib-induced painful peripheral neuropathy: an electrophysiological, behavioral, morphological and mechanistic study in the mouse.

PLoS One, 2013

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.

Neurotoxicity Research, 2010

Cata JP, Weng HR, Lee BN, Reuben JM, Dougherty PM.

Clinical and experimental findings in humans and animals with chemotherapy-induced peripheral neuropathy.

Minerva Anestesiologica, 2006

Cavaletti G., Tredici G., Marmiroli P., Petruccioli M.G., Barajon I., Fabbrica D.

Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats.

Acta Neuropathologica, 1992

Cavaletti G., Cavalletti E., Montaguti P., Oggioni N., De Negri O., Tredici G.

Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat.

Neurotoxicology, 1997

Cavaletti G., Marmiroli P.

Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity.

Expert Opinion in Drug Safety, 2004

Cavaletti G., Marmiroli P., Tredici G.

Neuropatie periferiche e tumore.

Neurol Sci., 2006

Cavaletti G, Gilardini A, Canta A, Rigamonti L, Rodriguez-Menendez V, Ceresa C, Marmiroli P, Bossi M, Oggioni N, D'Incalci M, De Coster R.

Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat.

Experimental Neurology, 2007 (a)

Cavaletti G., Nobile-Orazio E.

Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: still far from a painless gain.

Haematologica, 2007 (b)

Cavo M, Rajkumar SV, Palumbo A, Moreau P, Orlowski R, Bladé J, Sezer O, Ludwig H, Dimopoulos MA, Attal M, Sonneveld P, Boccadoro M, Anderson KC, Richardson PG, Bensinger W, Johnsen HE, Kroeger N, Gahrton G, Bergsagel PL, Vesole DH, Einsele H, Jagannath S, Niesvizky R, Durie BG, San Miguel J, Lonial S; International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation.

Blood, 2011

Celio MR.

Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system.

Neuroscience, 1990

Cervero F, Laird JM.

Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model.

Pain, 1996

Chari A, Mazumder A, Jagannath S.

Proteasome inhibition and its therapeutic potential in multiple myeloma.

Biologics, 2010

Chaudhry V, Cornblath DR, Polydefkis M, Ferguson A, Borrello I.

Characteristics of bortezomib- and thalidomide-induced peripheral neuropathy. J

Journal of the Peripheral Nervous System, 2008

Chauhan D, Hideshima T, Mitsiades C, Richardson P, Anderson KC.

Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma.

Molecular Cancer Therapeutics, 2005

Conticello C, Giuffrida R, Adamo L, Anastasi G, Martinetti D, Salomone E, Colarossi C, Amato G,

Gorgone A, Romano A, Iannolo G, De Maria R, Giustolisi R, Gulisano M, Di Raimondo F.

NF- $\kappa$ B localization in multiple myeloma plasma cells and mesenchymal cells.

Leukemia Research, 2011

Cranford C.S., Hossy Kalainov D.M, Hartigan B.J.

Carpal tunnel syndrome.

The Journal of the American Academy of the Orthopaedic Surgeons, 2007

Di Raimondo F, Conticello C.

Captivating bortezomib: an active but still mysterious drug.

Leukemia Research, 2010

Feo-Zuppari FJ, Taylor CW, Iwato K, Lopez MH, Grogan TM, Odeleye A, Hersh EM, Salmon SE.

Long-term engraftment of fresh human myeloma cells in SCID mice.

Blood, 1992

Fryer RA, Graham TJ, Smith EM, Walker-Samuel S, Morgan GJ, Robinson SP, Davies FE.

Characterization of a novel mouse model of multiple myeloma and its use in preclinical therapeutic assessment.

PLoS One, 2013

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.

Journal of Cellular Biochemistry, 2008

Gadó K, Silva S, Pálóczi K, Domján G, Falus A.

Mouse plasmacytoma: an experimental model of human multiple myeloma.

Haematologica, 2001

Gareau C, Fournier MJ, Filion C, Coudert L, Martel D, Labelle Y, Mazroui R.

p21(WAF1/CIP1) upregulation through the stress granule-associated protein CUGBP1 confers resistance to bortezomib-mediated apoptosis.

PLoS One, 2011

Gomez-Bougie P, Wuillème-Toumi S, Ménoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, Bataille R, Amiot M.

Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma.

Cancer Research, 2007

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J.

International staging system for multiple myeloma.

Journal of Clinical Oncology, 2005

Guilbaud G, Benoist JM, Jazat F, Gautron M.

Neuronal responsiveness in the ventrobasal thalamic complex of rats with an experimental peripheral mononeuropathy.

Journal of Neurophysiology, 1990

Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC.

Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells.

Blood, 2009

Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC.

Mechanism of action of proteasome inhibitors and deacetylase inhibitors and the biological basis of synergy in multiple myeloma.

Molecular Cancer Therapeutics, 2011

Hoang B, Benavides A, Shi Y, Frost P, Lichtenstein A.

Effect of autophagy on multiple myeloma cell viability.

Molecular Cancer Therapeutics, 2009

Honda C.N.

Differential distribution of calbindin-D28k and parvalbumin in somatic and visceral sensory neurons.

Neuroscience, 1995

International Myeloma Working Group.

Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group.

British Journal of Haematology, 2003

Jagannath S., Barlogie B., Berenson J., Siegel D., Irwin D., Richardson P.G., Niesvizky R., Alexanian R., Limentani S.A., Alsina M., Adams J., Kauffman M., Esseltine D.L., Schenkein D.P., Anderson K.C.

A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma.

British Journal of Haematology, 2004

Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R.

United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy.

Clinical Cancer Research, 2006

Kariyawasan CC, Hughes DA, Jayatillake MM, Mehta AB.

Multiple myeloma: causes and consequences of delay in diagnosis.

QJM, 2007

Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che XF, Naito M, Itoh M, Tomoda A. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress.

International Journal of Oncology, 2011

Kondagunta GV, Drucker B, Schwartz L, Bacik J, Marion S, Russo P, Mazumdar M, Motzer RJ. Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma.

Journal of Clinical Oncology, 2004

Kropff M, Bisping G, Wenning D, Berdel WE, Kienast J.

Proteasome inhibition in multiple myeloma.

European Journal of Cancer, 2006

Kumar S, Flinn I, Richardson PG, Hari P, Callander N, Noga SJ, Stewart AK, Turturro F, Rifkin R, Wolf J, Estevam J, Mulligan G, Shi H, Webb IJ, Rajkumar SV.

Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma.

Blood, 2012

Kuwabara S.

Guillain-Barré syndrome: epidemiology, pathophysiology and management.

Drugs, 2004

Meier T., Meyer M.

Peripheral neuropathy with monoclonal gammopathy.

Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 1990

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.

European Journal of Pain, 2010

Meregalli C, Ceresa C, Canta A, Carozzi VA, Chiorazzi A, Sala B, Oggioni N, Lanza M, Letari O, Ferrari F, Avezza F, Marmiroli P, Caselli G, Cavaletti G.

CR4056, a new analgesic I2 ligand, is highly effective against bortezomib-induced painful neuropathy in rats.

Journal of Pain Research, 2012

Miyakawa Y, Ohnishi Y, Tomisawa M, Monnai M, Kohmura K, Ueyama Y, Ito M, Ikeda Y, Kizaki M, Nakamura M.

Establishment of a new model of human multiple myeloma using NOD/SCID/gammac(null) (NOG) mice.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004

Mitsiades CS, Mitsiades NS, Bronson RT, Chauhan D, Munshi N, Treon SP, Maxwell CA, Pilarski L, Hideshima T, Hoffman RM, Anderson KC.

Fluorescence imaging of multiple myeloma cells in a clinically relevant SCID/NOD in vivo model: biologic and clinical implications.

Cancer Research, 2003

Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C,

Joseph M, Libermann TA, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC.

Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells.

Proceedings of the National Academy of Science of the U S A., 2002

National Cancer Intelligence Network. Routes to diagnosis, 2006-2008.

NCIN information supplement, 2012.

[http://www.ncin.org.uk/publications/routes\\_to\\_diagnosis](http://www.ncin.org.uk/publications/routes_to_diagnosis)

Obeng EA, Carlson LM, Gutman DM, Harrington WJ Jr, Lee KP, Boise LH.

Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells.

Blood, 2006

Oranger A, Carbone C, Izzo M, Grano M.

Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease.

Clinical & Developmental Immunology, 2013

Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA, Soignet SL.

Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies.

Journal of Clinical Oncology, 2002

Ozturk G., Erdogan E., Anlar O., Kosem M., Taspinar M.

Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice.

Cytokine, 2004

Pace A.

Neuropatie da farmaci: criteri diagnostici e neuroprotezione

Neurol. Sci., 2005

Palumbo A, Sezer O, Kyle R, Miguel JS, Orlowski RZ, Moreau P, Niesvizky R, Morgan G, Comenzo R, Sonneveld P, Kumar S, Hajek R, Giralt S, Brinchen S, Anderson KC, Richardson PG, Cavo M, Davies F, Bladé J, Einsele H, Dimopoulos MA, Spencer A, Dispenzieri A, Reiman T, Shimizu K, Lee JH, Attal M, Boccadoro M, Mateos M, Chen W, Ludwig H, Joshua D, Chim J, Hungria V, Turesson I, Durie BG, Lonial S; IMWG.

International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation.

Leukemia, 2009

Palumbo A, Brinchen S, Rossi D, Cavalli M, Larocca A, Ria R, Offidani M, Patriarca F, Nozzoli C, Guglielmelli T, Benevolo G, Callea V, Baldini L, Morabito F, Grasso M, Leonardi G, Rizzo M, Falcone AP, Gottardi D, Montefusco V, Musto P, Petrucci MT, Ciccone G, Boccadoro M. 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.

Journal of Clinical Oncology, 2010

Peltier A.C., Russell J.W.

Recent advances in drug-induced neuropathies.

Current Opinion in Neurology, 2002

Postma T.J., Vermorken J.B., Liefing A.J., Pinedo H.M., Heimans J.J.

Paclitaxel-induced neuropathy.

Annals of Oncology, 1995

Quasthoff S., Hartung H.P.

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy.

Journal of Neurology, 2002

Radl J, De Glopper ED, Schuit HR, Zurcher C.

Idiopathic paraproteinemia. II. Transplantation of the paraprotein-producing clone from old to young C57BL/KaLwRij mice.

Journal of Immunology, 1979

Rebouissou C, Wijdenes J, Autissier P, Tarte K, Costes V, Liautard J, Rossi JF, Brochier J, Klein B.

A gp130 interleukin-6 transducer-dependent SCID model of human multiple myeloma.

Blood, 1998

Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orłowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC.

A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma.

The New England Journal of Medicine, 2003

Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma.

The New England Journal of Medicine, 2005

Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S, Wen PY, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Siegel DS, Irwin D, Schuster M, Srkalovic G, Alexanian R, Rajkumar SV, Limentani S, Alsina M, Orłowski RZ, Najarian K, Esseltine D, Anderson KC, Amato AA.

Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib.

Journal of Clinical Oncology, 2006

Richardson PG, Weller E, Lonial S, Jakubowiak AJ, Jagannath S, Raje NS, Avigan DE, Xie W, Ghobrial IM, Schlossman RL, Mazumder A, Munshi NC, Vesole DH, Joyce R, Kaufman JL, Doss D, Warren DL, Lunde LE, Kaster S, Delaney C, Hideshima T, Mitsiades CS, Knight R, Esseltine DL, Anderson KC.

Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma.

Blood, 2010

Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, Kumar S, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Ribatti D, Nico B, Vacca A, Dammacco F, Richardson PG, Anderson KC.

Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells.

Cancer Research, 2006

Romano A, Conticello C, Di Raimondo F.

Bortezomib for the treatment of previously untreated multiple myeloma.

Immunotherapy, 2013

Ruschak AM, Slassi M, Kay LE, Schimmer AD.

Novel proteasome inhibitors to overcome bortezomib resistance.

Journal of the National Cancer Institute, 2011

Rushton W.A.

A theory of the effects of fibre size in medullated nerve.

The Journal of Physiology, 1951

San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG; VISTA Trial Investigators.

Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma.

The New England Journal of Medicine, 2008

Singleton J.R.

Evaluation and treatment of painful peripheral polyneuropathy.

Seminars in Neurology, 2005

Smith D, Yong K.

Multiple myeloma.

BMJ, 2013

Smith RS, Koles ZJ.

Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity.

The American Journal of Physiology, 1970

Suzuki H, Yasukawa K, Saito T, Goitsuka R, Hasegawa A, Ohsugi Y, Taga T, Kishimoto T.

Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo.

European Journal of Immunology, 1992

Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J.

The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy.

Clinical Cancer Research, 1999

Tong AW, Huang YW, Zhang BQ, Netto G, Vitetta ES, Stone MJ.

Heterotransplantation of human multiple myeloma cell lines in severe combined immunodeficiency (SCID) mice.

Anticancer Research, 1993

Tsunenari T, Koishihara Y, Nakamura A, Moriya M, Ohkawa H, Goto H, Shimazaki C, Nakagawa M, Ohsugi Y, Kishimoto T, Akamatsu K.

New xenograft model of multiple myeloma and efficacy of a humanized antibody against human interleukin-6 receptor.

Blood, 1997

Ugalde V., Rosen B.S.

Ischemic peripheral neuropathy.

Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America, 2001

Verdù E., Vilches J., Rodriguez F. J., Ceballos D., Valero A., Navarro X.

Physiological and immunohistochemical characterization of cisplatin-induced neuropathy in mice.

Muscle and nerve, 1999

Warzok R., Wattig B.

Systematic classification of the disorders of the peripheral nervous system.

Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie, 1990

Windebank AJ.

Chemotherapeutic neuropathy.

Current Opinion in Neurology, 1999

Winer J.B.

Guillain-Barré syndrome.

BMJ., 2008

## **PUBBLICAZIONI**

Nel corso dei tre anni di Scuola di Dottorato in Neuroscienze, il lavoro svolto nell'ambito di questo progetto ha portato alla stesura di alcuni lavori scientifici, in parte pubblicati, in parte in via di pubblicazione ed in parte in stesura.

Qui di seguito vengono riportati i dettagli delle referenze:

### *Pubblicazioni*

- Carozzi V.A., 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. Experimental Neurology, 2010

### *Presentazioni a congressi*

- Carozzi V.A., Canta A., Oggioni N., **Sala B.**, Meregalli C., Chiorazzi A., Bossi M., Cavaletti G. "CHARACTERIZATION OF NEW MURINE MODELS OF PERIPHERAL NEUROPATHY INDUCED BY CHRONIC ADMINISTRATION OF ANTINEOPLASTIC DRUGS." Joint meeting UK-ITA, British Peripheral Nerve Society & gruppo di Studio Sistema Nervoso Periferico, Trieste 8-10 aprile 2010. (Journal of the Peripheral Nervous System – JPNS, volume 15, Supplement 1, June 2010).
- Carozzi V.A., Canta A., Oggioni N., **Sala B.**, Meregalli C., Chiorazzi A., Bossi M., Cavaletti G. "CHARACTERIZATION OF NEW MURINE MODELS OF PERIPHERAL NEUROPATHY INDUCED BY CHRONIC ADMINISTRATION OF ANTINEOPLASTIC DRUGS." American Association for Cancer Research – AACR 101st Annual Meeting 2010, Washington DC 17-21 aprile 2010.

- **Sala B.**, Chiorazzi A., Carozzi V., Oggioni N., Pisano C., Vesci L., Foderà R., Cavaletti G.. “EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ACETYLE-L-CARNITINE IN MYELOMA-BEARING MICE TREATED WITH BORTEZOMIB.” Riunione dell’associazione italiana per lo Studio del Sistema Nervoso Periferico, Bologna 28-30 aprile 2011.
- Chiorazzi A., Carozzi V.A., Meregalli C., **Sala B.**, Ceresa C., Oggioni N., Cavaletti G.. “PERIPHERAL NEUROPATHY INDUCED BY CHRONIC ADMINISTRATION OF CISPLATIN, TAXOL AND BORTEZOMIB IN SEVERAL MURINE MODELS.” American Association for Cancer Research – AACR 103st Annual Meeting 2012, Chicago IL 31 Marzo- 4 aprile 2012.
- **Sala B.**, Canta A., Oggioni N., Ceresa C., Ballarini E., Rodriguez-Menendez V., Cavaletti G.. “MORPHOMETRICAL CHARACTERIZATION OF DRG ALTERATIONS INDUCED BY CISPLATIN AND BORTEZOMIB IN SEVERAL MICE MODELS.” Riunione congiunta Associazione Italiana per lo studio del Sistema nervoso Periferico & Gruppo Neuroscienze e Dolore della Società Italiana di Neurologia, Pisa 12-14 aprile 2012.
- Carozzi V.A., Meregalli C., Chiorazzi A., **Sala B.**, Oggioni N., Cavaletti G.. “CHARACTERIZATION OF THE NEUROTOXICITY AND ANTINEOPLASTIC ACTIVITY OF BORTEZOMIB IN A NEW MYELOMA-BEARING MURINE MODEL.” XIX Convegno annuale Associazione Italiana per le Scienze degli Animali da Laboratorio. “Medicina traslazionale:l’integrazione tra preclinica e clinica in campo oncologico”, Roma 4-5 ottobre 2012.

## **RINGRAZIAMENTI**

Al termine di un percorso di studio, di lavoro e di vita se ci si volta indietro si riconoscono volti, momenti, emozioni e scelte che hanno contribuito a farti arrivare al tanto atteso traguardo. In un attimo si condensano anni, ore, minuti e secondi, ma sono quelli che ti hanno portato ad essere quello che sei diventato.

Sul finire del mio percorso di Dottorato, mi sento di guardare molto indietro, non mi riferisco solo a questi ultimi 3 anni, c'è una storia alle mie spalle ed è percorrendo giorno dopo giorno questo cammino che sono riuscita ad arrivare fino a qui. Sono tante le persone che sono state al mio fianco, alcune dai primi momenti, tante altre si sono susseguite nell'arco del tempo. Ci sono anche persone che hanno vissuto con me solo alcuni attimi, se paragonati ad altre, ma non per questo non hanno avuto la loro importanza. Voglio dedicare questo successo a tutti quelli che hanno creduto in me, a chi mi ha dimostrato la propria stima e anche a chi, non avendo fiducia in me, mi ha spronato ancora di più a dimostrare il mio valore.

La mia Famiglia ha avuto un ruolo fondamentale in questo percorso: la presenza di una Mamma, un Papà e un Fratello come i miei ha saputo rendere semplice e tollerabile anche i momenti più difficili, il loro credere sempre e comunque nelle mie possibilità ha rafforzato la mia voglia di arrivare sin qui, nonostante tutti e nonostante tutto. Grazie grazie grazie!

Se non fosse stato per il Prof. Cavaletti non avrei potuto proseguire lungo questa strada e incrementare così tanto il mio bagaglio di esperienza in questo lavoro che ho amato sin da subito. Ovviamente tutto il gruppo *in vivo* mi ha accolto e trasmesso tutto quello che mi ha portato fin qui, condividendo momenti di ilarità e di estrema serietà. Un grazie ad Alessia, Annalisa, Cecilia, Cristina, Norberto e Valentina (rigorosamente in ordine alfabetico per non fare torti a nessuno) che hanno condiviso la quotidianità della vita di laboratorio con me negli ultimi 5 anni. Non posso dimenticare Elisa e Virginia, sempre pronte a dare un consiglio e un aiuto nel campo dell'istologia.

Un grazie immenso alle mie Amicicce Ju e Cri, ne abbiamo passate tante insieme, sorrisi, lacrime e abbracci che porterò nel mio cuore come ricordo più bello della nostra vita in laboratorio.

Poi ci sono loro, i miei Amici, le persone che più adoro e che costituiscono una grande e meravigliosa Famiglia. Grazie ad Alby, Dade, Omy, Dani e le sorelline Eli, Ste, Mario e Stefina, grazie per tutto quello che rappresentate per me, grazie per i sorrisi, la stima, il supporto e l'amore che mi trasmettete, grazie perché senza la nostra stupenda chat quotidiana le giornate non sarebbero le stesse, grazie perché siete i miei Amici!!!!

Grazie Ale e Paoli, amici fraterni, sempre presenti, pronti a festeggiare, ma anche ad ascoltare e a stringermi in un abbraccio ogni volta che ne sento la necessità. Abbiamo condiviso tanto insieme e tanto altro divideremo, questo successo è anche per voi!

Grazie ai miei Amici positanesi, Lotty, Nanni, Massimo, Peppe, Nanna, Benny, Marianna, Gioia e Foffo, anche se lontani non mi sono mai mancati il vostro supporto e la vostra stima, l'amicizia non ha confini e voi ne siete la più bella dimostrazione.

Grazie anche a te Fra, ci sei stato per una buona parte di questo percorso e non posso dimenticare come abbiamo condiviso successi e momenti difficili, sempre quella parola giusta che mitigava le arrabbiate e che mi faceva tornare il buonumore. A volte si cammina insieme, altre volte ci si allontana, ma ciò non significa dimenticare la parte di strada percorsa insieme.

Una dedica speciale va alla mia amica Titti, volata tra le stelle troppo presto, ma il cui sorriso è ancora qui, forte, coinvolgente e capace di far tornare il buonumore...

Ed infine un grazie a me stessa, Bibò, per non essermi mai persa d'animo, per essere stata caparbia e ostinata e non aver permesso a niente e nessuno di interrompere la mia strada verso questo grande obiettivo. Sii forte e determinata come lo sei stata fino ad oggi, non perdere mai di vista i tuoi sogni e le tue aspirazioni, sai bene cos'hai dovuto affrontare per arrivare fino a qui e cosa devi fare per arrivare ancora più in alto!