

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO-BICOCCA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

Dottorato in Neuroscienze

- XXIII ciclo-



Studio della neurotossicità periferica indotta
da farmaci antitubulinici
in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giovanni TREDICI

Tutore: Chiar.mo Prof. Guido CAVALETTI

Tesi di Dottorato di:

Alessia CHIORAZZI

Matricola n. 051110

Anno Accademico 2009-2010

Indice

RIASSUNTO e SCOPO DEL LAVORO	pag. 5
INTRODUZIONE	
1. Le Neuropatie Periferiche	pag. 11
1.1 Neuropatia Periferica Indotta da Chemioterapici (CIPN)	pag. 15
2. Chemioterapia e chemioterapici	pag. 17
3. Principali classi di chemioterapici	pag. 20
4. Chemioterapici antitubulinici	pag. 23
4.1 Epotilone B	pag. 24
- Farmacodinamica dell'epotilone B	pag. 26
- Farmacocinetica dell'epotilone B	pag. 27
4.2 Sagopilone	pag. 29
- Farmacodinamica del sagopilone	pag. 31
- Farmacocinetica del sagopilone	pag. 32
4.3 Neurotossicità da epotiloni	pag. 35
5. Modelli <i>in vivo</i>	pag. 36
5.1 Modelli <i>in vivo</i> di epotilone B	pag. 36
5.2 Modelli <i>in vivo</i> di sagopilone	pag. 37
6. Neuroprotettori	pag. 38
7. Microtubuli	pag. 40
7.1 Struttura e ruolo fisiologico	pag. 40
7.2 Azione dei farmaci antitubulinici	pag. 43
MATERIALI e METODI	
1. Modello <i>in vitro</i> di neurotossicità periferica	pag. 45
1.1 Colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali (DRG)	pag. 45
2. Modello <i>in vivo</i> di neurotossicità periferica	pag. 46
2.1 Animali utilizzati	pag. 46
2.2 Farmaci utilizzati	pag. 47
- Epotilone B (EPO B)	
- Sagopilone (ZK-EPO)	
2.3 <i>Experimental design</i>	pag. 48

- Tossicità periferica indotta dalla somministrazione di epotilone B	pag. 48
- Ricerca della massima dose tollerata di sagopilone	pag. 49
- Ricerca della corretta scheda di somministrazione di sagopilone	pag. 50
3. Valutazione della tossicità generale e della neurotossicità indotta da chemioterapici	pag. 52
3.1 Tossicità generale	pag. 52
- Valutazione giornaliera dello stato di salute degli animali	pag. 52
- Valutazione del peso corporeo	pag. 52
3.2 Neurotossicità	pag. 52
- Valutazione della velocità di conduzione nervosa a livello del nervo caudale	pag. 52
- Analisi morfologica del nervo sciatico	pag. 53
- Analisi morfometrica del nervo sciatico	pag. 54
4. Valutazione Istopatologica	pag. 54
5. Analisi ematologica ed ematochimica	pag. 55
6. Quantizzazione della densità delle fibre intraepidermiche	pag. 55
7. Test comportamentali	pag. 56
7.1 <i>Hot plate test Analgesy Meter</i>	pag. 56
8. Valutazione della forma polimerizzata di β -tubulina	pag. 57
8.1 Estratto proteico da tessuto	pag. 57
8.2 Separazione elettroforetica delle proteine	pag. 58
8.3 <i>Western blot</i>	pag. 59
9. Analisi di espressione delle proteine mieliniche	pag. 60
9.1 <i>cRNA probes</i>	pag. 60
9.2 <i>RNase protection assay</i>	pag. 60
9.3 <i>Blot data analysis</i>	pag. 61
10. Analisi statistiche	pag. 61

RISULTATI

1. <i>Studio della tossicità periferica indotta dalla somministrazione di epotilone B</i>	pag. 63
1.1 Colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali trattati con epotilone B	pag. 63
1.2 Modello animale	pag. 64
- Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo	pag. 65
- Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa	pag. 66
- Neurotossicità: analisi morfologica e morfometrica del nervo sciatico	pag. 67
- Quantizzazione della densità delle fibre intraepidermiche	pag. 69
- <i>Hot plate test</i>	pag. 70
- Quantizzazione dell'incremento di polimerizzazione della β -tubulina	pag. 71
- Analisi dell'espressione delle proteine mieliniche	pag. 72

<i>2. Studio della tossicità periferica indotta dalla somministrazione di sagopilone</i>	pag. 74
2.1 Colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali trattati con sagopilone	pag. 74
2.2 Modello animale per la ricerca della massima dose tollerata	pag. 75
- Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo	pag. 76
- Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa	pag. 77
2.3 Modello animale per la ricerca della corretta scheda di somministrazione	pag. 78
- Tossicità generale: mortalità, osservazioni cliniche e valutazione del peso corporeo	pag. 79
- Neurotossicità: valutazione della velocità di conduzione nervosa	pag. 81
- Neurotossicità: analisi morfologica e morfometrica del nervo sciatico	pag. 83
- Analisi istopatologica di rene e fegato	pag. 86
- Analisi ematologica ed ematochimica	pag. 87
- Quantizzazione dell'incremento della polimerizzazione di β -tubulina	pag. 88
DISCUSSIONE	pag. 90
ABBREVIAZIONI	pag. 104
BIBLIOGRAFIA	pag. 106
RINGRAZIAMENTI	pag. 119

Riassunto e scopo del lavoro

Questo lavoro, svolto nell'ambito della Scuola di Dottorato in Neuroscienze, ha avuto come scopo la messa a punto di modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* atti a studiare e caratterizzare la neurotossicità periferica indotta dall'utilizzo di due diversi farmaci antitubulinici.

Tra gli agenti antitubulinici ritroviamo farmaci in grado di interagire con la tubulina polimerizzata prevenendone la depolimerizzazione quali i taxani e gli epotiloni e farmaci che interagiscono con i monomeri di tubulina e ne prevengono la polimerizzazione tra cui la vincristina. Entrambe queste classi di farmaci antitubulinici, attraverso la disorganizzazione dei microtubuli, sono in grado di promuovere l'apoptosi delle cellule tumorali attraverso la fosforilazione di bcl-2 e di interferire, quindi, con differenti *pathway* apoptotici di trasduzione del segnale.

Questo lavoro, per entrambi i farmaci presi in esame, ha previsto un primo *step in vitro* per studiare l'attività del farmaco e un successivo *step in vivo* che ha permesso di valutare l'effetto dei farmaci in esame in un organismo più complesso e paragonabile a quello umano. Gli esperimenti *in vivo*, infatti, a differenza di quelli *in vitro*, permettono di fornire informazioni circa la biodistribuzione del farmaco nell'organismo, che può pesantemente inficiare l'attività del farmaco stesso, o evidenziare l'insorgenza di effetti collaterali indesiderati in determinati distretti corporei.

Più nel dettaglio questo lavoro si è quindi articolato in ***due fasi consecutive***:

(A) lo studio della tossicità periferica indotta dalla somministrazione di epotilone B (EPO B) attraverso la messa a punto di un modello *in vitro* su colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali (DRG) e un successivo modello *in vivo* che ha visto l'utilizzo di ratti Fischer ed è stato sviluppato sulla base di un precedente modello già messo a punto nei nostri laboratori su ratti Wistar;

(B) lo studio della tossicità periferica indotta dalla somministrazione di sagopilone (ZK-EPO) attraverso la messa a punto di un modello *in vitro* su colture organotipiche dei

gangli delle radici dorsali e due successivi modelli *in vivo* che hanno visto l'utilizzo di ratti Wistar e sono stati svolti per ricercare la massima dose tollerata di farmaco e la corretta scheda di somministrazione.

Obiettivo: studiare la neurotossicità periferica indotta da due differenti farmaci antitubulinici (epotilone B e sagopilone) in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo*

Nella prima fase di studio (**A**), è stata valutata l'efficacia dell'epotilone B su colture organotipiche di DRG estratti da embrioni di ratti Sprague-Dawley ed è stata indagata, in ratti Fischer, l'insorgenza della neurotossicità indotta da epotilone B somministrato alle concentrazioni di 0.25, 0.5, 1 e 1.5 mg/kg. Nel primo modello l'azione dell'epotilone B è stata valutata osservando la sua capacità di indurre la riduzione della lunghezza del neurite mentre, nel secondo modello, è stata valutata sia la tossicità generale dei trattamenti farmacologici che la neurotossicità, attraverso valutazioni neurofisiologiche, morfologiche e morfometriche a livello del nervo sciatico.

Il modello *in vitro* è caratterizzato, dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, da una buona correlazione tra la dose di farmaco somministrata e la regressione della lunghezza media del neurite che risulta essere dose-dipendente. Dopo 48 ore si evidenzia la presenza di un effetto soglia tra il gruppo trattato con la dose minore di farmaco e quello trattato con una dose intermedia. L'epotilone B si è dunque dimostrato in grado di indurre una riduzione statisticamente significativa della lunghezza media del neurite. Si è inoltre osservato che i DRG trattati con dosi inferiori di farmaco mostrano un netto recupero dopo 48 ore di trattamento in accordo con il fatto che l'insorgenza della neuropatia non è sempre l'effetto collaterale che limita la dose e l'utilizzo di tale farmaco in clinica.

Dopo 48 ore i neuriti dei DRG trattati con le dosi maggiori, invece, mostrano un ulteriore calo pur non presentando ancora differenze significative tra loro suggerendo, quindi, che l'aumento della dose non risulta essere correlato ad un aumento significativo della neurotossicità. Tale osservazione permette di ipotizzare che la curva dose-tossicità dell'epotilone B sia caratterizzata da una sorta di effetto *plateau*.

Il modello *in vivo* su ratti Fischer ha messo in luce un'evidente tossicità dose-dipendente, con differenze statisticamente significative nel peso corporeo; l'unico gruppo trattato che non presenta variazioni significative rispetto al controllo è stato quello a concentrazione minore mentre i gruppi trattati con le dosi maggiori hanno evidenziato una mortalità del 100%.

L'analisi elettrofisiologica effettuata alla fine del trattamento ha evidenziato un calo dose-dipendente statisticamente significativo del valore di velocità di conduzione nervosa negli animali sopravvissuti rispetto ai controlli. Attraverso l'indagine morfologica di sezioni di nervo sciatico si è osservata una degenerazione assonale con frequenza di comparsa delle alterazioni patologiche dose-dipendente. La presenza di tale assonopatia evidenziata tramite osservazione al microscopio ottico è confermata anche dai cambiamenti neurofisiologici e comportamentali che sono stati osservati negli animali trattati tramite la misurazione della velocità di conduzione nervosa e l'*Hot plate test*.

L'analisi morfometrica ha mostrato un aumento statisticamente significativo del valore di *g-ratio* dovuto ad un aumento del calibro medio dei diametri dell'assolemma suggerendo quindi che la patologia indotta in seguito alla somministrazione cronica di EPO B sia a carico dell'assone.

Per verificare l'effetto svolto dalla somministrazione di epotilone B a livello molecolare è stata analizzata la polimerizzazione della tubulina a livello del nervo sciatico degli animali trattati rispetto agli animali controllo. Quest'analisi ha mostrato una polimerizzazione dose-dipendente della tubulina negli animali trattati ma i cambiamenti microtubulari non sono stati confermati da una analisi a livello ultrastrutturale.

Nella seconda fase di studio (**B**), è stata valutata l'efficacia del sagopilone su colture organotipiche di DRG estratti da embrioni di ratti Sprague-Dawley ed è stata indagata, in ratti Wistar, l'insorgenza della neurotossicità indotta da sagopilone somministrato alle concentrazioni di 1.2 e 2.4 mg/kg. Nel primo modello l'azione del sagopilone è stata valutata osservando la sua capacità di indurre la riduzione della lunghezza del neurite mentre, nel secondo modello, è stata valutata sia la tossicità generale dei trattamenti farmacologici che la neurotossicità, attraverso valutazioni neurofisiologiche, morfologiche e morfometriche a livello del nervo sciatico.

Il modello *in vitro* è caratterizzato, dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, da una buona correlazione tra la dose di farmaco somministrata e la regressione della lunghezza media del neurite che risulta essere dose-dipendente. Dopo 48 ore si osserva come le differenze tra il gruppo trattato con la dose maggiore di sagopilone e quelli trattati con concentrazioni inferiori acquistano significatività statistica maggiore.

A differenza di quanto osservato in precedenza nel modello di EPO B, i risultati ottenuti suggeriscono che l'aumento della dose di sagopilone risulta essere correlato ad un aumento significativo della neurotossicità.

Il modello *in vivo* su ratti Wistar svolto per ricercare la massima dose di farmaco tollerata ha previsto la somministrazione di sagopilone alle dosi di 0.6, 1.2, 1.8 e 2.4 mg/kg. Tale modello ha messo in luce un'evidente tossicità generale non dose-dipendente, con differenze statisticamente significative nel peso corporeo tra animali trattati ed animali controllo. L'unico gruppo di trattamento che non presenta variazioni significative rispetto al gruppo controllo è stato quello somministrato con la concentrazione minore mentre, in tutti gli altri casi, il farmaco pur presentando un calo di peso corporeo è risultato essere ben tollerato non avendo registrato episodi di mortalità.

L'analisi elettrofisiologica è stata effettuata alla fine del periodo di trattamento evidenziando un calo della velocità di conduzione nervosa negli animali appartenenti a tutti i gruppi di trattamento. Al contrario rispetto a quanto osservato per il calo di peso corporeo, il calo della velocità di conduzione nervosa risulta essere dose-dipendente sia per tempistiche di insorgenza che per significatività.

Questo esperimento ha messo in luce come la dose minore testata non sia in grado di indurre né tossicità generale né neurotossicità nell'animale, quindi, per ricercare la corretta modalità di somministrazione sono state usate solo le due dosi maggiori testate in questo esperimento.

Il secondo modello sviluppato conferma, per entrambe le dosi, l'insorgenza di tossicità generale e di neurotossicità periferica dopo 4 settimane di trattamento. Alla fine del periodo di trattamento non si registrano differenze significative tra i gruppi trattati con diverse dosi e tempistiche. Sebbene non sia presente una differenza significativa tra i

vari gruppi di trattamento sembrerebbe possibile evidenziare un *trend* di tossicità per cui si ha una neurotossicità maggiore quando il farmaco è somministrato in bolo.

Questi risultati neurofisiologici sono anche confermati dall'analisi effettuata a livello del nervo sciatico che ha evidenziato l'insorgenza di assonopatia primaria associata a degenerazione mielinica secondaria.

L'analisi istopatologica degli organi interni ha mostrato l'insorgenza di vacuolizzazioni a livello del tubulo prossimale nella corteccia renale in maniera dose-dipendente ma senza presentare differenze tra le tre diverse tempistiche di somministrazione.

Anche l'analisi ematologica-ematochimica non mette in luce differenze significative tra le tre diverse modalità di somministrazione pur evidenziando variazioni rispetto agli animali controllo per quanto riguarda la conta dei globuli rossi, dei globuli bianchi, del valore di emoglobina e di ematocrito.

Come osservato nel modello di EPO B, anche in questo caso l'analisi morfometrica ha mostrato un aumento statisticamente significativo del valore di *g-ratio* dovuto ad un aumento del calibro medio dei diametri dell'assolemma suggerendo quindi che la patologia indotta in seguito alla somministrazione cronica di sagopilone sia a carico dell'assone e non legata a fenomeni di demielinizzazione.

Per verificare l'effetto svolto dalla somministrazione di sagopilone a livello molecolare è stata analizzata la polimerizzazione della tubulina nei nervi sciatici degli animali trattati con la dose maggiore di sagopilone rispetto agli animali controllo. Quest'analisi ha mostrato un aumento del valore di polimerizzazione della tubulina negli animali trattati.

Questo lavoro ha quindi permesso di effettuare un confronto tra il profilo tossicologico degli epotiloni naturali e sintetici e rispetto ai comuni antitubulinici utilizzati indicando come la tossicità generale e quella a carico della velocità di conduzione nervosa siano ampiamente sovrapponibili. Questi modelli hanno però permesso di evidenziare come gli epotiloni, sia naturali che sintetici, inducano una patologia assonale di tipo differente rispetto a quella correlata alla somministrazione di paclitaxel. Quest'ultima affermazione è stata messa in luce dall'osservazione in entrambi i modelli di un aumento del calibro medio dei diametri assonali indotto dalla somministrazione dei due diversi farmaci.

L'osservazione di un possibile diverso meccanismo di tossicità rispetto al paclitaxel lascia, quindi, aperto un nuovo campo di studio per poter comprendere meglio quale sia il meccanismo d'azione dei due antitubulinici presi in esame.

Introduzione

1. LE NEUROPATIE PERIFERICHE

Con il termine neuropatia periferica si intende una patologia che si sviluppa a carico del sistema nervoso periferico (SNP). I nervi che compongono il SNP sono di tre tipi:

- i **nervi sensitivi** conducono i segnali provenienti dall'ambiente verso il sistema nervoso centrale (SNC);
- i **nervi motori** conducono il segnale dal SNC ai muscoli scheletrici;
- i **nervi vegetativi** controllano le funzioni involontarie dell'organismo.

Nonostante numerose neuropatie siano a carico di tutti e tre questi tipi di nervi, in alcuni casi è possibile classificare il disturbo come puramente motorio, sensitivo o vegetativo.

La malattia di un singolo nervo periferico prende il nome di mononeuropatia ed è in grado di colpire aree ben definite e spesso è la conseguenza di una lesione traumatica, di una compressione locale o di processi infiammatori o ischemici. La sintomatologia che ne deriva è localizzata e limitata al territorio di innervazione del nervo lesso.

Quando i disturbi colpiscono due o più nervi in aree distinte si parla di mononeurite multipla.

La polineuropatia, invece, è il nome generico sotto cui vengono raggruppate la maggior parte delle neuropatie periferiche e si riferisce ad un interessamento bilaterale e simmetrico dei nervi periferici in cui vengono colpiti in maniera simile entrambi i lati del corpo (Warzoc and Wattin, 1990). In questo caso, generalmente, i disturbi interessano inizialmente mani e piedi.

Alcuni tipi di neuropatie hanno il loro esordio in maniera improvvisa, mentre altre compaiono in maniera graduale nell'arco di anni. In base al tipo di fibra nervosa interessata e alla sua localizzazione si possono avere sintomi diversi ma, nella maggior parte dei casi, una neuropatia si manifesta con debolezza alle braccia o alle gambe, formicolii, dolore, intorpidimento, assenza del senso di posizione e sintomi di danno alle

fibre autonome. Oltre a manifestarsi come sintomo doloroso, la neuropatia periferica ha un effetto diretto sulla qualità della vita del paziente.

Si possono distinguere due grossi gruppi di neuropatie:

- le **neuropatie ereditarie** sono causate da alterazioni genetiche che vengono trasmesse di generazione in generazione (per molte di queste il difetto genetico è noto);
- le **neuropatie acquisite** sono dovute a malattie acquisite nel corso della vita.

Le **neuropatie ereditarie** sono classificate in neuropatie sensitivo motorie o sensitive:

✓ Le *neuropatie sensitivo motorie* note sono :

- La malattia di Charcot-Marie-Tooth (di tipo I e di tipo II) è una malattia ereditaria piuttosto comune, solitamente autosomica dominante, caratterizzata da perdita di forza e atrofia muscolare localizzate primariamente ai muscoli peroneali.

I pazienti affetti dal tipo I iniziano a presentare, nella seconda infanzia, la caduta del piede ed un'atrofia muscolare distale, lentamente progressiva, che porta alla caratteristica "deformità a zampa di cicogna"; i muscoli intrinseci della mano si atrofizzano più tardivamente. La pallestesia, la sensibilità dolorifica e quella termica diminuiscono, con distribuzione a calza e a guanto. I riflessi tendinei profondi sono assenti. Nei familiari portatori del tratto genetico della malattia gli unici segni presenti possono limitarsi ad alcune deformità a carico del piede, cioè piede cavo e dita a martello. Le velocità di conduzione nervosa sono basse e le latenze distali prolungate. Insorgono demielinizzazioni e remielinizzazioni segmentarie. La malattia evolve lentamente ed è compatibile con una vita relativamente normale.

La forma di tipo II, invece, evolve più lentamente, con deficit di forza che compare tardivamente. I pazienti presentano velocità di conduzione normali, ma una diminuzione dei potenziali evocati. La biopsia dimostra la degenerazione walleriana ossia la degenerazione dell'assone e del rivestimento mielinico lungo tutta la sua lunghezza.

- La malattia di Dejerine-Sottas (di tipo III) è una forma rara autosomica recessiva, che si presenta durante l'infanzia con debolezza muscolare

progressiva e perdita della sensibilità e dei riflessi tendinei; il quadro clinico evolve più rapidamente. Si tratta di una malattia caratterizzata da fenomeni di demielinizzazione-rimielinizzazione dei nervi periferici, che aumentano di volume ed assumono l'aspetto "a bulbo di cipolla" alla biopsia.

- ✓ Nelle *neuropatie sensitive*, statisticamente rare, la perdita distale della sensibilità dolorifica e termica è maggiore della perdita della pallestesia e della propiocezione. Il problema maggiore è rappresentato dalla mutilazione del piede da insensibilità dolorosa, con infezioni frequenti e osteomieliti.

La maggior parte delle neuropatie, però, sono di tipo **acquisito** e possono essere dovute a diverse cause, tra cui:

- ✓ il **diabete** 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.

Esistono altre malattie sistemiche in grado di generare neuropatia tra cui l'insufficienza renale cronica, le epatopatie e le alterazioni endocrine (Kuwabara, 2003);

- ✓ l'abuso di **alcol** è una causa frequente di neuropatia. Altre **sostanze tossiche** che possono danneggiare i nervi sono il piombo che è in grado di generare neuropatia motoria, l'arsenico, il mercurio che genera neuropatia sensitiva, i solventi organici e gli insetticidi (Monforte et al., 1995);
- ✓ **deficit nutrizionali** e **deficit vitaminici** tra cui vitamina B12, B1, B6 e vitamina E possono causare polineuropatie dovute a degenerazione assonale. La carenza vitaminica può essere dovuta ad un inadeguato regime dietetico o ad un problema di malassorbimento a livello gastrico o intestinale. Anche eccessi di vitamina B6 possono causare neuropatia (Snodgrass, 1992);
- ✓ le **neuropatie immuno-mediate** si verificano quando il sistema immunitario, per ragioni sconosciute, "attacca" parti del nostro organismo, nel nostro caso i nervi periferici, causando l'insorgenza di neuropatie autoimmuni.

Le forme più comuni di questo tipo di neuropatia sono rappresentate da:

- la **Sindrome di Guillain-Barrè (SGB)**, una poliradicolonevrite acuta ad esordio rapido, che può evolvere a paralisi totale e insufficienza respiratoria nell'arco di giorni dai primi eventi. È spesso preceduta da infezioni o vaccinazioni che sono considerati fattori "scatenanti". La malattia è autolimitante, con recupero spontaneo nell'arco di 6-8 settimane, ma talora permangono dei deficit di tipo respiratorio. È cruciale la precocità dell'intervento terapeutico, che si avvale di immunoglobuline somministrate per via endovenosa o plasmateresi;
 - la **Poliradicolonevrite infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP)**, considerata la variante cronica della Guillain-Barrè, può presentarsi con attacchi ripetuti o con un andamento lentamente progressivo;
 - le neuropatie croniche con **autoanticorpi** verso le componenti dei nervi periferici, tra cui la glicoproteina associata alla mielina (MAG), i gangliosidi (GM1, GD1a, GD1b) e i sulfatidi;
 - le neuropatie associate a **vasculiti** ossia un'infiammazione dei vasi sanguigni che può interessare sia i vasi diretti ai nervi periferici che quelli diretti ad altri organi. Se il processo infiammatorio interessa i vasi diretti ai nervi periferici può causare piccoli "infarti" del nervo determinando una neuropatia vasculitica. Diverse malattie reumatologiche, come l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la panarterite nodosa o la sindrome di Sjogren sono associate a vasculite generalizzata, che può coinvolgere anche i nervi periferici. La vasculite può causare neuropatie, mononeuriti o mononeuriti multiple, a seconda della distribuzione e della severità delle lesioni;
 - le neuropatie associate a **gammopatie monoclonali**, nascono dall'espansione di cloni di linfociti B o plasmacellule nel midollo osseo e negli organi linfoidi, fino a sviluppare tumori secernenti anticorpi. Ogni singolo clone di linfociti B produce un solo tipo di anticorpo. In alcuni casi gli anticorpi reagiscono contro componenti dei nervi periferici, in altri casi frammenti degli anticorpi si depositano nei tessuti formando "amiloidi" (Meier and Meyer, 1990);
- ✓ la neuropatia associata ai **tumori** deriva da un'infiltrazione diretta dei nervi da parte delle cellule tumorali o da un effetto indiretto, a distanza, del tumore. In pazienti affetti da tumore, una neuropatia può anche essere un effetto collaterale dei cicli di

radiazioni locali o essere causata da farmaci, come la vincristina ed il cisplatino, e, in questi casi, si parla di neuropatie "iatrogene";

- ✓ alcuni **agenti infettivi**, quali virus e batteri, possono causare neuropatie; ricordiamo il virus dell'*Herpes Zoster*, responsabile del fuoco di S. Antonio; il virus dell'AIDS (HIV-I), che causa diverse forme di neuropatia sensitiva dolorosa; il Citomegalovirus, associato a poliradicolonevriti rapidamente ingravescenti, soprattutto in soggetti immunodepressi; anche l'epatite B e C sono talora associate a neuropatia. Tra le infezioni batteriche che causano neuropatie, invece, ricordiamo: la malattia di Lyme, causata da uno spirocheta; la lebbra, che causa una neuropatia sensitiva; la difterite, che causa una neuropatia paralitica rapidamente ingravescente; la Tripanosomiasi, causata da un parassita;
- ✓ alcune neuropatie, definite **neuropatie iatrogene**, sono dovute all'effetto collaterale di alcuni **farmaci**, come ad esempio la vincristina ed il cisplatino usati nella terapia anti-tumorale, la nitrofurantoina utilizzata in alcune patologie renali croniche, l'amiodarone usato nelle aritmie cardiache, il disulfiram usato nell'alcoolismo e il dapsona utilizzato nella terapia della lebbra;
- ✓ alcune neuropatie localizzate possono essere causa di un **trauma esterno** o di **compressione** del nervo da parte di tendini o altri tessuti circostanti; le più note sono la sindrome del tunnel carpale data da compressione del nervo mediano al polso, le radiculopatie cervicali e lombo-sacrali dovute alla compressione delle radici dei nervi in uscita dalla colonna vertebrale. Altre zone di frequente compressione dei nervi sono il gomito, l'ascella e il dorso del ginocchio;
- ✓ esistono poi delle neuropatie la cui causa non è nota e per le quali si parla di neuropatie **"idiopatiche"**; anche in questo caso, a seconda delle sue manifestazioni, la neuropatia viene classificata in sensitiva, motoria o mista.

1.1 NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA CHEMIOTERAPICI (CIPN)

La neuropatia periferica che si sviluppa in seguito a trattamento con chemioterapici rappresenta il più comune fattore limitante di queste terapie, in quanto può compromettere in modo significativo la qualità di vita dei pazienti.

In generale, il sistema nervoso periferico possiede una grande capacità di rigenerarsi in seguito a lesioni ma, perché questo accada, il corpo cellulare deve mantenersi privo di danno per un lungo periodo di tempo dopo la fine della somministrazione del farmaco. Solo in alcuni casi, però, i sintomi sono in grado di risolversi completamente, mentre, nella maggior parte dei casi, la neuropatia indotta da chemioterapici è solo parzialmente reversibile; esistono pochi casi, infine, in cui tale danno è totalmente irreversibile (Peltier and Russell, 2002).

Si conosce ben poco dei meccanismi che inducono l'insorgenza della neuropatia periferica, mentre è noto che la neurotossicità dipende dalla dose e dal tipo di farmaco utilizzato e gli effetti possono apparire durante la somministrazione del farmaco, immediatamente dopo la fine del trattamento o a distanza di molto tempo da esso. L'estensione del danno neuronale, però, non dipende solo da questi aspetti ma anche dalla presenza di un danno pre-esistente all'inizio del ciclo chemioterapico.

I meccanismi di neurotossicità sono diversi in base alla categoria dei farmaci utilizzati. La colchicina, gli analoghi dei nucleosidi, i taxani, gli alcaloidi della vinca e la fenitoina inducono una neuropatia dovuta a degenerazione assonale mentre la suramina provoca, nel nervo colpito, fenomeni di demielinizzazione; il cisplatino ed il carboplatino inducono apoptosi nelle cellule dei gangli delle radici dorsali, mentre i farmaci inibitori della trascrittasi inversa generano disfunzioni mitocondriali.

Il grado di gravità di una neuropatia periferica può essere valutato utilizzando diverse "scale cliniche"; i metodi classici di neurofisiologia, quali la misurazione della variazione della velocità di conduzione nervosa e l'elettromiografia sono poco sensibili nel rilevare i sintomi precoci della patologia e, inoltre, sono poco tollerati dai pazienti.

Dal momento che questi farmaci sono utilizzati per la terapia di patologie gravi, allo scopo di garantire la sopravvivenza del paziente anche se a discapito della qualità della sua vita, gran parte della ricerca biomedica rivolge la sua attenzione all'eliminazione o alla riduzione della neurotossicità indotta, senza, però, alterare l'efficacia della cura.

I sintomi neuropatici, invece, 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 arrivare al sistema nervoso centrale dove questi ultimi sono presenti. I sintomi scaturiti da una neuropatia

sensitiva sono generalmente sonnolenza, formicolii ed un aumento della sensibilità dolorosa.

I sintomi motori, invece, sono più eterogenei e legati al tipo di farmaco utilizzato:

1. i farmaci appartenenti alla classe dei taxani (paclitaxel e docetaxel) presentano un'incidenza di neuropatia periferica tra il 50-70% e ad alte dosi inducono debolezza dei muscoli distali;
2. i farmaci appartenenti alla classe degli alcaloidi della vinca (vincristina), se somministrati ad alte dosi, inducono, oltre alla debolezza dei muscoli distali, un profondo decremento del riflesso tendineo;
3. i farmaci appartenenti ai composti dei platini (cisplatino, carboplatino e oxaliplatino) sono in grado di indurre debolezza muscolare nel trattamento ad alte dosi.

2. CHEMIOTERAPIA e CHEMIOTERAPICI

Con il termine chemioterapia si intende la terapia medica che utilizza composti chimici, naturali o di sintesi, a scopo antimicrobico; comunemente il termine comprende anche gli antibiotici e i composti utilizzati nella terapia antitumorale.

I chemioterapici hanno come obiettivo terapeutico quello di distruggere una data popolazione cellulare e la loro probabilità di successo è legata alle differenze biologiche esistenti tra la popolazione bersaglio e le cellule dell'organismo ospite.

Se pensiamo ad una popolazione di cellule neoplastiche è chiaro che, poiché le differenze rispetto all'organismo sono minime, raramente un singolo agente antitumorale potrà distruggere le cellule cancerogene senza colpire anche le cellule sane, causando quindi l'insorgenza di effetti collaterali nel paziente in cura.

La maggior parte dei farmaci antitumorali esercita la sua attività inducendo la morte cellulare e per questo motivo tali farmaci vengono detti *citotossici*; essi provocano un danno cellulare interferendo con la sintesi del DNA, alterando così il processo di divisione cellulare.

Il ciclo cellulare è formato da quattro fasi: G1, S, G2, M.

Ha inizio con la fase G1 durante la quale vengono sintetizzati gli enzimi necessari per il funzionamento e la produzione della nuova molecola di DNA; segue la fase S in cui avviene la replicazione del genoma. Si ha poi la fase G2 di preparazione alla mitosi e infine la fase M durante la quale la cellula va incontro a divisione per arrivare a formare le due cellule figlie con corredo cromosomico diploide identico a quello della cellula madre.

È presente anche una fase G0 prima dell'inizio del ciclo che è una fase di quiescenza per le cellule durante la quale esse mantengono le loro capacità di replicazione e possono "prepararsi" per un nuovo ingresso in fase G1 e quindi per una nuova replicazione. Per poter superare il *punto di restrizione* ed entrare quindi in fase G1 devono essere attivate le proteine Cdk la cui presenza determina il blocco o il proseguimento del ciclo cellulare.

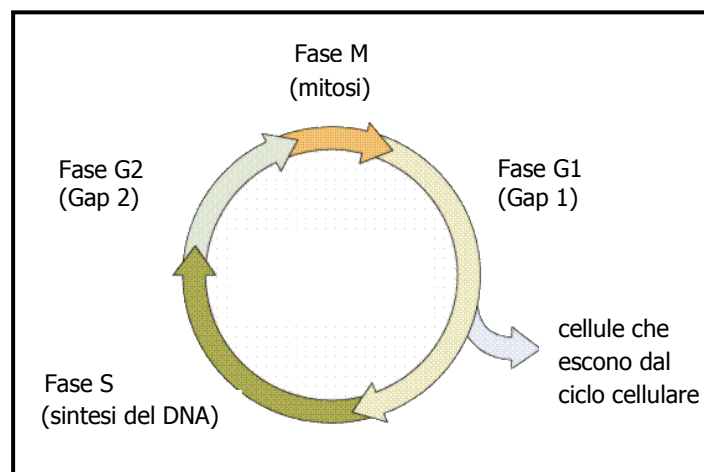


Fig. 1: immagine rappresentativa delle fasi del ciclo cellulare

La crescita di un tumore è ben espressa graficamente dalla curva di Gompertz dove si individuano due fasi: la fase logaritmica (tratto 1-2) dove le cellule crescono in modo esponenziale e la fase di rallentamento, detta anche fase di plateau (tratto 3) (Castro et al., 2003).

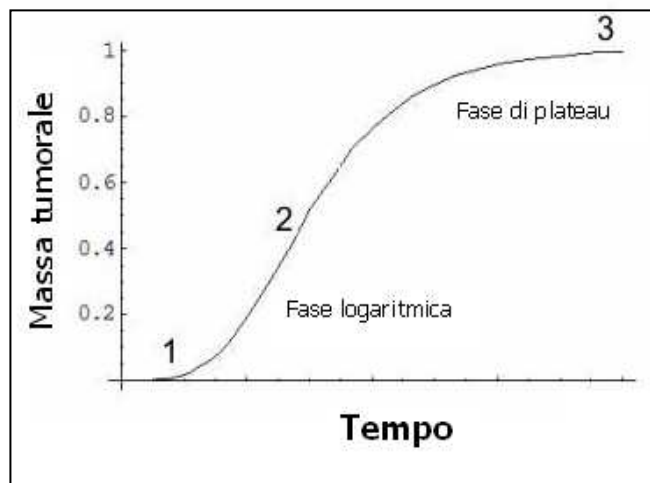


Fig. 2: curva di Gompertz

In ogni popolazione cellulare neoplastica si possono riconoscere tre compartimenti cellulari distinti in base alla capacità proliferativa:

- il compartimento A è costituito da cellule proliferanti in fase G1,
- il compartimento B è costituito da cellule quiescenti e quindi in fase G0,
- il compartimento C contiene le cellule in necrosi o differenziate.

Di questi tre gruppi di cellule il più suscettibile ai farmaci citotossici è il compartimento A mentre le cellule appartenenti al compartimento B sono un ostacolo alla completa risoluzione del tumore, perché resistono di più alla chemioterapia e possono rientrare in ciclo quando la massa tumorale viene ridotta per via chirurgica o chemioterapica. Durante la fase di crescita logaritmica quasi tutte le cellule appartengono al compartimento A per cui, in teoria, sarebbe questa la fase di una neoplasia più semplice da trattare in chemioterapia tuttavia l'espressione clinica del tumore avviene di solito in una fase molto più avanzata, quando la massa tumorale ha notevolmente ridotto il proprio potenziale di crescita.

Queste circostanze sfavorevoli richiedono all'inizio l'impiego di farmaci attivi anche su cellule in fase G0 associati a chirurgia o radioterapia finalizzati a ridurre la massa tumorale iniziale in modo da aumentare la frazione di cellule in ciclo e potenziare l'efficacia della successiva chemioterapia.

Gli agenti chemioterapici o "farmaci antiproliferativi" sono tossici sulle cellule in proliferazione ma esercitano il loro effetto anche sulle cellule differenziate o in fase G₀.

Tali farmaci sono suddivisi in tre classi:

- i farmaci non ciclo-specifici hanno un'azione indipendente dalla presenza delle cellule in ciclo e per questo hanno azione letale anche sulle cellule in G₀;
- i farmaci fase-specifici, o ciclo specifici, hanno azione solo sulle cellule che si trovano in specifiche fasi del ciclo cellulare;
- i farmaci non fase-specifici uccidono le cellule indipendentemente dalla fase del ciclo in cui si trovano purchè esse siano in replicazione.

L'effetto terapeutico che ci attenderemmo da un farmaco antiproliferativo è la distruzione del maggior numero possibile di cellule tumorali con un livello di tossicità tollerabile per il paziente. Questo obiettivo può essere raggiunto conoscendo la dose massima tollerata (MTD) e la dose minima efficace (MED) del farmaco stesso.

Il rapporto tra questi due valori definisce l'indice terapeutico, che rappresenta un'importante stima approssimativa di un intervallo di sicurezza per la somministrazione del farmaco.

3. PRINCIPALI CLASSI di CHEMIOTERAPICI

Dal momento che le varie forme di neoplasia presentano caratteristiche biologiche diverse, l'efficacia della terapia antitumorale può essere ostacolata dai meccanismi di resistenza espressi dai vari tipi cellulari; per ovviare a questo problema la migliore strategia terapeutica sembra essere l'associazione di più farmaci insieme.

I farmaci citotossici agiscono con due meccanismi principali ossia l'interazione diretta con la struttura del DNA, in cui l'azione del farmaco non dipende dal tempo di esposizione delle cellule ma dalla concentrazione della sostanza, oppure l'interazione con la via di biosintesi dei precursori di DNA e RNA dove, al contrario, l'effetto dipende proprio dal tempo di esposizione della cellula al chemioterapico.

I principali chemioterapici utilizzati possono essere raggruppati in cinque classi:

- ✓ Antagonisti dell'acido folico
- ✓ Analoghi delle purine e delle pirimidine
- ✓ Agenti alchilanti e composti del platino
- ✓ Antracicline e intercalanti del DNA
- ✓ Piccole proteine inibitrici delle protein-kinasi

Gli **antagonisti dell'acido folico** sono farmaci citotossici usati, oltre che per la terapia neoplastica, anche come antimicrobici, antinfiammatori e agenti immuno-soppressivi; sono formati da un anello pteridinico, dall'acido para-amminobenzoico e dall'acido glutammico. A questa classe appartiene il metotrexato (MTX), che viene utilizzato per il trattamento di pazienti con leucemia linfoblastica acuta, osteosarcoma, linfomi, cancro al seno, cancro alla vescica e per pazienti con patologie non maligne; la sua azione porta ad una diminuzione della timidina trifosfato e, quindi, della sintesi di nuovo DNA, comportando in alcuni casi morte cellulare. Questo farmaco, però, è mielotossico e quindi provoca danni a livello gastroenterico.

Gli **analoghi delle purine** comprendono farmaci che non possiedono solo attività antiproliferativa ma anche immunosoppressiva e antivirale; i principali impiegati in chemioterapia sono la 6-mercaptopurina, la 6-tioguanina, la fludarabina e la pentostatina.

Le prime due sono gli analoghi dell'ipoxantina e della guanina e, una volta convertite nella forma trifosfata, vengono incorporate nel DNA e nell'RNA provocando la rottura dei filamenti. La fludarabina è un analogo dell'adenosina arabinoside e la pentostatina agisce inibendo l'adenosina deaminasi provocando quindi il blocco sulla proliferazione cellulare.

Gli **analoghi delle pirimidine** comprendono il 5-fluoro-uracile, la citosina arabinoside (Ara-C) e la gemtabina. Il primo è un analogo dell'uracile con un atomo di fluoro in posizione C5 e non può quindi essere convertito in timidilato; inibisce l'attività della timidilato-sintasi interagendo con essa. L'Ara-C è un analogo della desossicitidina e agisce inibendo l'attività della DNA-polimerasi; è un farmaco specifico che agisce principalmente sulle cellule in fase S. La gemtabina ha una struttura simile a quella dell'Ara-C ma viene accumulata più facilmente all'interno delle cellule dove viene

fosforilata e attivata. Nella forma difosfata inibisce la ribonucleotide riduttasi mentre nella forma trifosfata viene usata dalla DNA polimerasi; in entrambi i casi è in grado di bloccare la sintesi del DNA.

Gli **agenti alchilanti** rappresentano i primi farmaci non ormonali ad essere usati per la terapia tumorale; questi composti reagiscono con gli atomi elettrone-ricchi delle molecole biologiche e formano con essi legami covalenti. Possono interagire direttamente con le molecole biologiche o possono formare un intermedio reattivo. Nel primo caso interagiscono con il DNA e il principale bersaglio è rappresentato dall'N in posizione 7 della guanina; la base viene quindi riconosciuta anomala e viene eliminata dalle endonucleasi mentre viene mantenuta l'integrità dell'intero filamento. Nel secondo caso, invece, possono formare legami a ponte tra due filamenti di DNA o all'interno dello stesso filamento provocando però la rottura della doppia elica.

Gli agenti alchilanti sono a loro volta suddivisi in quattro classi che comprendono mostarde azotate, nitrosuree, alcansulfonati e aziridine; sono tutti farmaci ciclo specifici e quindi danneggiano le cellule in qualsiasi fase del ciclo cellulare anche se le cellule in fase S sono maggiormente colpite. Presentano alcuni effetti collaterali quali la mielosoppressione e alcuni disturbi gastrointestinali.

I **composti del platino** sono in grado di formare forti legami covalenti con atomi elettrone-ricchi all'interno di proteine e acidi nucleici; fanno parte di questa classe cisplatino, carboplatino e oxaliplatino. Il cisplatino è usato principalmente per la cura del carcinoma al testicolo e del carcinoma ovarico ma viene usato, in monochemioterapia, anche per il carcinoma della vescica, della cervice uterina, della testa e del collo; gli effetti collaterali dati dall'utilizzo di questo farmaco sono rappresentati da mielotossicità, nefrotossicità e insorgenza di una neuropatia periferica. Il carboplatino, rispetto al cisplatino, viene usato anche nelle neoplasie ematologiche in quanto presenta minore nefrotossicità e neurotossicità. L'oxaliplatino viene usato principalmente per la terapia del carcinoma del colon-retto, ma è efficace anche come terapia di "seconda linea" del carcinoma ovarico; come il cisplatino, l'oxaliplatino induce una neuropatia periferica di tipo sensitivo.

Le **antracicline** e gli **intercalanti del DNA** hanno come target cellulare la doppia elica o le DNA topoisomerasi; si legano al DNA portando ad un aumento della

percentuale di rottura dell'elica, oppure inibiscono le DNA topoisomerasi diminuendo la loro efficacia di riparo del DNA.

Le **protein chinasi** rappresentano una componente cellulare indispensabile per i meccanismi di trasduzione del segnale e per la decisione, da parte della cellula, di iniziare la trascrizione o la sintesi del DNA. In molte forme tumorali è stata dimostrata una attivazione anomala di queste proteine attraverso meccanismi differenti, come l'amplificazione genica, la traslocazione cromosomica, la stimolazione autocrina e paracrina dei fattori di crescita, la perdita degli oncosoppressori o dei regolatori delle fosfatasi e diverse mutazioni che comprendono inserzioni e delezioni a livello delle chinasi stesse.

4. CHEMIOTERAPICI ANTITUBULINICI

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

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

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

4.1 EPOTILONE B

Gli epotiloni sono una classe di composti naturali isolati nel 1987 dal *myxobacterium Sorangium cellulosum* (ceppo *Soce 90*) noto per la sua capacità di degradare la cellulosa. Il gruppo di Reichenbach e Hofle scoprì che in particolare due molecole prodotte da *Soce 90* erano in grado di svolgere un'azione anti-micotica nei confronti della specie fungina *Mucor hiemalis* (Hofle et al., 1993).

Alla famiglia degli epotiloni vennero incluse molecole, chimicamente dette macrolidi, con un anello a 16 atomi di carbonio caratterizzate da una regione epossidica, una tiolica e una chetonica. Le due molecole su cui si focalizzarono gli studi furono l'epotilone A (EPO A) e l'epotilone B (EPO B) che differiscono tra loro per la presenza di un gruppo metile nella regione epossidica (Altmann et al., 2007).

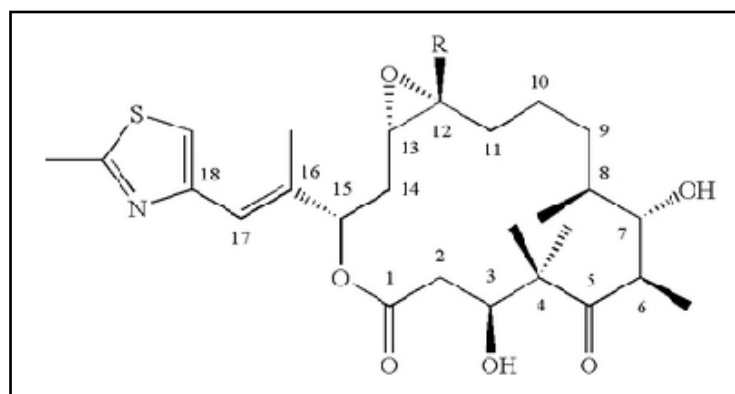


Fig. 3: formula di struttura dell'epotilone B

Rispetto alla maggior parte dei composti antitubulinici gli epotiloni presentano diversi vantaggi tra cui una maggiore resa e minori problemi di solubilità. La maggior parte degli agenti antitubulinici infatti viene prodotta per estrazione da organismi vegetali con rese relativamente basse, gli epotiloni, invece, vengono prodotti attraverso la fermentazione batterica di *Soce 90* e altri *myxobacteria* con rese nell'ordine dei chilogrammi (Mani et al., 2004; Walsh et al., 2003; Tang et al., 2005). Inoltre non presentano neanche i problemi di solubilità riscontrati nell'impiego dei taxani (Gerth et al., 1996) dove si impone l'utilizzo di solventi scarsamente tollerati dai pazienti e che rappresentano una fonte di reazioni di ipersensibilità.

Dalla metà degli anni '90 la ricerca sugli epotiloni ha quindi avuto un enorme impulso focalizzandosi in particolare sull'ottimizzazione delle caratteristiche antineoplastiche dei composti e sulla riduzione degli effetti collaterali che si manifestano con sintomi del tutto simili a quelli degli altri antitubulinici.

Dopo la caratterizzazione della struttura chimica dell'epotilone B (Gerth et al., 1996) sono stati individuati numerosi analoghi naturali, tra i quali EPO C ed EPO D che sono privi di regione epossidica (Hardt et al., 2001; Arslanian et al., 2002; Starks et al., 2003), ed un gran numero di analoghi sintetici e semi-sintetici alcuni dei quali hanno intrapreso il percorso di validazione clinica.

Attualmente sono in corso *trial* clinici per sette molecole della famiglia degli epotiloni; oltre che per l' EPO B (patupilone) e l'analogo lattamico BMS-247550 (ixabepilone) sono in corso le validazioni anche per EPO D (KOS-862), BMS-310705 (C21-amino-EPO B), ABJ879 (C20-desmetil-C20-metilsulfanil-EPO B), 9-10-dideidro-EPO B (KOS-1584) e ZK-EPO (sagopilone).

La messa a punto degli analoghi sintetici ha permesso di mettere in luce il ruolo svolto dalle varie regioni della molecola.

La **regione epossidica**, inizialmente ritenuta necessaria per l'attività antitubulinica, si è rivelata invece non essere un requisito indispensabile dal momento che composti analoghi come EPO C ed EPO D, sebbene privi di tale regione, presentano un'ottima azione antitubulinica (Chou et al., 1998).

Essenziale per l'efficacia antitumorale sembra essere la **regione C9-C11**. Modifiche di tale regione, come anche della regione C3-C8, infatti, hanno generato analoghi con attività antitubulinica decisamente inferiore (Wartmann and Altmann, 2002).

Modifiche apportate al lattone presente nella **regione C1** hanno portato alla sintesi del composto analogo BMS-247550 caratterizzato da una maggiore stabilità chimica rispetto ad EPO B e da una biodisponibilità prolungata. Tuttavia, se l'attività polimerizzante è

comparabile a quella di EPO B, l'efficacia antiproliferativa sembra essere inferiore (Lee et al., 2001).

La **catena laterale**, infine, sembra avere un ruolo importante sia nel determinare l'azione antitubulinica che le caratteristiche farmacocinetiche dell'intera molecola. La sua completa eliminazione induce una perdita completa di tali attività mentre l'inserimento di differenti sostituenti in posizione C21 ha originato nuovi analoghi, come EPO E ed EPO F, che possiedono un'efficacia paragonabile a quella di EPO B ma una ridotta attività nelle linee cellulari che esprimono la glicoproteina-P (*Pgp*) ad alti livelli.

- FARMACODINAMICA DELL'EPOTILONE B

Il meccanismo esatto attraverso cui gli epotiloni legano la β -tubulina non è ancora del tutto chiaro ma diversi studi hanno ipotizzato che il loro sito di legame sia lo stesso dei taxani. Il modello è basato su dati strutturali a bassa risoluzione ottenuti da uno studio di legame tra paclitaxel e β -tubulina che non rendono del tutto chiara neanche la caratterizzazione del farmacoforo dei taxani (Giannakakou et al., 2000).

L'ipotesi di un identico sito di legame a livello della β -tubulina per le due classi di farmaci nasce dalla constatazione che gli epotiloni sono in grado di spiazzare il legame tra paclitaxel e β -tubulina (Kowalski et al., 1997) e dall'evidenza per cui linee tumorali resistenti agli epotiloni, in cui il meccanismo di farmaco-resistenza non è legato a *Pgp* ma a mutazioni sul gene della β -tubulina, sono resistenti anche ai taxani (Giannakakou et al., 1997). Quest'ultima osservazione è stata studiata dal gruppo di Giannakakou, che ha analizzato le mutazioni puntiformi presenti sul gene della β -tubulina in due linee cellulari resistenti a EPO A ed EPO B (Giannakakou et al., 1997). Le mutazioni individuate nel corso di tale studio sono a carico dei codoni che codificano per amminoacidi costituenti il sito di legame tra paclitaxel e proteina (treonina 274, arginina 292); questi rappresentano residui estremamente conservati nelle β -tubuline di mammifero e posti nelle immediate vicinanze di due residui (fenilalanina 270, alanina 364) che, se mutati, rendono le linee cellulari resistenti all'azione del paclitaxel.

Giannakakou ha successivamente ipotizzato la disposizione di EPO B all'interno della tasca di legame attraverso la realizzazione di modelli bioinformatici, individuandone due

possibili disposizioni sulla base della sovrapposizione tra EPO B e paclitaxel (Giannakakou et al., 2000).

Studi più recenti hanno risolto attraverso analisi strutturali NMR il legame tra EPO A e β -tubulina (Carlomagno et al., 2003) e tra EPO A e il dimero $\alpha\beta$ (Nettles et al., 2004) portando all'elaborazione di teorie contraddittorie. Lo studio di Nettles, ad esempio, ha messo in discussione l'idea di un farmacoforo comune tra le due classi di farmaci indicando che se il sito attivo può essere comune non si può dire lo stesso per i differenti tipi di legami deboli che essi instaurano con la β -tubulina. Questi dati però risultano in disaccordo con i dati di relazione tra struttura molecolare e azione farmacologica dove viene attribuita molta importanza alla presenza dell'eossido nella formazione del legame a livello del farmacoforo, mentre la stessa regione non sembra essere necessaria per l'azione antitubulinica del farmaco (Chou et al., 1998).

Sulla modalità di legame tra epotiloni e β -tubulina non vi è dunque ancora completa chiarezza ma i diversi modelli proposti sono utili per chiarire le diverse funzioni svolte dalle varie regioni dell'epotilone che permettono di progettare nuovi analoghi dotati di maggiore efficacia e di un miglior profilo di tossicità.

- FARMACOCINETICA DELL'EPOTILONE B

In letteratura non sono presenti molti dati sulla farmacocinetica degli epotiloni in quanto si basano sui pochi studi preclinici svolti attraverso modelli sperimentali *in vivo* e indagini cliniche attualmente in corso.

La farmacocinetica preclinica sembra fornire dati contraddittori in relazione ai risultati ottenuti in ambito clinico. Nei modelli murini, ad esempio, è inizialmente stato osservato che l'emivita dell'epotilone B è di soli 20 minuti dall'inoculo a causa dell'elevata concentrazione plasmatica e tissutale delle esterasi coinvolte nel catabolismo del lattone (Goodin et al., 2004). Nell'uomo, invece, il farmaco resta attivo nel circolo sanguigno fino a 4-5 giorni dalla somministrazione (Chen and Horwitz, 2002).

Recentemente è stato osservato che una singola dose di EPO B (1.5-4 mg/kg) in topi nudi femmine portatori di due diversi tipi di tumore umano del colon (HCT-15 e HT-29) mostra una rapida distribuzione dal plasma ai diversi tessuti, quali cervello, fegato e muscolo, mantenendo un'emivita di circa 10 ore. In questi modelli si è inoltre visto che

la concentrazione di farmaco riscontrata nel tumore rimane di circa 2 μ M per almeno 24 ore dalla somministrazione (O'Reilly et al., 2008).

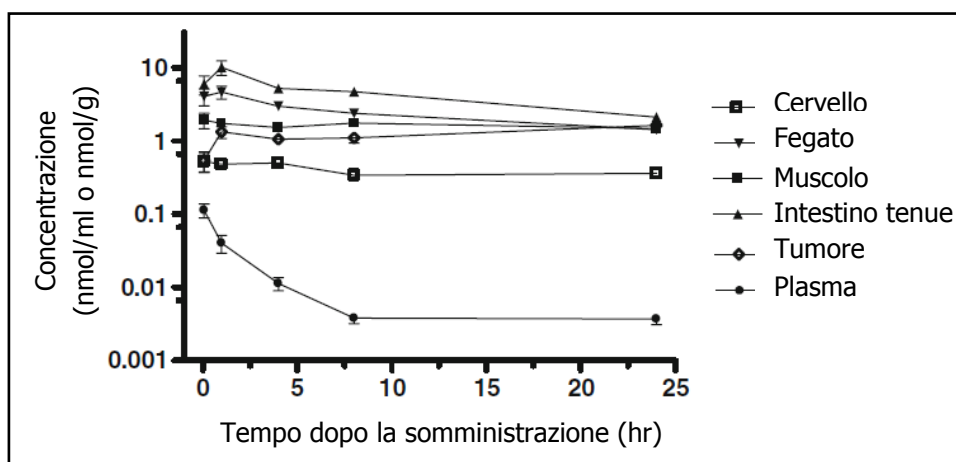


Fig. 4: immagine rappresentativa della farmacocinetica dell'EPO B in topi nudi che portano l'adenocarcinoma del colon in seguito a una singola somministrazione endovenosa di epotilone B (immagine tratta da O'Reilly et al., 2008)

Nello stesso studio hanno anche valutato la farmacocinetica dell'epotilone B in due diversi modelli di ratto con tumore singenico; in particolare sono stati utilizzati ratti Lewis portanti il tumore pancreatico CA20498 e ratti BDix portanti il glioma A15. Come nei modelli murini, anche nei modelli di ratto è stata osservata una rapida eliminazione dal sangue ma una minor eliminazione da cervello, fegato, muscolo e pelle. Questi due modelli confermano quindi un sostanziale *uptake* e la ritenzione da parte del cervello e delle cellule tumorali con una minima eliminazione dopo pochi giorni (O'Reilly et al., 2008).

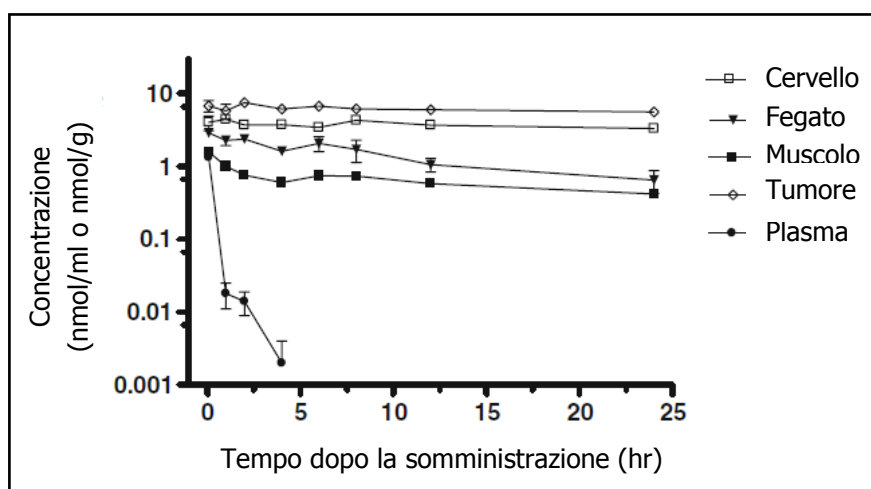


Fig. 5: immagine rappresentativa della farmacocinetica dell'EPO B in topi nudi che portano il tumore pancreatico in seguito a una singola somministrazione endovenosa di epotilone B (immagine tratta da O'Reilly et al., 2008)

Il principale metabolita dell'epotilone B, che si accumula a livello epatico, si forma in seguito alla veloce degradazione del lattone e, in tempi più lenti, dell'eossido (Blum et al., 2001). La conferma che la degradazione del farmaco avvenga a partire dal lattone viene dallo studio di Lee e collaboratori che mostra come l'analogo BMS-247550, che presenta un azoto lattamico al posto del lattone, abbia una stabilità maggiore nel plasma murino rispetto a EPO B (Lee et al., 2001). L'analogo EPO D, invece, che è privo della regione eossidica, possiede un'emivita che raggiunge le 3 ore nei topi (Chou et al., 2001).

Tali analisi, tuttavia, non sono predittive del comportamento degli epotiloni nell'impiego clinico in quanto gli effetti farmacocinetici nell'uomo possono anche essere parzialmente attribuiti al solvente richiesto per la somministrazione del farmaco (Cheng et al., 2008).

I *trial* clinici di EPO B mostrano che la sua biodistribuzione risulta essere molto selettiva in quanto, in seguito a biopsie di tessuto tumorale dopo un'ora dall'inizio del trattamento, sono state rilevate nei tessuti cancerogeni concentrazioni di EPO B pari a 10 volte i livelli plasmatici (Rubin et al., 2005).

4.2 SAGOPILONE

Modificazioni della struttura chimica degli epotiloni hanno evidenziato la capacità di alterarne l'attività biologica e le proprietà farmacologiche (Altmann, 2005; Watkins et al., 2005). Grazie a questa evidenza gli epotiloni di seconda e terza generazione sono stati sintetizzati in modo da avere una maggiore potenzialità antitumorale e un'aumentata solubilità rispetto agli epotiloni naturali (Fumoleau et al., 2007).

Il sagopilone (ZK-EPO) rappresenta il primo composto sintetico di terza generazione derivante dall'epotilone B ed è stato recentemente presentato da un gruppo di ricercatori tedeschi (Klar et al., 2006). In particolare è stato messo in luce che il sagopilone possiede elevate attività ed efficacia, un rapido ed efficiente *uptake* cellulare e non è sottoposto ai consueti meccanismi di fuoriuscita dalla cellula. Questo composto mostra un'elevata attività *in vitro* rispetto ad altri composti appartenenti alla famiglia degli epotiloni e dei taxani già a concentrazioni nanomolari (Schmidt et al., 2010) e, a

differenza dei taxani, sembra essere in grado di attraversare la barriera emato-encefalica svolgendo quindi anche un'azione a livello del sistema nervoso centrale.

L'attività antitumorale del sagopilone *in vitro* è stata testata su 20 differenti linee tumorali umane tra cui linee cellulari di tumore alla mammella, della cervice, del colon, della prostata, di melanoma, del tumore del polmone non a piccole cellule, dell'ovaio, dello stomaco e di leucemia ed è risultato attivo su tutte queste linee cellulari proliferanti mostrando un valore di IC₅₀ inferiore a 1nM (Klar et al., 2006). Questi studi hanno inoltre dimostrato che il sagopilone è in grado di svolgere la sua attività anche verso le linee cellulari normalmente resistenti agli antineoplastici (MDR+) indicando che, rispetto agli altri epotiloni e ai taxani, il sagopilone non viene espulso tramite *Pgp*.

La sua capacità di attraversare la barriera emato-encefalica è stata testata *in vivo* usando modelli di topo e ratto in cui sono stati inoculati diversi tipi di tumori quali la linea cellulare U373 o U87 di glioblastoma, il melanoma MDA-MB-435 o il tumore polmonare non a piccole cellule derivato da pazienti. In tutti i modelli è stata dimostrata la presenza di una concentrazione terapeutica a livello del cervello e, inoltre, il farmaco ha presentato una lunga emivita. In questi modelli il sagopilone è stato ben tollerato ed è stato in grado di inibire la crescita tumorale a livello intracerebrale (Hoffmann et al., 2008).

Anche studi *in vivo* hanno confermato l'attività antitumorale di tale composto verso diversi tipi di tumori umani che risultano resistenti alla terapia con taxani (Klar et al., 2006; Hoffmann et al., 2008).

La configurazione relativa e assoluta del sagopilone è stata confermata tramite un'analisi ai raggi X che ha permesso di caratterizzare meglio le differenze strutturali rispetto all'epotilone B e agli altri composti di questa famiglia (Hofle et al., 1996). In particolare si è visto che, a differenza dell'epotilone B, il sagopilone presenta entrambi i gruppi idrossilici e il gruppo epossidico orientati verso il centro della struttura principale. Questi studi hanno inoltre suggerito che la conformazione del sagopilone all'interno del reticolo cristallino potrebbe non essere la stessa assunta da taxani ed epotiloni nel sito di legame per la tubulina (Klar et al., 2006).

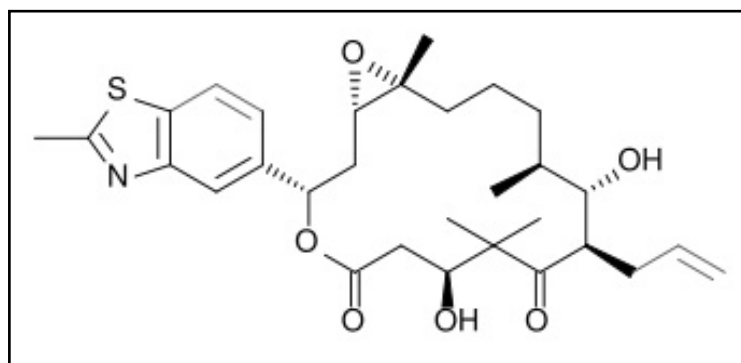


Fig. 6: formula di struttura del sagopilone

- FARMACODINAMICA DEL SAGOPILONE

L'attività antitumorale di paclitaxel ed epotiloni è dovuta principalmente all'arresto mitotico che porta poi a morte per apoptosi (Jordan, 2002; Bhalla, 2003; Bollag et al., 1995) e la loro citotossicità è correlata alla capacità di legare i microtubuli e stabilizzare il fuso mitotico (Sepp-Lorenzino et al., 1999). E' stato però messo in evidenza che il sagopilone è in grado di indurre la polimerizzazione della tubulina più rapidamente rispetto a paclitaxel ed epotilone B e agisce a concentrazioni inferiori rispetto a quelle degli altri agenti antitubulinici e su numerose linee cellulari tumorali. Nonostante queste evidenze si può affermare che il *pathway* molecolare che unisce la polimerizzazione della tubulina all'aberrazione mitotica e all'apoptosi mitocondriale in seguito a trattamento con sagopilone sembra sostanzialmente simile a quello indotto dal paclitaxel e dagli altri epotiloni ma con un maggior coinvolgimento delle proteine della famiglia bcl-2 (Hoffmann et al., 2008). Al contrario di paclitaxel ed epotilone B il sagopilone presenta proprietà farmacodinamiche più favorevoli in quanto viene più rapidamente internalizzato nella cellula e non è sottoposto alla normale espulsione dalla cellula tramite la glicoproteina-P (Hoffmann et al., 2008).

Il sagopilone è principalmente localizzato a livello del citoscheletro cellulare a differenza del paclitaxel che è associato a membrane e nuclei. La stabilizzazione dei microtubuli indotta dall'utilizzo di questi farmaci riduce la solubilità della tubulina portando a una redistribuzione delle proteine dalla frazione citosolica a quella citoscheletrica. Questa

rilocalizzazione proteica risulta più pronunciata in seguito a trattamento con sagopilone rispetto al trattamento con paclitaxel ed è associata a una più elevata concentrazione intracellulare. L'associazione del sagopilone con i microtubuli polimerizzati nella frazione citoscheletrica suggerisce che il sagopilone possiede un effetto sulla polimerizzazione della tubulina.

A livello del ciclo cellulare il sagopilone è in grado di ridurre il numero di cellule che raggiungono anafase e telofase e di bloccare quindi il ciclo cellulare stesso in fase G2/M aumentando la percentuale di cellule che vanno incontro a morte per apoptosi. La morte cellulare indotta dal sagopilone è associata al rilascio di citocromo c da parte dei mitocondri seguito dalla attivazione proteolitica della caspasi-3 (Galluzzi et al., 2007). Inoltre è stato osservato che le cellule trattate con sagopilone perdono il loro potenziale transmembrana a livello mitocondriale prima di morire. Nel processo di morte cellulare quindi le caspasi vengono attivate in seguito a rilascio del citocromo c da parte dei mitocondri attraverso il *pathway* canonico che coinvolge la caspasi-9 e la caspasi-3 rispettivamente come caspasi iniziatrice ed esecutrice (Kroemer et al., 2007).

- FARMACOCINETICA DEL SAGOPILONE

Il profilo farmacocinetico del sagopilone contribuisce al suo elevato effetto antitumorale; sebbene attivi gli stessi *pathway* messi in gioco dai taxani e dagli altri epotiloni il sagopilone viene incorporato più efficientemente nelle cellule e per questo motivo agisce anche a concentrazioni inferiori. Questa sua caratteristica è stata testata sulle cellule della linea tumorale di colon HCT 116 (Hoffmann et al., 2008) e sulle cellule NCI/Adr che sono in grado di resistere alla terapia con i consueti chemioterapici (Klar et al., 2006). La linea cellulare HeLa/MaTu/Adr è stata utilizzata per analizzare l'*uptake* del sagopilone rispetto a quello del paclitaxel; questo esperimento ha evidenziato che l'*uptake* di 3.5 nmol/L di sagopilone è più elevato rispetto a quello del paclitaxel (5.9-11.8 pmol/10⁶ cellule per il sagopilone rispetto a 0.2-3.6 pmol/10⁶ cellule per il paclitaxel). Il rapido *uptake* cellulare del sagopilone è correlato anche al suo effetto antiproliferativo su cellule tumorali già dopo un breve periodo di incubazione di due ore

mentre per l'epotilone B si ha la necessità di un'incubazione di almeno 72 ore (Aghajanian et al., 2007; Whitehead et al., 2006).

La distribuzione del sagopilone è stata studiata utilizzando un modello murino in cui il sagopilone triziato viene somministrato per via endovenosa alla concentrazione di 2.5 mg/kg (Hoffmann et al., 2009). In questo modello la concentrazione cerebrale e la concentrazione plasmatica sono state valutate 10, 20 e 40 minuti dopo la somministrazione di sagopilone mentre le concentrazioni tissutali sono state valutate 30 minuti, 1, 3, 7 e 24 ore dopo la somministrazione di sagopilone. Questo modello ha messo in luce che il sagopilone ha libero accesso al cervello e agli altri organi.

Per valutare i principali parametri farmacocinetici la quantità di farmaco è stata analizzata a livello di plasma, massa tumorale e differenti organi.

In particolare, in questo modello, il valore dell'area sotto la curva (AUC) nelle prime 24 ore dopo la somministrazione di sagopilone è risultato più elevato nel cervello rispetto al plasma e agli altri tessuti mentre la sua concentrazione risulta elevata nel plasma (13 μ M) e nel cervello (5.5 μ M) (Hoffmann et al., 2009).

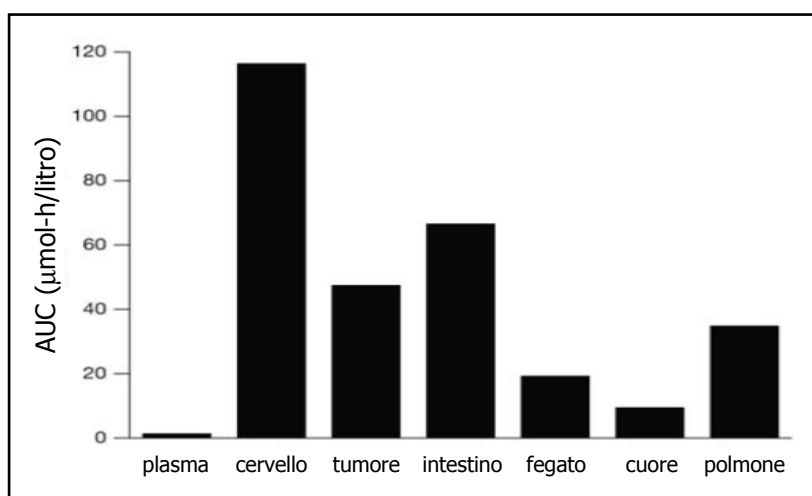


Fig. 7: immagine del parametro AUC in topi NMRI che portano il tumore cervicale in seguito a trattamento con sagopilone 8 mg/kg (immagine tratta da Hoffmann et al., 2009)

Anche l'emivita del farmaco in esame è risultata più elevata nel cervello rispetto a tutti gli altri organi analizzati (Hoffmann et al., 2009).

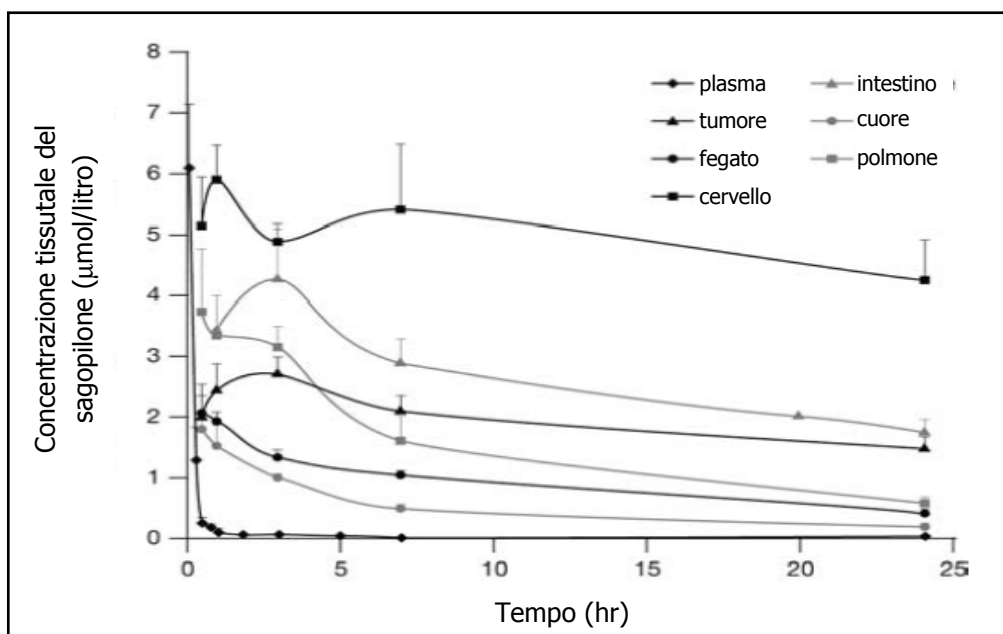


Fig. 8: immagine della distribuzione del sagopilone in topi NMRI che portano il tumore cervicale in seguito a trattamento con sagopilone 8 mg/kg (immagine tratta da Hoffmann et al., 2009)

Un *trial* di fase I effettuato in pazienti con tumori solidi refrattari alla terapia con i consueti chemioterapici ha messo in evidenza che la concentrazione plasmatica del sagopilone raggiunge il suo valore massimo a termine dell'infusione di 30 minuti o 3 ore e che la concentrazione media di tale farmaco a fine infusione (C_{max}) risulta cinque volte più bassa nei pazienti in cui il farmaco è stato somministrato con un'infusione di 3 ore rispetto a quella riscontrata nei pazienti in cui il farmaco è stato somministrato con un'infusione di 30 minuti. Questo stesso studio ha messo in luce che alla fine dell'infusione la concentrazione plasmatica del sagopilone decresce molto rapidamente (presenta un'emivita di circa 3 minuti). Il profilo farmacocinetico risulta lineare e indipendente dalla durata dell'infusione. Il sagopilone ha mostrato quindi un elevato volume di distribuzione e un'elevata *clearance* che si riflette in un rapido *uptake* del farmaco a livello tissutale e un lento rilascio da questi stessi organi (Schmidt et al., 2010).

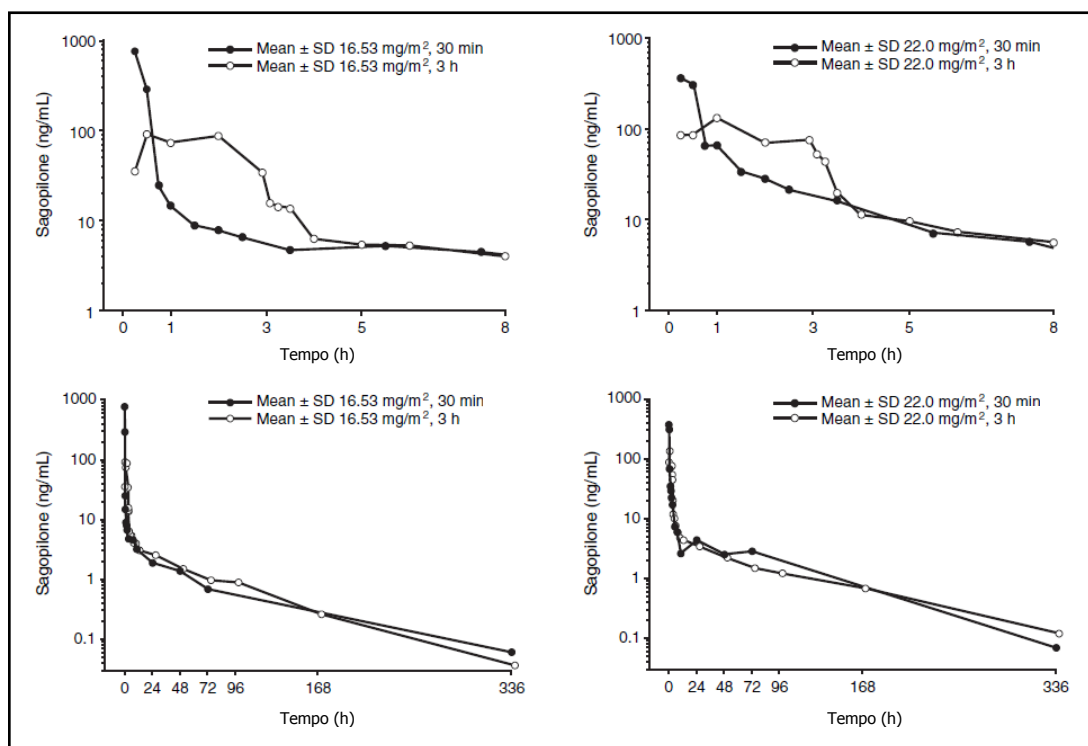


Fig. 9: immagine della distribuzione del sagopilone in pazienti che ricevono quattro diverse dosi di farmaco tramite infusione di 30 minuti o di 3 ore (immagine tratta da Schmidt et al., 2010)

4.3 NEUROTOSSICITA' DA EPOTILONI

Il profilo tossicologico degli epotiloni può considerarsi sovrapponibile a quello dei taxani. I *trial* clinici di BMS-247550, ad esempio, hanno messo in luce l'insorgenza di una grave forma di neuropatia sensitiva con una frequenza compresa tra il 3% e il 20% dei pazienti (Lee et al., 2006), mentre la neuropatia sviluppata in seguito ad uso di EPO B presenta un'incidenza minore (Hussain et al., 2005; Rubin et al., 2001). Diversi *trial* clinici di ixabepilone e KOS-862 mostrano l'insorgenza di una neuropatia principalmente sensitiva e, in una bassa percentuale di casi, motoria. I *trial* clinici di fase I di ZK-EPO mostrano che l'insorgenza della neuropatia rappresenta il maggior effetto collaterale (Canta et al., 2009).

Sul motivo per cui molecole così simili non condividano un profilo tossicologico omogeneo non è possibile che fare supposizioni e gli studi di farmacocinetica sono indispensabili nella ricerca di tali risposte.

5. MODELLI IN VIVO

L'utilizzo dei modelli *in vivo* nel campo della ricerca è necessario per riprodurre, e meglio comprendere, i meccanismi alla base di alcune patologie e l'azione dei farmaci di impiego clinico all'interno di un organismo complesso e paragonabile a quello umano.

Prima di passare ad uno step *in vivo* si procede con lo studio dell'attività di un farmaco *in vitro*. Quest'ultimo metodo, però, non è in grado di fornire informazioni circa la biodistribuzione del farmaco nell'organismo che può pesantemente inficiare l'attività del farmaco stesso, o evidenziare l'insorgenza di effetti collaterali indesiderati in determinati distretti corporei.

Sono numerosi i modelli animali di neuropatia periferica attualmente utilizzati negli studi preclinici; sono stati sviluppati, ad esempio, modelli di Neuriti Sperimentali Autoimmuni (EAN) che sono stati utilizzati per studiare neuropatie autoimmuni come la GBS e CIDP (Maurer et al., 2002). E' stato possibile riprodurre, poi, alcune neuropatie ereditarie generando mutazioni nei geni noti per essere alla base della patologia in studio (Martini, 2000).

5.1 MODELLI IN VIVO DI EPOTILONE B

L'epotilone B è un potente farmaco antineoplastico il cui uso in clinica, tuttavia, è limitato dalla presenza di importanti effetti tossici quali neutropenia, trombocitopenia, diarrea, nausea e comparsa di una neuropatia di tipo sensitivo. La gravità della neutropenia e dei sintomi neuropatici inducono la riduzione delle dosi di somministrazione e, nella maggior parte dei casi, la sospensione della cura stessa.

I primi modelli sviluppati per caratterizzare l'attività dell'epotilone B sono stati condotti in topi CB-SCID portatori di una forma di leucemia umana. In questo modello il composto è stato somministrato 0.7 mg/kg al giorno e 1.5 o 3 mg/kg a settimana per via endovenosa e per via intraperitoneale; in entrambi i casi, è stata vista una riduzione del 60-86% della massa tumorale (Altmann et al., 2000).

Un altro modello in cui l'epotilone B viene somministrato 0.3 o 0.6 mg/kg per via intraperitoneale e endovenosa in topi nudi portatori di tumore alla mammella mostra l'insorgenza di una severa neurotossicità, più lieve nel caso della somministrazione

endovenosa, e un limitato effetto sulla riduzione della massa tumorale (Chou et al., 1998).

L'attività antitumorale dell'epotilone B, somministrato per via endovenosa, è stata quindi studiata utilizzando modelli sviluppati in topi nudi che ne hanno mostrato una potente attività antitumorale in diversi tipi di tumore umano quali polmone, mammella, colon e prostata mostrando una marcata inibizione e regressione della massa tumorale (Altmann et al., 2000).

L'epotilone B si è dimostrato efficace anche in un modello di carcinoma epidermoide (KB-8511) che risulta non responsivo al trattamento con paclitaxel. In tutti questi esperimenti la somministrazione di epotilone B è associata a perdita di peso corporeo e, occasionalmente, morte (Goodin et al., 2004; Canta et al., 2009).

Mentre l'efficacia dell'epotilone B è stata studiata in modelli murini la sua azione neurotossica è stata analizzata in due modelli sviluppati usando ratti Wistar e Fischer. In entrambi questi modelli la somministrazione di epotilone B è stata associata a perdita di peso corporeo e diminuzione della velocità di conduzione, alterazioni comportamentali e alterazioni patologiche e iper-polimerizzazione della tubulina a livello del nervo sciatico (Chiorazzi et al., 2009).

5.2 MODELLI IN VIVO DI SAGOPILONE

Il sagopilone è un potente farmaco antineoplastico attualmente sottoposto a numerosi *trial* clinici. Questi studi, effettuati in pazienti con cancro alla mammella, colangiocarcinoma e melanoma, hanno mostrato che la somministrazione di sagopilone è associata all'insorgenza di neuropatia periferica come effetto dose limitante.

I primi modelli sviluppati per caratterizzare l'attività del sagopilone sono stati effettuati in topi nudi xeno-trapiantati con cellule appartenenti alla linea di tumore della cervice (HeLa/MaTu). In questo studio si è visto che il farmaco risulta ben tollerato con una minima riduzione di peso degli animali; inoltre è stato osservato che una singola somministrazione di sagopilone è in grado di indurre la completa inibizione della crescita tumorale in maniera dose-dipendente (Klar et al., 2006).

Un altro modello effettuato in topi nudi è stato condotto per valutare l'uso preventivo e curativo del sagopilone. Per lo studio del trattamento preventivo il sagopilone è stato somministrato in concomitanza con la somministrazione delle cellule tumorali e gli animali sono stati monitorati giornalmente. Per valutarne l'effetto curativo, invece, la somministrazione di sagopilone è stata iniziata 13 giorni dopo l'iniezione delle cellule tumorali. In entrambi i casi gli animali trattati con sagopilone hanno mostrato una significativa riduzione della cachessia indotta dalla massa tumorale e una riduzione dell'area e del numero di lesioni rispetto agli animali trattati con il solo veicolo. In tutti e due i modelli il sagopilone è stato in grado di ridurre significativamente la massa tumorale (Strube et al., 2009).

L'attività antitumorale del sagopilone è stata anche valutata mediante lo sviluppo di un modello in cui i topi nudi NMRI sono stati inoculati con diverse linee tumorali quali il glioblastoma U373 e U87 e il melanoma MDA-MB-435. In questo modello è stato evidenziato che il sagopilone viene ben tollerato dagli animali ed è attivo a livello intracerebrale e subcutaneo inducendo l'inibizione della crescita della massa tumorale (Hoffmann et al., 2009).

Tutti questi studi *in vivo* hanno quindi confermato l'efficacia del sagopilone verso differenti tipi di tumori umani includendo quelli che normalmente non rispondono alla terapia con i consueti chemioterapici (Klar et al., 2006; Hoffmann et al., 2008).

Questi modelli preclinici indicano che il sagopilone presenta un'attività antitumorale maggiore rispetto a quella dei taxani e degli epotiloni di seconda generazione; il sagopilone potrebbe quindi risultare efficace in clinica come farmaco di prima linea per il trattamento di tumori resistenti ai consueti chemioterapici (Klar et al., 2006).

6. NEUROPROTETTORI

La crescita ed il trofismo dell'assone dipendono dall'integrità anatomica e molecolare del neurone e dal reciproco scambio di informazioni fra esso e la cellula di Schwann. Le proprietà dell'assone sono fondamentali per il corretto funzionamento neuronale. In base all'assenza o presenza di avvolgimento mielinico e alle loro dimensioni, gli assoni conducono più o meno velocemente l'impulso nervoso (Tasaki, 1982). Un danno qualsiasi che si verifica a livello dell'assone si riflette quindi in maniera significativa sulla

funzione nervosa e sulla trasmissione dell'impulso. La patologia assonale può essere primitiva, se il meccanismo patogenetico agisce direttamente sull'assone, o secondaria, se riflette un danno della cellula gliale o della mielina.

I meccanismi ritenuti più importanti nel mediare il danno dell'assone sono la disorganizzazione dei canali ionici, la liberazione di glutammato e la produzione di ossido nitrico, la carenza di fattori neurotrofici, l'alterazione del trasporto assonale, la sofferenza mitocondriale, l'azione tossica diretta di citochine proinfiammatorie e l'alterata espressione di proteine che mediano i rapporti glia-assone. Molte molecole sono pertanto potenzialmente efficaci nel trattamento o nella prevenzione del danno assonale; fra queste ricordiamo i fattori neurotrofici [*nerve growth factor* (NGF) (Schmidt et al., 1995)], alcuni farmaci antiepilettici (gabapentin, lamotrigina, topiramato), gli antagonisti dei canali del Na (ralfinamide) e dei canali del Ca, gli antiossidanti [acido α -lipoico (Melli et al., 2008), vitamina E (Argyriou et al., 2005; Argyriou et al., 2006)], e infine alcune molecole con meccanismi di azione complessi [eritropoietina (Maggioni et al., *in press*), Acetil-L-carnitina (Flatters et al., 2006; Maestri et al., 2005; Bianchi et al., 2005)] (Schenone et al., 2005).

La compromissione dell'assone nelle malattie demielinizzanti solitamente è secondaria ad una perdita cronica di mielina e si manifesta sul piano neuropatologico come una atrofia assonale; in questo caso il diametro assonale si riduce significativamente e la densità dei neurofilamenti (NF) aumenta insieme ad una defosforilazione dei NF stessi.

La pratica clinica suggerisce che la gravità dei sintomi nelle neuropatie periferiche demielinizzanti acquisite o ereditarie è dovuta all'entità del danno assonale ed è perciò importante che la ricerca si orienti verso lo studio di tale danno tramite l'utilizzo di modelli animali o *in vitro* di neuropatie periferiche ereditarie o acquisite e verso la protezione da tale danno grazie alla presenza di molecole con potenziale effetto neuroprotettivo (Sancho et al., 1999; Nobbio et al., 2001; Adam et al., 1989). È probabile che l'azione neuroprotettiva delle molecole sopra citate interferisca con il meccanismo del danno assonale ma sia indipendente dalla causa specifica di questo.

7. MICROTUBULI

Il citoscheletro cellulare è composto principalmente da tre tipi di filamenti: filamenti di actina, microtubuli e filamenti intermedi. I microtubuli e i filamenti di actina sono costituiti da subunità di proteine globulari che si possono associare e dissociare rapidamente. Il citoscheletro contiene, inoltre, molte altre specie proteiche accessorie che legano i filamenti fra loro o ad altri componenti cellulari, come la membrana plasmatica per produrre movimenti ameboidi o delle ciglia.

7.1 STRUTTURA E RUOLO FISIOLÓGICO

I **filamenti di actina** sono composti da due subunità diverse e in genere formano una serie di fasci paralleli posti immediatamente al di sotto della membrana cellulare; questi filamenti funzionano da supporto meccanico soprattutto nelle divisioni cellulari.

I **filamenti intermedi** sono costituiti da subunità fibrose di dimensioni molto diverse a seconda delle cellule in cui si trovano, associate a creare una struttura a cordone. La loro funzione è di tipo strutturale e per questo motivo sono particolarmente abbondanti nelle cellule sottoposte a resistenza meccanica.

I **microtubuli** sono formati dall'assemblaggio di subunità α e β di tubulina e sono coinvolti in numerosi processi (Jordan and Wilson, 2004); in particolare svolgono un ruolo importante nel trasporto intracellulare di macromolecole, nella segregazione cromosomica durante la divisione cellulare, nel mantenimento di una corretta morfologia cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi (Manfredi and Horwitz, 1984; Wang et al., 1999; Jordan and Wilson, 2004).

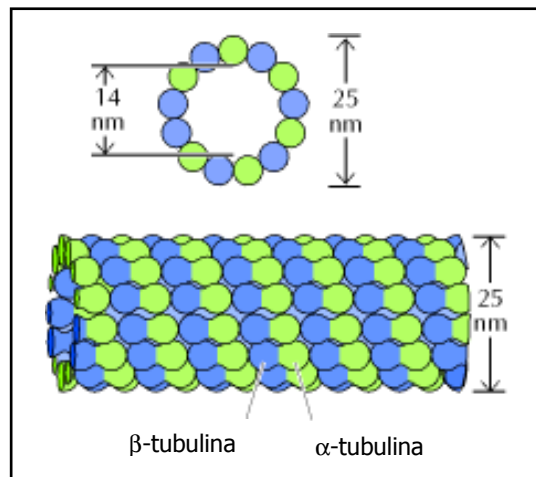


Fig. 12: struttura dei microtubuli

La polimerizzazione dei microtubuli avviene tramite un meccanismo di nucleazione ed elongazione attraverso il quale la formazione relativamente lenta di un corto nucleo è seguita da un rapido allungamento all'estremità + tramite l'aggiunta di dimeri di tubulina con legami non covalenti. I microtubuli mostrano una complessa dinamicità che usa energia attraverso l'idrolisi di GTP e che risulta essere cruciale per le funzioni cellulari (Jordan and Wilson, 2004).

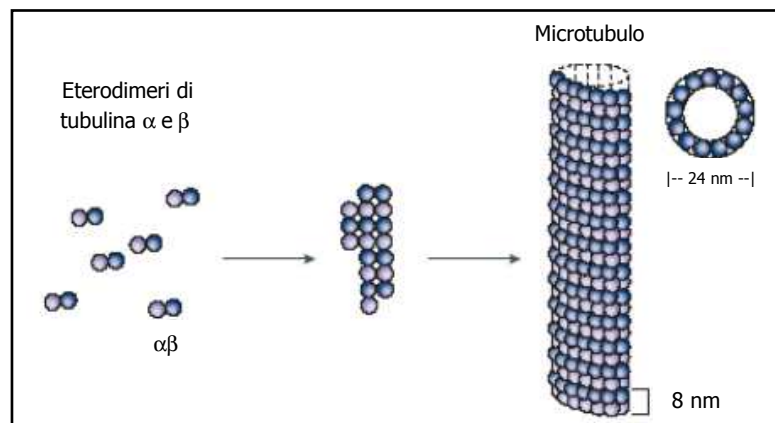


Fig. 13: schema di polimerizzazione dei microtubuli

Tramite studi *in vitro* si è visto che a bassissime concentrazioni di tubulina libera sia l'estremità + che quella - si accorciano ma, man mano che la concentrazione di tubulina libera aumenta, la depolimerizzazione rallenta fino a che non si raggiunge un punto di

equilibrio dinamico detto punto critico. Al contrario, sempre in modelli *in vitro*, se le concentrazioni di tubulina libera sono abbastanza elevate i microtubuli si formano spontaneamente, ossia senza bisogno di un punto di innesco come invece avviene nella cellula grazie alla presenza della tubulina- γ , una molecola a forma di anello presente sul centrosoma. Mantenendo bassa la concentrazione di tubulina libera la cellula può controllare la formazione dei microtubuli i quali presenteranno, quindi, un'instabilità dinamica dovuta a continua polimerizzazione e depolimerizzazione a partire dal centrosoma.

Nella cellula la polimerizzazione dei microtubuli viene organizzata da strutture specializzate, dette centri di organizzazione dei microtubuli, le quali forniscono una base per il loro allungamento. Nelle cellule umane il principale centro, detto centrosoma, si trova vicino al nucleo ed è costituito in genere da una coppia di cilindretti cavi, i centrioli, la cui parete è formata da 9 triplette di microtubuli. Dai centrioli si organizzano i microtubuli che danno origine al fuso mitotico, che serve da guida per indirizzare i cromosomi ai due poli della cellula in divisione.

La stessa organizzazione dei centrioli la ritroviamo in altre strutture cellulari, come i corpuscoli basali, che hanno il compito di funzionare da impianto per l'organizzazione di ciglia e flagelli. Le ciglia e i flagelli sono sottili appendici filiformi in grado di muoversi, presenti sulla superficie di alcune cellule. Essi sono strutturati in un fascio di microtubuli paralleli organizzati in nove coppie poste sulla circonferenza più una coppia al centro, tutto collegato da proteine trasversali. La loro funzione primaria è quella di muovere i fluidi sulla superficie di una cellula o di spingere una cellula isolata attraverso un fluido.

Il microtubulo possiede una polarità intrinseca che è dovuta alla disposizione delle subunità proteiche di tubulina; esse, infatti, sono orientate nella stessa direzione in modo che tutte le subunità di tubulina α siano rivolte verso la stessa estremità del microtubulo, determinando una diversità strutturale e chimica tra le due estremità.

Le diversità funzionali delle estremità dei microtubuli sono dovute a caratteristiche quali:

- ✓ la presenza di proteine associate ai microtubuli (MAPs) che convertono la rete instabile di microtubuli in una ossatura relativamente permanente;
- ✓ la presenza della tubulina solubile;

- ✓ la presenza di proteine che incapsulano l'estremità crescente della tubulina impediscono la depolimerizzazione.

7.2 AZIONE DEI FARMACI ANTITUBULINICI

Dal momento che il corretto movimento dei cromosomi e l'appropriata segregazione nelle cellule figlie richiede un'attiva dinamicità, la mitosi risulta un processo altamente sensibile all'azione dei farmaci attivi sui microtubuli. I microtubuli sono in un equilibrio dinamico con i dimeri di tubulina da cui sono costituiti e i farmaci antitubulinici alterano l'equilibrio di polimerizzazione/depolimerizzazione dei microtubuli provocando la formazione di strutture polimerizzate altamente stabili, alterando i meccanismi che regolano il ciclo cellulare. La funzionalità biologica dei microtubuli è regolata in larga parte proprio attraverso la dinamica della polimerizzazione.

Gli agenti antitubulinici includono farmaci in grado di interagire con la tubulina polimerizzata prevenendone la depolimerizzazione quali taxani ed epotiloni e farmaci che interagendo con i monomeri di tubulina ne prevengono la polimerizzazione tra cui la vincristina (Wang et al., 1999). Entrambe le classi di farmaci antitubulinici, attraverso la disorganizzazione dei microtubuli, sono in grado di promuovere l'apoptosi delle cellule tumorali attraverso la fosforilazione di bcl-2 che porta alla sua inattivazione (Haldar et al., 1995). Gli effetti che gli agenti antitubulinici svolgono sulla funzione cellulare sono complessi e coinvolgono differenti pathway apoptotici di trasduzione del segnale quali: c-Raf-1/Ras/bcl-2, p53/p21WAF1/CIP1, Protein chinasi A e MAPK/p34cdc2-ciclina A e B kinasi. In particolare la distruzione della struttura dei microtubuli da parte degli agenti antitubulinici si trasmette nell'induzione del *tumor-soppressore* p53, nell'inibizione delle chinasi ciclina-dipendenti, nella attivazione e inattivazione di diverse protein chinasi associate direttamente o indirettamente con la fosforilazione di bcl-2. Come detto in precedenza la fosforilazione di bcl-2 è associata alla perdita della sua funzionalità antiapoptotica (Basu and Haldar, 1998).

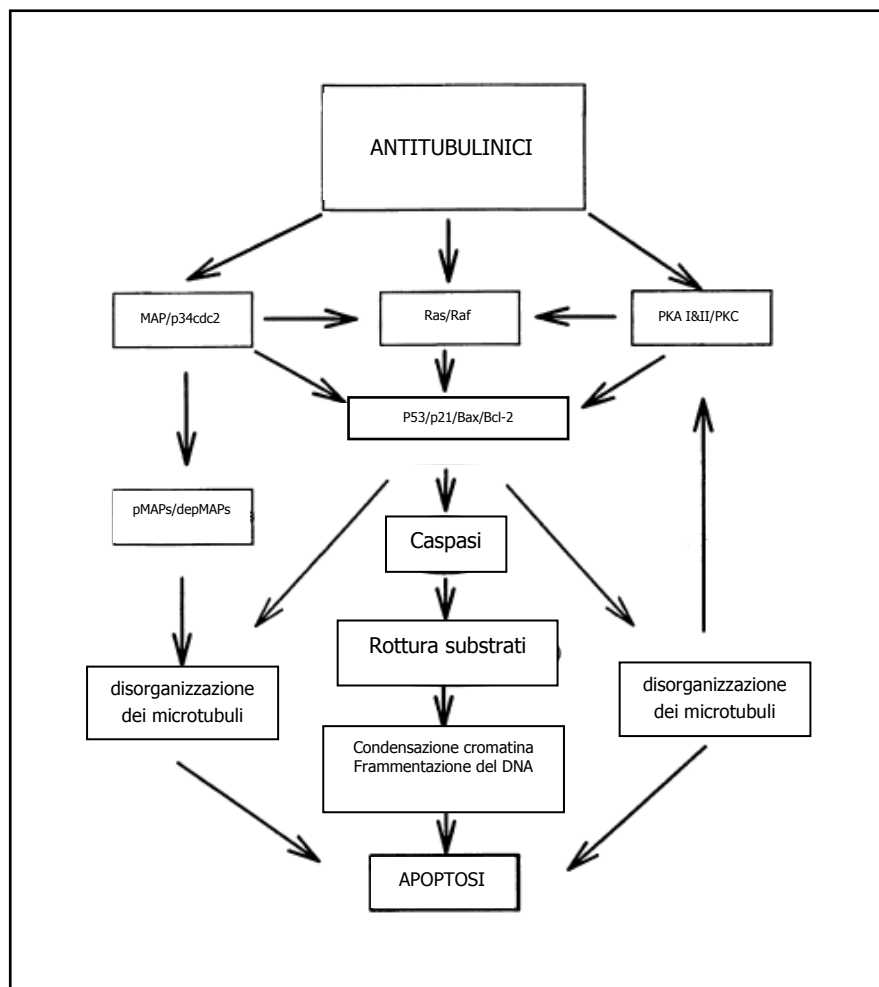


Fig. 14: immagine rappresentativa dell'effetto degli agenti antitubulinici sul *pathway* di trasduzione del segnale dell'apoptosi

Materiali e Metodi

1. MODELLO IN VITRO di NEUROTOSSICITA' PERIFERICA

1.1 COLTURE ORGANOTIPICHE DEI GANGLI DELLE RADICI DORSALI

Per investigare l'insorgenza della neuropatia periferica e della neurotossicità che si sviluppano in seguito alla somministrazione di chemioterapici in letteratura vengono usati differenti modelli preclinici *in vitro* e *in vivo* (Scuteri et al., 2006; Chiorazzi et al., 2009; Cavaletti et al., 1997; Cavaletti et al., 2002). Sebbene i modelli *in vivo* siano più rappresentativi della realtà sono, al tempo stesso, di più difficile interpretazione e quindi in questo studio siamo partiti dalla messa a punto di un modello *in vitro*. A tale scopo sono state allestite colture organotipiche dei gangli delle radici dorsali per valutare la neurotossicità periferica indotta dalla somministrazione di epotilone B (Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland) e sagopilone (Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland).

Per l'allestimento di tali colture i DRG sono stati prelevati in condizioni di sterilità da embrioni di ratti Sprague-Dawley al 15° giorno e piastrati su *dish* collagenate del diametro di 35 mm. I DRG sono poi stati incubati per due ore a 37°C e al 5% di CO₂ in terreno AN₂ contenente MEM addizionato con *Calf Bovine Serum* al 10%, 50 µg/ml di Acido Ascorbico, 1.4 mM di L-Glutamina e Glucosio allo 0.6%. A tale terreno sono poi stati aggiunti *Nerve Growth Factor* (NGF) e *Floroxuridine* (Fudr) rispettivamente alle concentrazioni di 5 ng/ml e 10⁻⁵ M con la funzione di rimuovere le cellule di supporto (Scuteri et al., 2006).

Al termine delle due ore, per studiare gli effetti neurotossici dell'epotilone B e del sagopilone sull'allungamento del neurite, i DRG sono stati trattati con differenti concentrazioni dei due farmaci per 24 e 48 ore usando i DRG trattati con il solo terreno AN₂ addizionato con NGF come controllo.

I DRG sono stati fotografati attraverso un microscopio a contrasto di fase 24 e 48 ore dopo l'aggiunta del farmaco e la neurotossicità è stata valutata misurando la lunghezza

del neurite maggiore in ciascun DRG attraverso il software ImageJ (NIH, Bethesda, Md, USA). La variazione della lunghezza del neurite, comparata a quella controllo tramite una griglia di calibrazione fotografata nelle stesse condizioni, viene espressa come percentuale del decremento rispetto alla lunghezza dei neuriti delle colture controllo. Sui risultati ottenuti è stata svolta un'analisi della varianza (ANOVA), su cui è stato poi svolto il Test di Tukey come post-test, con il *software* Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, Ca, USA).

2. MODELLO IN VIVO di NEUROTOSSICITA' PERIFERICA

2.1 ANIMALI UTILIZZATI

Gli animali utilizzati nel nostro studio sono ratti Wistar e Fischer femmina di peso corporeo iniziale compreso tra i 175 ed i 200 g. La scelta di tali ceppi è stata fatta in accordo con i dati presenti in letteratura riguardanti i modelli animali di neuropatia periferica sviluppati dall'utilizzo dei due chemioterapici presi in esame.

I ratti Wistar rappresentano un ceppo molto utilizzato per la messa a punto di modelli tossicologici e neurotossicologici; a tale scopo su di essi sono stati realizzati modelli di neurotossicità per diversi chemioterapici di uso clinico quali il cisplatino (Bianchi et al., 2007) e composti del platino (Cavaletti et al., 2002), il paclitaxel (Cavaletti et al., 1995) e il docetaxel (Persohn et al., 2005). Rispetto ai ratti Wistar i ratti Fischer presentano caratteristiche fisiologiche e metaboliche che li rendono più "fragili" ma nonostante questa loro caratteristica i ratti Fischer sono stati scelti poiché vengono comunemente utilizzati per studiare l'efficacia farmacologica dei chemioterapici oltre che la loro neurotossicità. In tale ceppo infatti è possibile inoculare un tumore e valutarne la regressione indotta dal farmaco antitumorale in esame, operazione che risulta più complessa da portare a termine su ratti Wistar (Yemishi et al., 2006).

Gli animali vengono stabulati, a gruppi di 2/3 ratti per gabbia, in un ambiente caratterizzato da un ciclo di luce-buio artificiale di 12 ore e da temperatura di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidità del $55\pm 10\%$ controllate e costanti 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).

2.2 FARMACI UTILIZZATI

✓ EPOTILONE B (EPO B)

L' EPOTILONE B (Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland) si presenta sotto forma di polvere bianca cristallina, sensibile alla luce e al calore e viene quindi conservato al buio a -20°C. Esso viene disciolto in un veicolo di somministrazione composto al 30% da polietilenglicole 300 (PEG 300) e al 70% da soluzione salina. Il farmaco viene preparato fresco prima di ogni somministrazione che avviene per via endovenosa (iv) a livello della vena caudale dell'animale. La soluzione iniettabile viene preparata e mantenuta in ghiaccio fino al momento della somministrazione. La modalità di somministrazione è la stessa che si intende utilizzare nella pratica clinica.

✓ SAGOPILONE (ZK-EPO)

Il SAGOPILONE (Bayer Schering Pharma AG, Berlin, Deutschland) si presenta sotto forma di polvere bianca cristallina sensibile alla luce e viene quindi conservato al buio a temperatura ambiente. Esso viene disciolto nel veicolo di somministrazione HP- β -CD fornito dalla casa produttrice. Il farmaco viene preparato fresco prima di ogni somministrazione che avviene per via endovenosa (iv) a livello della vena caudale dell'animale. La modalità di somministrazione è la stessa che si intende utilizzare nella pratica clinica.

2.3 EXPERIMENTAL DESIGN

✓ Tossicità periferica indotta dalla somministrazione di epotilone B

Per ottenere un modello di neuropatia periferica indotto dalla somministrazione di epotilone B sono stati utilizzati 25 ratti Fischer femmine randomizzati in cinque gruppi da cinque animali ciascuno e trattati secondo tale schema:

Gruppo 1: animali di controllo non trattati

Gruppo 2: animali trattati con epotilone B ad una concentrazione di 0.25 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (EPO B 0.25 mg/kg 1qw x 4)

Gruppo 3: animali trattati con epotilone B ad una concentrazione di 0.5 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (EPO B 0.5 mg/kg 1qw x 4)

Gruppo 4: animali trattati con epotilone B ad una concentrazione di 1 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (EPO B 1 mg/kg 1qw x 4)

Gruppo 5: animali trattati con epotilone B ad una concentrazione di 1.5 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (EPO B 1.5 mg/kg 1qw x 4)

Metà degli animali di ciascun gruppo sono stati monitorati per altre 4 settimane (*follow-up*) dopo il termine del periodo di trattamento.

Sono stati valutati giornalmente la mortalità e lo stato di salute generale degli animali; il controllo del peso, invece, è stato effettuato due volte alla settimana. Alla fine del periodo di trattamento è stata valutata la velocità di conduzione dell'impulso nervoso lungo il nervo caudale e, successivamente, l'animale è stato sacrificato per inalazione di CO₂. Da tre animali gruppo sono stati prelevati la cute per la determinazione della densità delle fibre intraepidermiche e i nervi ischiatici per la determinazione dell'espressione delle proteine mieliniche e l'analisi morfologica e morfometrica di una possibile neurotossicità indotta dai trattamenti.

Esperimento 1 Gruppi	Schedula di somministrazione settimanale 5 animali/gruppo
Gruppo 1	Animali non trattati
Gruppo 2	EPO B iv 0.25 mg/kg 1qw x 4
Gruppo 3	EPO B iv 0.5 mg/kg 1qw x 4
Gruppo 4	EPO B iv 1 mg/kg 1qw x 4
Gruppo 5	EPO B iv 1.5 mg/kg 1qw x 4

✓ **Ricerca della massima dose tollerata di sagopilone**

Per mettere a punto un modello in grado di valutare quale sia la massima dose di sagopilone tollerata e ottenere un modello di neuropatia periferica sono stati utilizzati 30 ratti Wistar femmine randomizzati in sei gruppi da cinque animali ciascuno e trattati secondo tale schema:

Gruppo 1: animali di controllo non trattati

Gruppo 2: animali trattati con il veicolo

Gruppo 3: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 0.6 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 0.6 mg/kg 1qw x 4)

Gruppo 4: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 1.2 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 1.2 mg/kg 1qw x 4)

Gruppo 5: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 1.8 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 1.8 mg/kg 1qw x 4)

Gruppo 6: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 2.4 mg/kg una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 2.4 mg/kg 1qw x 4)

Sono stati valutati giornalmente la mortalità e lo stato di salute generale degli animali; il controllo del peso, invece, è stato effettuato due volte alla settimana. Prima dell'inizio dei trattamenti, due settimane dopo l'inizio e alla fine del periodo di trattamento è stata valutata la velocità di conduzione dell'impulso nervoso lungo il nervo caudale e, successivamente, l'animale è stato sacrificato per inalazione di CO₂. Da tre animali trattati con ZK-EPO 2.4 mg/kg e da tre animali appartenenti al gruppo controllo sono

stati prelevati i nervi ischiatici per effettuare l'analisi morfologica e valutare una possibile neurotossicità indotta dal trattamento.

Esperimento 2	Schedula di somministrazione settimanale
Gruppi	5 animali/gruppo
Gruppo 1	Animali non trattati
Gruppo 2	Animali trattati con il veicolo
Gruppo 3	ZK-EPO iv 0.6 mg/kg 1qw x 4
Gruppo 4	ZK-EPO iv 1.2 mg/kg 1qw x 4
Gruppo 5	ZK-EPO iv 1.8 mg/kg 1qw x 4
Gruppo 6	ZK-EPO iv 2.4 mg/kg 1qw x 4

✓ **Ricerca della corretta scheda di somministrazione di sagopilone**

Avendo stabilito, tramite il modello precedente, le dosi da utilizzare in grado di indurre la neuropatia periferica, per stabilire quale fosse il miglior metodo di infusione del sagopilone è stato messo a punto un altro modello in cui sono stati utilizzati 54 ratti Wistar femmine randomizzati in otto gruppi da sei animali ciascuno e trattati secondo tale schema:

Gruppo 1: animali di controllo non trattati

Gruppo 2: animali trattati con il veicolo

Gruppo 3: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 1.2 mg/kg somministrato in bolo una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 1.2 mg/kg 1qw x 4, bolo)

Gruppo 4: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 1.2 mg/kg somministrato tramite un'infusione di 30 minuti una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 1.2 mg/kg 1qw x 4, inf 30')

Gruppo 5: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 1.2 mg/kg somministrato tramite un'infusione di 3 ore una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 1.2 mg/kg 1qw x 4, inf 3 ore)

Gruppo 6: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 2.4 mg/kg somministrato in bolo una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 2.4 mg/kg 1qw x 4, bolo)

Gruppo 7: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 2.4 mg/kg somministrato tramite un'infusione di 30 minuti una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 2.4 mg/kg 1qw x 4, inf 30')

Gruppo 8: animali trattati con sagopilone ad una concentrazione di 2.4 mg/kg somministrato tramite un'infusione di 3 ore una volta a settimana per quattro settimane (ZK-EPO 2.4 mg/kg 1qw x 4, inf 3 ore)

Sono stati valutati giornalmente la mortalità e lo stato di salute generale degli animali; il controllo del peso, invece, è stato effettuato due volte alla settimana. Prima dell'inizio dei trattamenti, due settimane dopo l'inizio e alla fine del periodo di trattamento è stata valutata la velocità di conduzione dell'impulso nervoso lungo il nervo caudale e, successivamente, l'animale è stato sacrificato per inalazione di CO₂. Da tre animali gruppo sono stati prelevati fegato e rene per effettuare analisi istopatologiche. Alla fine del periodo di trattamento sono stati effettuati prelievi di sangue per valutazioni ematologiche e ematochimiche di BUN, creatinina, AST e ALT; sono inoltre stati prelevati i nervi sciatici per effettuare analisi morfologiche e morfometriche e per valutare il grado di polimerizzazione della β -tubulina in seguito al trattamento con sagopilone.

Esperimento 3	Schedula di somministrazione settimanale
Gruppi	6 animali/gruppo
Gruppo 1	Animali non trattati
Gruppo 2	Animali trattati con il veicolo
Gruppo 3	ZK-EPO iv 1.2 mg/kg 1qw x 4, bolo
Gruppo 4	ZK-EPO iv 1.2 mg/kg 1qw x 4, inf 30'
Gruppo 5	ZK-EPO iv 1.2 mg/kg 1qw x 4, inf 3 ore
Gruppo 6	ZK-EPO iv 2.4 mg/kg 1qw x 4, bolo
Gruppo 7	ZK-EPO iv 2.4 mg/kg 1qw x 4, inf 30'
Gruppo 8	ZK-EPO iv 2.4 mg/kg 1qw x 4, inf 3 ore

3. VALUTAZIONE della TOSSICITA' GENERALE e della NEUROTOSSICITA' INDOTTA da CHEMIOTERAPICI

3.1 TOSSICITÀ GENERALE

✓ Valutazione giornaliera dello stato di salute degli animali

Lo stato di salute degli animali è stato monitorato quotidianamente attraverso un'osservazione soggettiva 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).

✓ Valutazione del peso corporeo

La valutazione ponderale di ogni animale è stata effettuata all'inizio della sperimentazione e bisettimanalmente durante tutto il periodo di trattamento farmacologico. La bilancia impiegata fornisce la media di un numero di pesate eseguite in dieci secondi con un'accuratezza pari al decimo di grammo.

3.2 NEUROTOSSICITÀ

✓ Valutazione della velocità di conduzione nervosa a livello del nervo caudale

La velocità di conduzione nervosa (VDC) viene misurata lungo il nervo caudale degli animali attraverso l'impiego di una strumentazione elettromiografica (*software* MytoII; EBN Neuro, Firenze).

La valutazione della VDC, in molti studi di neurotossicità, viene utilizzata come indicatore della gravità dell'azione tossica del trattamento farmacologico sul SNP. In letteratura, infatti, molti studi riportano un decremento della velocità di conduzione nervosa associato al trattamento con diversi chemioterapici (Authier et al., 2000; Cavaletti et al., 1997; Cavaletti et al., 2000).

Negli esperimenti da noi condotti tale valutazione viene eseguita prima dell'inizio e al termine del trattamento farmacologico a distanza di circa 24/48 ore dall'ultima somministrazione. La misurazione, non dolorosa per l'animale, non richiede l'impiego di sostanze anestetiche; questa analisi fornisce, in termini numerici, la misura della differenza di latenza dei potenziali d'azione evocati a seguito di stimolazioni dell'intensità di 20mA, della durata di 0.1 msec e della frequenza di 10 Hz e registrati da un elettrodo di registrazione localizzato distalmente a 10 cm dalla base della coda. Le due stimolazioni, eseguite da un elettrodo stimolatore, vengono applicate a 10 cm (base della coda) e a 5 cm dall'elettrodo di registrazione. La differenza tra le due latenze (calcolate da picco a picco di potenziale d'azione) rappresenta il tempo di conduzione dell'impulso e la VDC viene calcolata come il rapporto tra lo spazio dal punto di stimolazione a quello di registrazione ed il tempo impiegato dall'impulso nervoso per percorrerlo.

Tale misurazione viene eseguita in condizioni di temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidità ($55\pm 10\%$) standard e costantemente monitorate.

✓ **Analisi morfologica del nervo sciatico**

I nervi sciatici prelevati dagli animali sacrificati vengono prima fissati per immersione in una soluzione di glutaraldeide 3% in tampone fosfato 0.12 M e pH 7.4, successivamente lavati in tampone fosfato e post-fissati in tetrossido di osmio 1%, per la preservazione dei lipidi contenuti nei campioni.

In seguito i nervi vengono sottoposti al protocollo di inclusione in resina epossidica attraverso una disidratazione progressiva per immersione in etanolo a concentrazioni crescenti (50%, 70%, 90%, 100%). I campioni sono dunque inclusi in resina epossidica attraverso l'uso di un kit (Fluka, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mo) composto da una miscela delle soluzioni EPON+DDSA ed EPON+NMA cui viene aggiunto un catalizzatore della reazione di polimerizzazione. Il passaggio dall'etanolo alla resina è mediato da passaggi in un solvente della resina che è l'ossido di propilene, successivamente al quale si può procedere con l'infiltrazione in resina graduale con diversi tempi di permanenza dei campioni in soluzioni di resina e solvente a concentrazioni crescenti (i rapporti resina:epossipropano sono dapprima 1:2, quindi 1:1 e infine 2:1).

Al termine dell'incubazione dei campioni nelle miscele di resina, i nervi vengono disposti in resina pura in apposite formelle, in modo da mantenere un orientamento tale da ottenere successivamente sezioni trasverse del campione; sono posti in stufa a 54°C *overnight* per permettere la polimerizzazione della resina.

I campioni inclusi vengono, quindi, tagliati attraverso l'uso di un microtomo RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland); le sezioni semifini così ottenute, dello spessore di 1.5 µm, vengono adagate su gocce d'acqua poste su un vetrino porta-oggetto e lasciate aderire su piastra calda, per poi essere colorate con blu di toluidina e montate con un vetrino copri-oggetto con Entellan (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland).

✓ **Analisi morfometrica del nervo sciatico**

L'analisi morfometrica del nervo sciatico viene effettuata acquisendo immagini delle sezioni di nervo ad alta risoluzione attraverso il *software* QWin (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland). Con lo stesso *software* si procede poi alla misurazione semi-automatica del perimetro e delle aree degli assoni presenti nell'immagine acquisita. Per ogni campione si effettua la misurazione di circa 500 assoni mentre, per ogni gruppo di trattamento, si analizzano i nervi di due/tre animali. I dati raccolti vengono poi comparati tra loro e su di essi, attraverso il *software* Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, Ca, USA), viene svolta un'analisi statistica per validare la significatività dei risultati ottenuti.

4. VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA

Dagli animali utilizzati per valutare la tossicità periferica indotta da sagopilone e in particolare nel modello sviluppato per ricercare la corretta scheda di somministrazione sono stati prelevati dopo il sacrificio campioni di fegato e rene. Subito dopo il prelievo gli organi vengono fissati in formalina tamponata al 10% per almeno 7 giorni; dopo tale periodo di tempo gli organi prelevati sono stati ridotti e inclusi in paraffina, tagliati

in sezioni di 5 µm di diametro, colorati con Ematossilina ed Eosina (EE) ed osservati al microscopio ottico (Leica DM LB2).

5. ANALISI EMATOLOGICA ED EMATOCHIMICA

Dagli animali utilizzati per valutare la tossicità periferica indotta da sagopilone attraverso il modello di ricerca della corretta scheda di somministrazione sono stati prelevati dopo il sacrificio campioni di sangue dall'aorta addominale previa anestesia.

Tutti i parametri ematologici tra cui la conta dei globuli bianchi e rossi, la concentrazione di emoglobina e l'ematocrito vengono determinati su campioni di sangue intero analizzati con lo strumento PENTRA 60 C+ (Horiba ABX).

L'analisi ematochimica è stata, invece, effettuata mediante sistema automatico MIRA PLUS (Horiba ABX) su siero ottenuto in seguito alla centrifugazione dei campioni di sangue a 2500 g per 15 minuti a 4°C.

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

Creatinina: metodo cinetico Jaffé al picrato alcalino senza deproteinizzazione

Urea: metodo enzimatico UV Ureasi-GLDH

ALT: metodo UV ottimizzato secondo IFCC senza piridossalfosfato

AST: metodo UV ottimizzato secondo IFCC senza piridossalfosfato

6. QUANTIZZAZIONE della DENSITA' delle FIBRE INTRAEPIDERMICHE

La quantizzazione della densità di fibre intraepidermiche è un parametro utile per la valutazione della neurotossicità periferica indotta dalla sostanza presa in esame e tale valutazione è stata effettuata solo nel modello di tossicità indotta dalla somministrazione di epotilone B. Questa analisi viene effettuata su una porzione di cute opportunamente trattata, prelevata dalla zampa posteriore dell'animale al momento del sacrificio.

Alla fine del periodo di trattamento è stata effettuata una biopsia di cute che include derma ed epidermide di circa 3 mm di diametro tramite "punch". La porzione di cute così ottenuta è stata poi fissata per immersione in paraformaldeide 2%, lisina e sodio periodato per 24 ore a 4°C e successivamente congelata *overnight*. Dai campioni così ottenuti sono state tagliate al criostato sezioni di 50 µm marcate e conservate a -20°C. Di ciascuna zampa sono state scelte in maniera casuale tre sezioni trattate con Triton X100 0.5%; su ciascuna sezione è stata poi effettuata una reazione immunostochimica utilizzando un anticorpo primario PGP 9.5 policlonale (1:1000) e un successivo anticorpo secondario per PGP 9.5 1:100. Il complesso avidina-biotina coniugato con perossidasi è stato utilizzato come sistema di rilevazione. Le sezioni così ottenute vengono osservate al microscopio ad ingrandimento 40X contando tutte le fibre che risultano positive per l'anticorpo PGP 9.5.

La lunghezza dell'epidermide è stata misurata attraverso uno specifico programma analitico (Analitica Lite) e la densità di fibre viene calcolata come il rapporto tra le fibre contate e la lunghezza dell'epidermide misurata (Lauria et al., 2005).

7. TEST COMPORTAMENTALI

Al fine di valutare una possibile capacità dell'epotilone B di indurre l'insorgenza di dolore neuropatico nel nostro modello sperimentale è stato impiegato l'*Hot Plate test* che è in grado di fornire una valutazione dell'algesia (sensibilità al dolore). Tale test è stato effettuato prima dell'inizio del trattamento con epotilone B (valore basale) e poi la misurazione è stata condotta settimanalmente sia durante il periodo di trattamento che durante il periodo di *follow-up*.

7.1 HOT PLATE TEST ANALGESY METER

Il test viene condotto basandosi su dati di letteratura in cui ne viene spiegato il funzionamento e l'utilizzo (Eddy et al., 1950) e lo strumento impiegato per tale test è il modello 7280 *Hot plate Test Analgesy Meter* della Ugo Basile Biological Instruments (Comerio, Varese, Italia). Il test è estremamente semplice e consiste nel posizionare individualmente il ratto su una superficie riscaldata, misurando l'intervallo di tempo

(latenza) che intercorre prima che l'animale risponda per esempio leccandosi la zampa o saltando. Per evitare l'insorgenza di danni a livello delle zampe dell'animale si setta un intervallo di *cut-off* (generalmente di circa 45 secondi) superato il quale, in assenza di risposta, la piastra smette automaticamente di generare calore.

La temperatura scelta per il test è di 50°C in accordo con dati già presenti in letteratura (Eddy et al., 1950). L'*Hot plate* fornisce una valutazione dell'analgesia e si basa su uno stimolo di calore costante sulla superficie plantare dell'animale generato ad un'intensità definita. Questo test valuta il tempo di latenza di spostamento della zampa in seguito al riscaldamento della piastra metallica.

In particolare nel nostro modello sperimentale di neurotossicità indotta da epotilone B, l'animale viene posizionato in un cilindro di plexiglas di 40 cm posto sopra ad un piano pre-riscaldato mantenuto a 50°C e, mediante un interruttore a pedale collegato ad un temporizzatore elettronico, viene misurata la latenza di risposta (in secondi) allo stimolo. La latenza viene definita come tempo che intercorre tra il posizionamento del ratto sulla piastra riscaldata e il momento in cui l'animale si lecca la zampa o la ritrae dalla piastra sottostante. La misurazione è stata condotta settimanalmente sia durante il periodo di trattamento che durante il periodo di *follow-up* e, per ogni animale, sono state effettuate due rilevazioni ad un intervallo di tempo di circa 30 minuti l'una dall'altra.

8. VALUTAZIONE della FORMA POLIMERIZZATA della β -TUBULINA

8.1 ESTRATTO PROTEICO DA TESSUTO

Gli estratti totali di proteine sono stati ottenuti da nervi sciatici prelevati al termine delle somministrazioni durante i sacrifici. Dopo il prelievo i nervi sciatici sono stati solubilizzati in una soluzione lisante contenente Glicerolo 10%, Tris-HCl 25 mM a pH 7.5, Triton X100 1%, EDTA 5 mM a pH 8, EGTA 1 mM a pH 8 a cui si aggiungono degli inibitori delle fosfatasi (Phenyl-Metyl-Sulfonyl-Fluoride 4 mM, Aprotinina 1%, Sodio Pirofosfato 20 mM, Sodio Ortovanadato 10 mM). Il lisato così ottenuto viene poi centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C. Al termine della centrifugazione si recupera il surnatante, che contiene tubulina in forma libera, e si aggiunge al pellet, che contiene

tubulina in forma polimerizzata, una uguale soluzione lisante addizionata con Sodio Deossicolato 0.5 % in grado di stabilizzare i legami deboli formati dalla tubulina (Attalla et al., 1998). Gli estratti proteici così ottenuti sono poi conservati a -80°C . La quantità di proteine contenuta in ciascun campione viene determinata mediante il metodo di Bradford. Un'aliquota del campione viene risospesa in acqua bidistillata fino ad un volume di 1 ml e si aggiunge 1 ml di Coomassie Reagent, per un volume totale di 2 ml. Il campione viene incubato con il Coomassie Reagent per 5 minuti e si valuta l'assorbanza della soluzione utilizzando uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Infatti quando il Coomassie si lega alle proteine in un ambiente acido determina una variazione dell'assorbimento delle proteine portandolo da 465 nm a 595 nm. Poiché la curva di risposta colorimetrica del Coomassie Reagent non è lineare rispetto all'incremento della concentrazione proteica, occorre costruire una curva standard utilizzando quantità note di una proteina di riferimento. La concentrazione proteica nell'aliquota di interesse viene quindi determinata attraverso il confronto tra l'assorbanza del campione in esame e quella di campioni contenenti quantità note di *Bovin Serum Albumin* (BSA).

8.2 SEPARAZIONE ELETTROFORETICA DELLE PROTEINE

Le proteine vengono separate in base al loro peso molecolare, in condizioni di corsa denaturanti, grazie all'impiego di un gel di poliaccrilammide al 13% (SDS-PoliAcrilammide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE). La soluzione di acrilammide utilizzata per la preparazione del gel è ottenuta sciogliendo acrilammide e bis-acrilammide in un rapporto acrilammide:bis-acrilammide pari a 30:0.8. Il gel utilizzato per la separazione delle proteine si compone di due parti: una porzione inferiore denominata *running gel*, ed una porzione superiore denominata *stacking gel*. Il *running gel* può contenere una percentuale di acrilammide/bis-acrilammide sopra descritta del 7,5%, 10% o 13% in base al peso molecolare della proteina da individuare e SDS 0.1%, Ammonio Persolfato 1%, TEMED 0.4%, Tris-HCl 1.5 M e pH 8.8 ed acqua bidistillata. Lo *stacking gel* invece è formato per il 5% dalla soluzione madre acrilammide/bis-acrilammide e da SDS 0.1%, Ammonio Persolfato 1%, TEMED 0.1%, Tris-HCl 1 M e pH 6.8 ed acqua bidistillata.

Le aliquote degli estratti proteici totali, pari a (50 µg), vengono risospese in *Laemmli buffer* 5X (β-Mercaptoetanolo 5%, Tris-HCl pH 6.8 400 mM, SDS 10%, Glicerolo 50%, Blu di bromofenolo 0.5%), in modo da ottenere un rapporto campione:*Laemmli buffer* pari a 4:1. I campioni così preparati vengono denaturati a 96°C per 5 minuti e caricati nello *stacking gel*. Le proteine, cariche negativamente, migrano nel gel dal polo negativo al polo positivo dell'apparato elettroforetico grazie alla presenza di un *buffer* di corsa (Trizma base 30 g/L, Glicina 144 g/L, SDS 10 g/L). Per seguire la migrazione dei campioni nel gel si utilizza un marker costituito da un insieme di proteine di peso molecolare noto. Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono trasferite su di un filtro di nitrocellulosa. Per effettuare questo trasferimento si allestisce una sorta di "*sandwich*" costituito da due supporti di plastica tra i quali vengono collocati, nell'ordine, una spugnetta, un foglio di carta 3M, il filtro di nitrocellulosa, il gel contenente le proteine, un altro foglio di carta 3M ed una seconda spugnetta. Il "*sandwich*" viene infine posto nella camera di trasferimento contenete circa 6 litri di *buffer* di trasferimento (Trizma base 3.025 g/L, Glicina 14.4 g/L, Metanolo 200 ml/L). Le proteine presenti nel gel vengono trasferite sul filtro di nitrocellulosa grazie alla presenza di un campo elettrico ad amperaggio costante (500 mA) per un tempo di 4 ore. Le proteine migrano dal polo negativo verso quello positivo; la conduzione della corrente è assicurata dal *buffer* posto nella camera di trasferimento.

8.3 WESTERN BLOT

Gli esperimenti di immunoblotting vengono eseguiti seguendo le indicazioni della casa produttrice; i filtri di nitrocellulosa vengono incubati per un'ora in Blocking buffer, una soluzione costituita da PBS, Tween 20 0.1% e BSA 3%, per bloccare i siti aspecifici. Successivamente viene effettuata un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente in presenza dell'anticorpo primario specifico diluito 1:1000 nella soluzione di *blocking* con BSA allo 0.1%. Dopo ripetuti lavaggi in *washing buffer* (PBS, Tween 20 0.1%), viene aggiunto l'anticorpo secondario specifico in grado di riconoscere la specie in cui è stato prodotto l'anticorpo primario. Quest'ultimo viene diluito 1:2000 in *blocking buffer* con BSA al 3%. Infine si effettuano quattro lavaggi con *washing buffer* e si procede ad identificare la reazione antigene-anticorpo con la reazione di chemiluminescenza. Il

filtro viene dunque asciugato e poi incubato per un minuto in una soluzione che contiene perossido di idrogeno, luminolo ed intensificatori chimici di luminescenza. Il luminolo, substrato chemiluminescente, viene ossidato dagli anioni prodotti dalla perossidasi coniugata con l'anticorpo secondario ed emette luce in grado di impressionare una lastra autoradiografica. Trascorso il minuto, il filtro viene asciugato e collocato in una cassetta che consente lo sviluppo fotografico. Il tempo di esposizione varia da pochi secondi a qualche minuto a seconda della combinazione anticorpo primario-anticorpo secondario utilizzata.

9. ANALISI DI ESPRESSIONE DELLE PROTEINE MIELINICHE

9.1 cRNA PROBES

Per eseguire l'analisi di espressione delle proteine mieliniche sono stati creati dei plasmidi specifici pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen, Milano, Italia) contenenti i seguenti inserti: 601 paia di basi (pb) per la Glicoproteina associata alla mielina (MAG), 554 pb per la proteina di Mielina e Linfociti (MAL), 414 pb Proteina mielinica periferica 22 (PMP22), 387 pb per la Glicoproteina zero (P0), 390 pb per la Proteina base della mielina (MBP) e 290 pb per l'rRNA 18s. Per condurre le analisi della proteina base della mielina è stato usato un template controllo commerciale pTRI RNA 18s contenente un inserto di 80 pb (Applera, Monza, Italia). Le *probes* antisenso sono state generate attraverso la trascrizione *in vitro* di specifici plasmidi in presenza di CTP marcato con ³²P (Amersham, Milano, Italia). Tutte le *probes* sono state ottenute con una attività specifica superiore a 180 cpm/mg.

9.2 RNase PROTECTION ASSAY

L'RNA totale è stato isolato da campioni di nervi sciatici congelati attraverso il metodo di estrazione con fenolo-cloroformio precedentemente descritto da Chomczynski e Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987). I campioni di RNA totale (3-5 µg), dopo precipitazione con etanolo, sono stati sciolti in una soluzione ibridizzante contenente formamide 80%, PIPES 40 mM a pH 6.4, sodio acetato 400 mM a pH 6.4 e EDTA 1 mM. Questa soluzione

contiene 150000 cpm per ciascuna *probe* di cRNA marcata con ^{32}P e 50000 cpm per la *probe* 18s. Dopo un'incubazione a 85°C per 10 minuti i campioni sono stati messi a contatto con RNA endogeno a 45°C per tutta la notte per permettere la reazione di ibridazione. Successivamente i campioni sono stati diluiti con un *buffer* di digestione per RNase (NaCl 300 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 7.4 e EDTA 5 mM a pH 7.4) a cui è stato aggiunto un *cocktail* di RNase (RNase A 1 mg/ml e RNase T1 20 U/ml) e incubati 30 minuti a 30°C. I campioni sono stati nuovamente incubati per 15 minuti a 37°C con 10 µg di proteinasi K e sodio dodecil-solfato; i campioni sono quindi stati estratti con fenolo-cloroformio e fatti precipitare con etanolo. Il pellet ottenuto è stato lasciato asciugare, risospeso in un *buffer* di caricamento (formamide 80%, xylene ciano 0.1%, blu di bromo fenolo 0.1% ed EDTA 2 mM), riscaldato a 95°C per 5 minuti e separato su gel di poliacrilammide al 5% in condizioni denaturanti (urea 7 M). I frammenti protetti sono stati visualizzati tramite autoradiografia e la loro lunghezza è stata determinata usando dei frammenti pBR322 digeriti con MspI marcati all'estremità con ^{32}P .

9.3 BLOT DATA ANALYSIS

I livelli di mRNA delle proteine P0, PMP22, MAG, MAL, MBP e 18s RNA sono stati calcolati misurando l'area densitometrica del picco in seguito all'autoradiografia analizzata con lo *scanner* Kodak Snap attraverso il *software* ImageJ 1.33u. Per assicurarsi che la banda autoradiografica fosse in un intervallo lineare di intensità sono stati valutati diversi tempi di esposizione. All'interno del singolo esperimento il valore medio di controllo è stato settato a 100 e tutti gli altri valori sono stati espressi come percentuale di tale valore (i valori controllo tra i diversi esperimenti non differiscono tra loro di oltre il 10%).

10. ANALISI STATISTICHE

La riduzione della lunghezza del neurite negli esperimenti *in vitro*, le variazioni di peso corporeo, VDC, soglia algica del dolore e livelli di espressione delle proteine mieliniche *in vivo* tra i gruppi sperimentali dei diversi studi sono state statisticamente comparate

con i valori dei gruppi controllo effettuando l'analisi della varianza attraverso il test ANOVA ed il post-test Tukey-Kramer. Per coppie indipendenti di valori, come nel caso dell'analisi delle fibre intraepidermiche, le differenze sono state valutate utilizzando il t-test di Student Unpaired. Le differenze statistiche riscontrate nell'analisi morfometrica dei nervi sciatici rispetto ai nervi controllo sono state verificate tramite il test Mann-Whitney. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate tramite il *software* Prism (GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) e in tutte la soglia di significatività è stata fissata a $p < 0.05$.

Risultati

1. STUDIO DELLA TOSSICITÀ PERIFERICA INDOTTA DALLA SOMMINISTRAZIONE DI EPOTILONE B

1.1 COLTURE ORGANOTIPICHE DEI GANGLI DELLE RADICI DORSALI TRATTATI CON EPOTILONE B

Prima di studiare la tossicità periferica indotta dalla somministrazione di epotilone B tramite la messa a punto di un modello animale è stato condotto uno studio *in vitro* su DRG prelevati da embrioni di ratti Sprague-Dawley per valutare la tossicità di tale farmaco a livello dei neuriti dei corpi cellulari.

I DRG estratti sono stati trattati con differenti concentrazioni di epotilone B (0.1, 0.5, 5, 50, 100, 200, 300, 500, 700 nM e 1 μ M) e con il DMSO (dimetilsolfossido) in cui viene risospeso il farmaco per vedere se questa sostanza risulta tossica per le colture cellulari.

In questo esperimento, come mostrato nell'immagine e nei grafici riportati di seguito, l'allungamento del neurite dei DRG trattati con DMSO non mostra alcuna variazione significativa rispetto a quello dei DRG controllo. Al contrario nei DRG trattati con dosi differenti di farmaco si è visto che le concentrazioni più basse (0.1, 0.5 e 5 nM) inducono una riduzione significativa ($p < 0.001$) dopo 24 ore dal trattamento. Dopo 48 ore i DRG trattati con epotilone B 0.1 e 0.5 nM mostrano un completo recupero della lunghezza del neurite mentre alla dose di 5 nM si vede ancora una riduzione statisticamente significativa ($p < 0.001$). Con le dosi maggiori o uguali a 50 nM si ha una riduzione statisticamente significativa sia dopo 24 ore ($p < 0.001$) che dopo 48 ore ($p < 0.001$); in particolare l'analisi statistica mostra che per tali concentrazioni l'epotilone B sembra avere un effetto tossico maggiore dopo 48 ore che non dopo 24 ore.

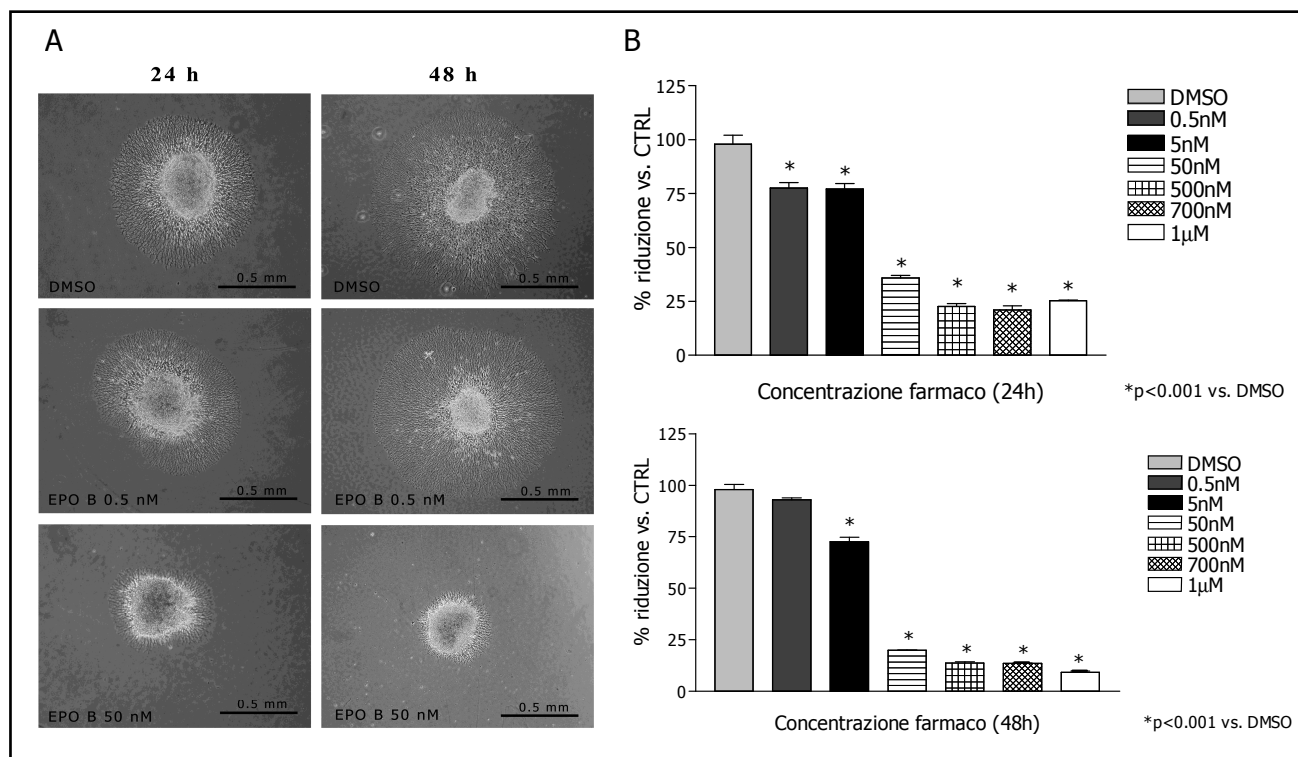


Fig. 15: l'immagine A è rappresentativa di alcune dosi di epotilone B prese in esame e mostra la riduzione della lunghezza del neurite dei DRG rispetto alle colture controllo dopo 24 e 48 ore dal trattamento. I grafici mostrano la percentuale di riduzione della lunghezza del neurite dei DRG trattati con alcune concentrazioni di epotilone B rispetto ai DRG controllo e l'analisi statistica effettuata con i dati ottenuti dalle diverse colture organotipiche (immagini e grafici modificati da Chiorazzi et al., 2009).

1.2 MODELLO ANIMALE

In un esperimento condotto precedentemente nel nostro laboratorio la tossicità dell'epotilone B è stata analizzata in un modello animale sviluppato utilizzando ratti Wistar femmine. In tale esperimento l'epotilone B è stato somministrato alle dosi di 0.25, 0.5, 1, 1.5 e 2 mg/kg mostrando un elevato tasso di mortalità negli animali trattati con le dosi maggiori. Sulla base di questi risultati e sapendo che i ratti Fischer risultano più sensibili alla somministrazione di chemioterapici rispetto ai ratti Wistar in questo esperimento si è deciso di non utilizzare la dose di 2 mg/kg che aveva mostrato un tasso di mortalità pari al 100% già nei ratti Wistar.

- TOSSICITA' GENERALE : MORTALITÀ, OSSERVAZIONI CLINICHE E VALUTAZIONE DEL PESO CORPOREO

Per poter verificare la presenza di una tossicità generale indotta dalla somministrazione di epotilone B è stata valutata la variazione del peso corporeo in ratti Fischer femmine di peso iniziale compreso tra 170-180 g all'inizio del trattamento, prima di ogni somministrazione, a fine trattamento e a fine del periodo di *follow-up* di 4 settimane. Tranne il grafico sottostante tutti i grafici seguenti riportano solo i valori riferiti ai gruppi trattati con epotilone B 0.25 e 0.5 mg/kg in quanto le dosi di 1 e 1.5 mg/kg hanno mostrato un tasso di mortalità pari al 100% rispettivamente dopo la seconda e la terza somministrazione.

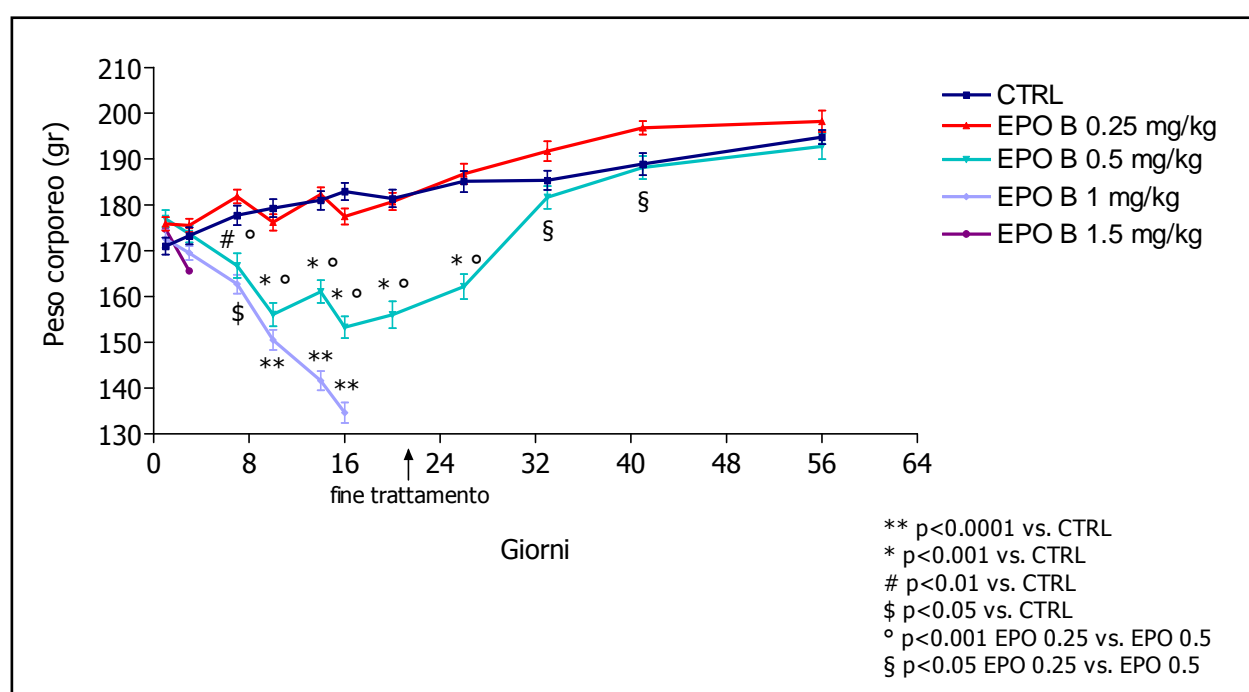


Fig. 16: variazione del peso corporeo e analisi statistica di tale variazione durante il periodo di trattamento e durante il periodo di *follow-up* (grafico modificato da Chiorazzi et al., 2009).

Durante il periodo di trattamento si è evidenziato che gli animali tollerano bene la dose minore di epotilone B mentre la dose maggiore provoca negli animali alcuni effetti collaterali che si ripercuotono in una più elevata perdita di peso corporeo.

L'analisi statistica è stata effettuata considerando a ogni misurazione la media del peso corporeo dell'intero gruppo di animali ricevanti il farmaco rispetto a quella riscontrata per il gruppo di animali controllo (CTRL). Come mostrato dal grafico, durante le quattro settimane di trattamento con epotilone B, si è osservata una diminuzione significativa dell'incremento di peso corporeo nel gruppo di animali trattati con la dose 0.5 mg/kg di farmaco rispetto al gruppo controllo e al gruppo di animali trattati con la dose minore di epotilone B. Tali variazioni si mantengono anche all'inizio del periodo di *follow-up* per poi osservare una completa ripresa del peso corporeo alla fine di tale periodo.

- NEUROTOSSICITÀ: VALUTAZIONE DELLA VELOCITÀ DI CONDUZIONE NERVOSA

Alla fine del periodo di trattamento e alla fine del periodo di *follow-up* è stato misurato il valore della velocità di conduzione dell'impulso nervoso a livello della coda degli animali, appartenenti a ciascun gruppo, ottenendo i dati riportati nel grafico sottostante:

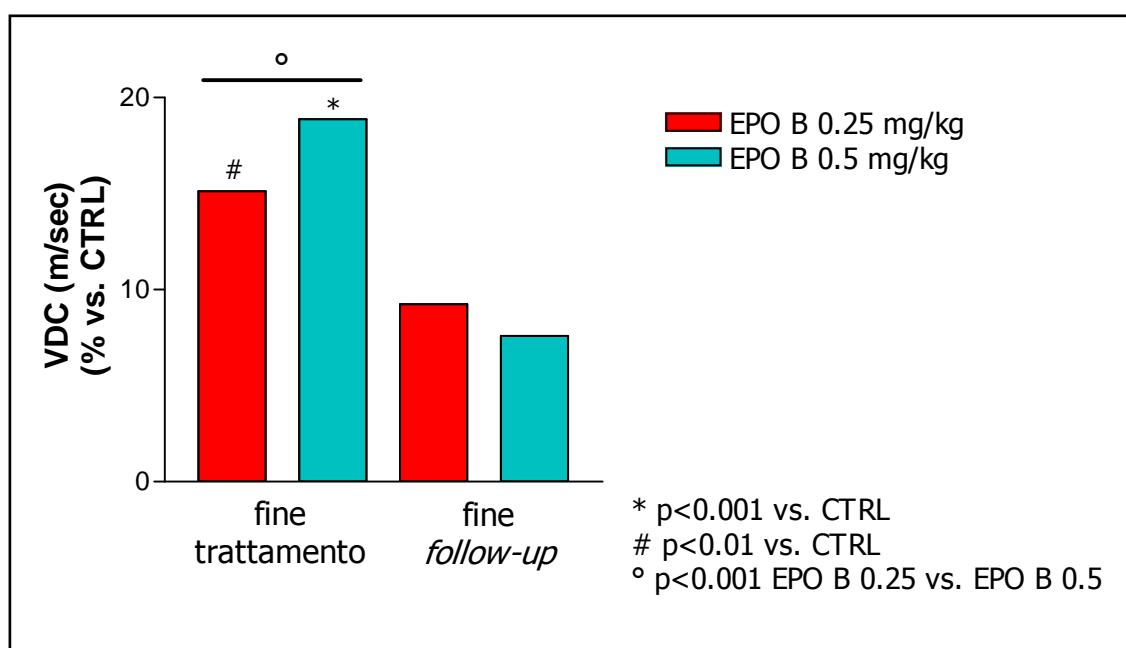


Fig. 17: misurazione della velocità di conduzione nervosa e analisi statistica di tale valore analizzati a fine del periodo di trattamento e a fine del periodo di *follow-up* (grafico modificato da Chiorazzi et al., 2009).

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha evidenziato, a fine trattamento, una riduzione significativa della VDC degli animali trattati sia con la dose maggiore che con la dose minore di EPO B rispetto agli animali controllo; a fine trattamento è anche presente una

differenza significativa dei valori registrati tra i gruppi di animali trattati con le diverse dosi di epotilone B. Alla fine del periodo di *follow-up*, invece, non si registra più alcuna variazione del valore di VDC né rispetto al gruppo controllo né tra i due gruppi di trattamento evidenziando quindi un completo recupero di tale parametro in entrambi i gruppi.

- NEUROTOSSICITÀ: ANALISI MORFOLOGICA E MORFOMETRICA DEL NERVO SCIATICO

Le sezioni trasverse dei nervi sciatici degli animali trattati con epotilone B osservate al microscopio ottico mostrano la presenza di fibre con morfologia alterata rispetto ai campioni di controllo; in particolare, in questi campioni, è stata osservata una assonopatia dose dipendente e il danno è evidente soprattutto a carico delle grosse fibre mieliniche. Al contrario non è stata riscontrata una demielinizzazione primaria in nessun campione analizzato. Alla fine del periodo di *follow-up* tali cambiamenti non sono più evidenziati nei campioni esaminati.

L'analisi ultrastrutturale effettuata a livello dei nervi sciatici non ha evidenziato alcun cambiamento nell'architettura strutturale dei microtubuli in seguito al trattamento con le differenti dosi di epotilone B analizzate (dato non riportato nel grafico sottostante).

L'osservazione al microscopio ottico di sezioni di nervo sciatico ha rilevato la presenza di fibre in degenerazione e l'entità di tali alterazioni sembra essere legata alla dose di farmaco somministrata. Il fenomeno, infatti, sembra verificarsi con minore entità nei campioni di animali trattati con epotilone B 0.25 mg/kg rispetto a quelli ricevuti epotilone B 0.5 mg/kg.

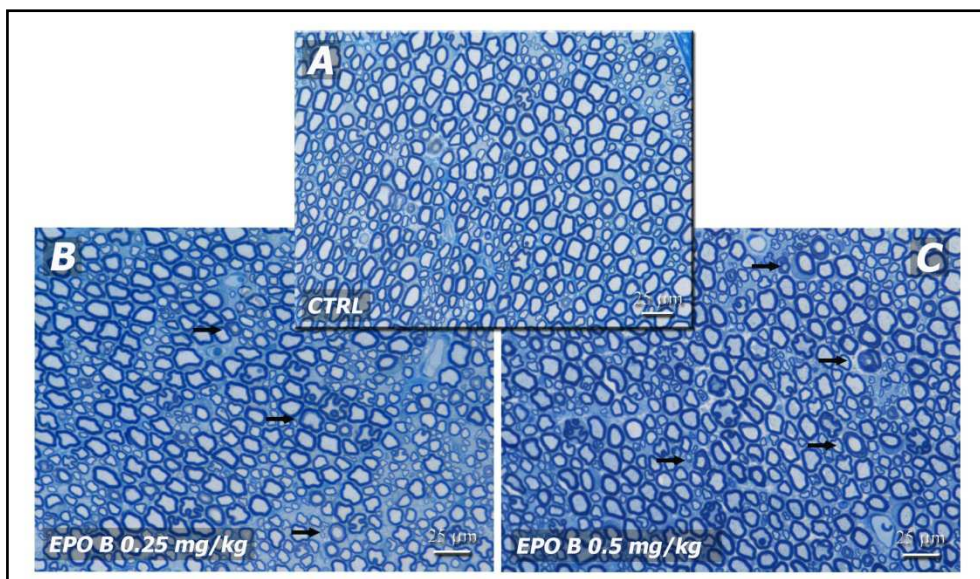


Fig. 18: l'immagine A è rappresentativa della morfologia del nervo sciatico degli animali controllo mentre le immagini B e C sono rappresentative degli animali trattati rispettivamente con la dose minore (0.25 mg/kg) e con la dose maggiore (0.5 mg/kg) di epotilone B (barra 25 μm) (immagini modificate da Chiorazzi et al., 2009).

Attraverso l'analisi morfometrica dei campioni le differenze riscontrate tra la distribuzione dei valori di controllo e dei trattati si sono dimostrate statisticamente significative; in particolare tale analisi ha evidenziato un aumento del diametro assonale ($p < 0.001$) e del diametro della fibra ($p < 0.001$) che si riflette in un aumento significativo del valore di *g-ratio* ($p < 0.001$). Anche in questo caso, come mostrano i grafici e la tabella seguenti, il fenomeno risulta essere dose correlato in quanto si ha un aumento maggiore del valore di *g-ratio* nel gruppo di animali trattati con epotilone B 0.5 mg/kg rispetto al gruppo trattato con epotilone B 0.25 mg/kg.

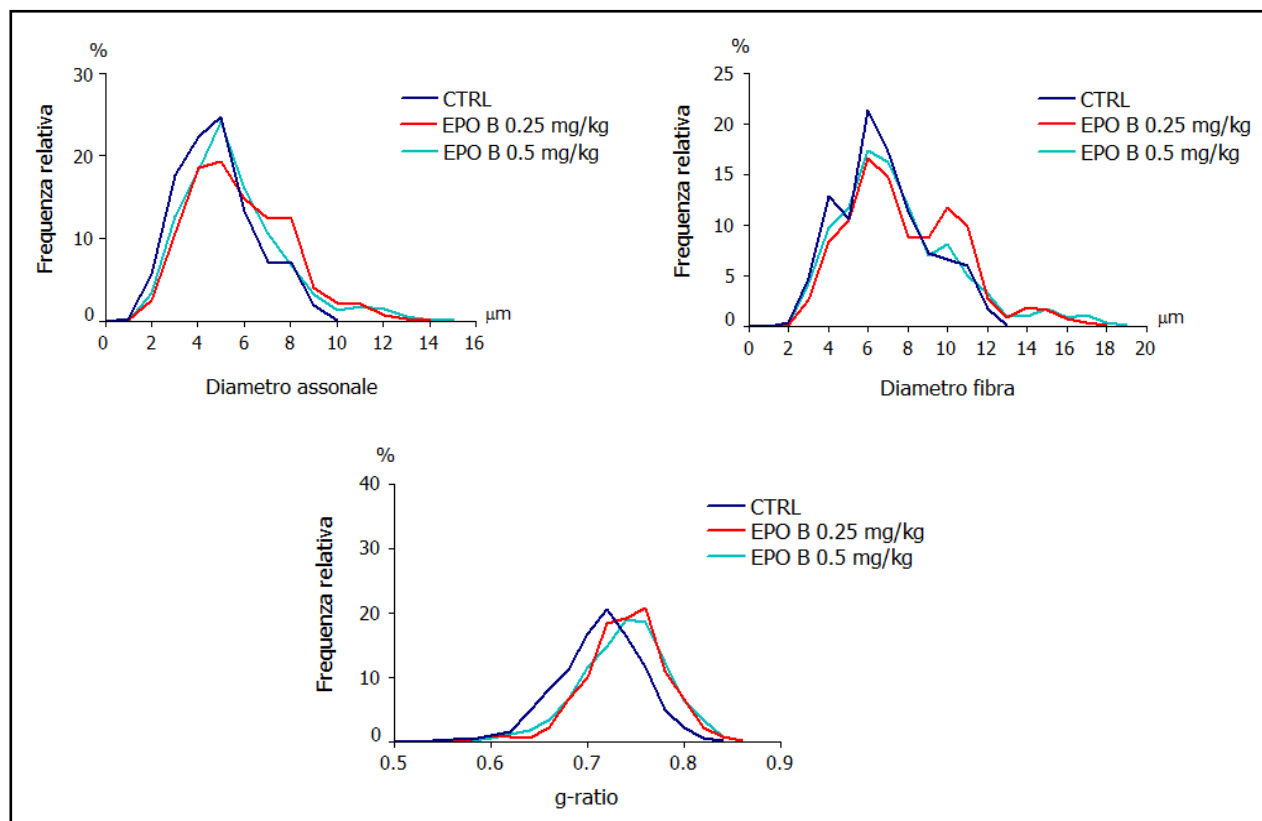


Fig. 19: risultato dell'analisi morfometrica condotta sui nervi sciatici che evidenzia un aumento del diametro assonale e del diametro della fibra e un conseguente aumento del valore di *g-ratio* (grafico modificato da Chiorazzi et al., 2009).

Gruppi	Diametro fibra (μm)	Diametro assonale (μm)	Spessore mielinico	<i>g-ratio</i>
CTRL	6.76±2.22	4.82±1.64	1.94±0.68	0.712±0.04
EPO B 0.25 mg/kg	7.82±2.83	5.77±2.11	2.06±0.83	0.737±0.04
EPO B 0.5 mg/kg	7.48±2.94	5.49±2.12	1.99±0.92	0.737±0.05

Tab. 1: valori dei diametri della fibra, degli assoni, dello spessore mielinico e della *g-ratio* calcolato in 500 fibre/nervo su tre nervi per ogni gruppo di trattamento espressi come media±SD.

- *QUANTIZZAZIONE DELLA DENSITÀ DELLE FIBRE INTRAEPIDERMICHE*

La densità delle fibre intraepidermiche è stata valutata solo nel gruppo di animali trattati con epotilone B 0.5 mg/kg sia a fine trattamento che a fine *follow-up* come mostrato nel grafico sottostante.

Alla fine del periodo di trattamento i ratti controllo presentano una densità di 19.87/mm±4.74 mentre negli animali trattati tale valore è di 15.14/mm±4.85. L'analisi statistica ha mostrato una diminuzione significativa di questo valore con una significatività pari a $p < 0.05$.

Alla fine del periodo di *follow-up*, invece, la media della densità delle fibre intraepidermiche nel gruppo controllo è di 22.12/mm±3.1 e 22.32/mm±3.38 nel gruppo trattato con epotilone B 0.5 mg/kg indicando un completo recupero della dimensione del diametro delle piccole fibre (i valori sono indicati come media±deviazione standard).

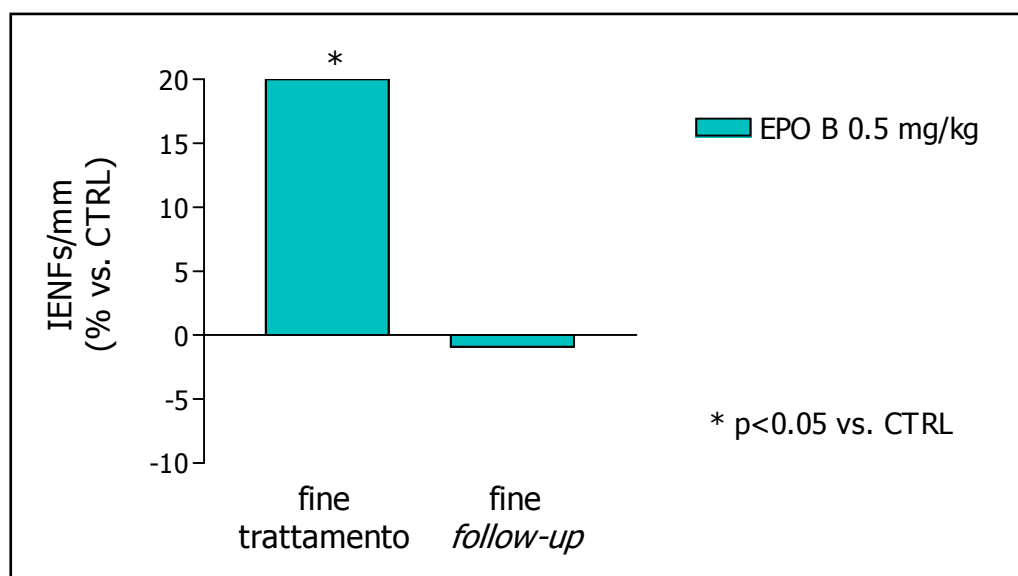


Fig. 20: misurazione della densità di fibre intraepidermiche e analisi statistica di tale valore analizzati a fine del periodo di trattamento e a fine del periodo di *follow-up* (grafico modificato da Chiorazzi et al., 2009).

- HOT PLATE TEST

L'*Hot plate test* è stato condotto per valutare l'insorgenza di un'eventuale alterazione della soglia algica; questo test è stato effettuato una volta a settimana sia durante il periodo di trattamento che durante il periodo di *follow-up*.

Come mostrato dal grafico sottostante questo test ha evidenziato l'insorgenza di una ipoalgesia dose correlata in quanto tale alterazione è evidente soltanto nel gruppo di animali trattati con epotilone B 0.5 mg/kg. In tale gruppo l'ipoalgesia insorge già 4 giorni dopo la prima somministrazione di epotilone B e perdura per tutto il periodo del

trattamento in modo significativo rispetto al gruppo controllo ($p < 0.001$) e al gruppo trattato con la dose inferiore di epotilone B ($p < 0.001$). Dopo una settimana dall'inizio del periodo di *follow-up* la latenza del gruppo trattato con EPO B 0.5 mg/kg rimane ancora significativamente maggiore rispetto al gruppo controllo ($p < 0.001$) e al gruppo trattato con EPO B 0.25 mg/kg ($p < 0.005$) ma alla fine di tale periodo si registra un completo recupero e il valore della latenza degli animali trattati torna a valori paragonabili a quelli degli animali controllo.

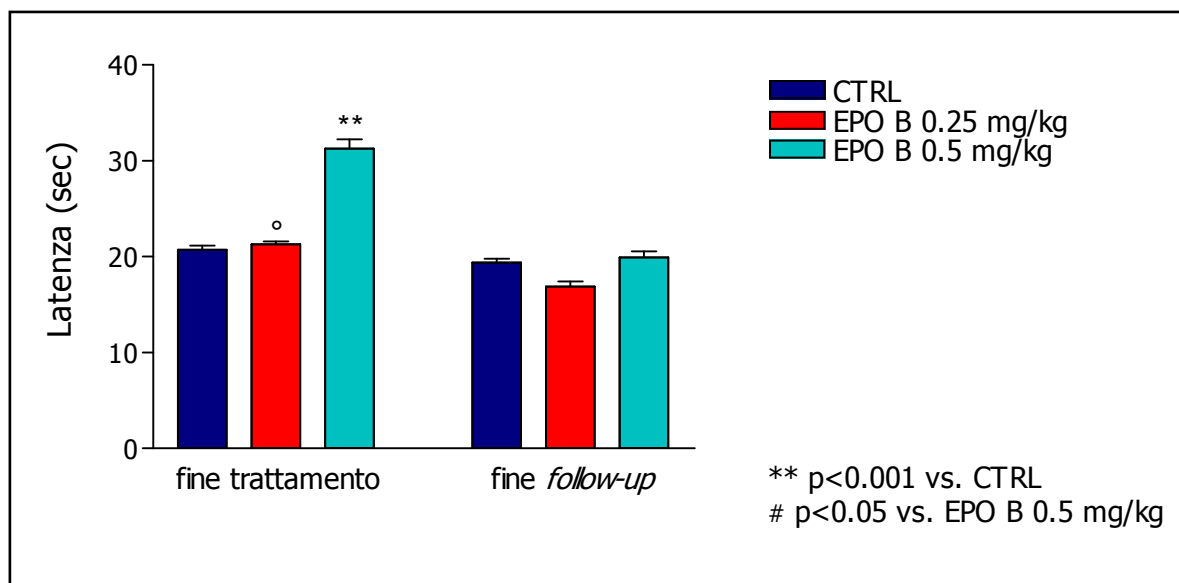


Fig. 21: effetto del trattamento con epotilone B sulla soglia algica degli animali rispetto agli animali controllo a fine del periodo di somministrazione e a fine *follow-up* (i valori sono espressi come media \pm SEM) (grafico modificato da Chiorazzi et al., 2009).

- QUANTIZZAZIONE DELL'INCREMENTO DI POLIMERIZZAZIONE DELLA β -TUBULINA

Come mostrato nell'immagine e nel grafico sottostanti gli estratti proteici e le analisi di immunoblotting effettuate sui nervi sciatici hanno mostrato un incremento della quantità di β -tubulina polimerizzata nel pellet (frazione che contiene tubulina polimerizzata) rispetto al surnatante (frazione che contiene tubulina libera) in tutti i gruppi trattati con epotilone B rispetto al gruppo controllo. Questo risultato dimostra quindi che l'epotilone B è in grado, *in vivo*, di aumentare la polimerizzazione della tubulina a dosi che inducono l'insorgenza della neuropatia periferica. Questo incremento risulta rispettivamente del 31.1% e del 47.4% nei gruppi trattati con epotilone B 0.25 mg/kg e epotilone B 0.5 mg/kg.

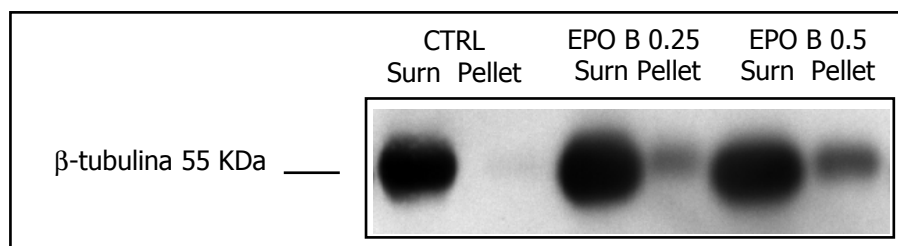


Fig. 22: immunoblotting rappresentativo di uno degli esperimenti condotti alla fine del periodo di trattamento sui nervi sciatici degli animali trattati con eptilone B e che mostra l'aumento della polimerizzazione della β -tubulina in seguito al trattamento (immagine modificata da Chiorazzi et al., 2009).

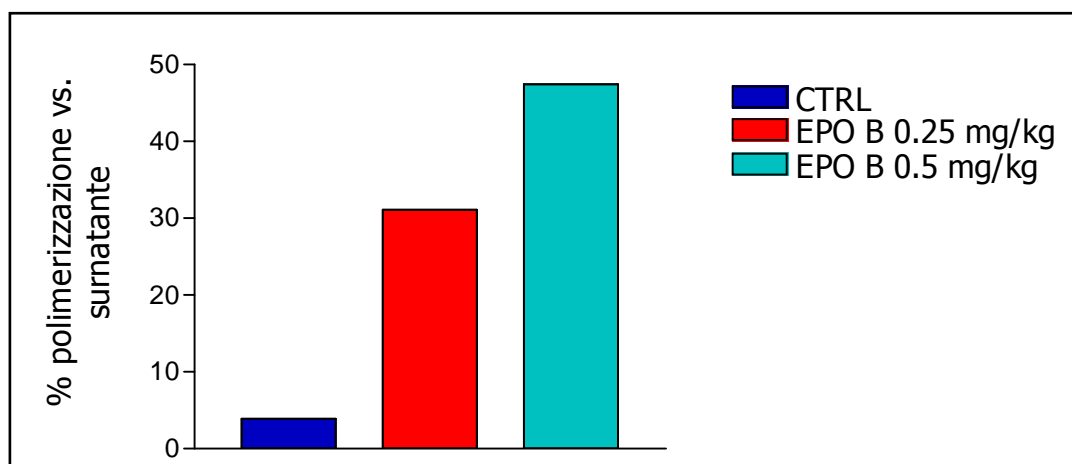


Fig. 23: rappresentazione della percentuale di β -tubulina polimerizzata all'interno del pellet rispetto alla β -tubulina polimerizzata all'interno del surnatante.

- ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE MIELINICHE

L'analisi dell'espressione delle proteine mieliniche è stata condotta a fine trattamento e alla fine del periodo di *follow-up* in entrambi i gruppi trattati con le due diverse dosi di eptilone B come mostrato nelle immagini e nei grafici sottostanti. Alla fine del periodo di trattamento è stato evidenziato un decremento significativo ($p < 0.05$) dei livelli di mRNA delle proteine MBP, P0, PMP22 e MAL rispetto ai valori di tali proteine espressi negli animali controllo. Alla fine del periodo di *follow-up*, invece, si osserva un completo

recupero dei valori di tutte queste proteine. Si può invece notare che né a fine trattamento né a fine *follow-up* si osserva una variazione nei livelli di espressione della proteina MAG (dato non riportato nei grafici sottostanti).

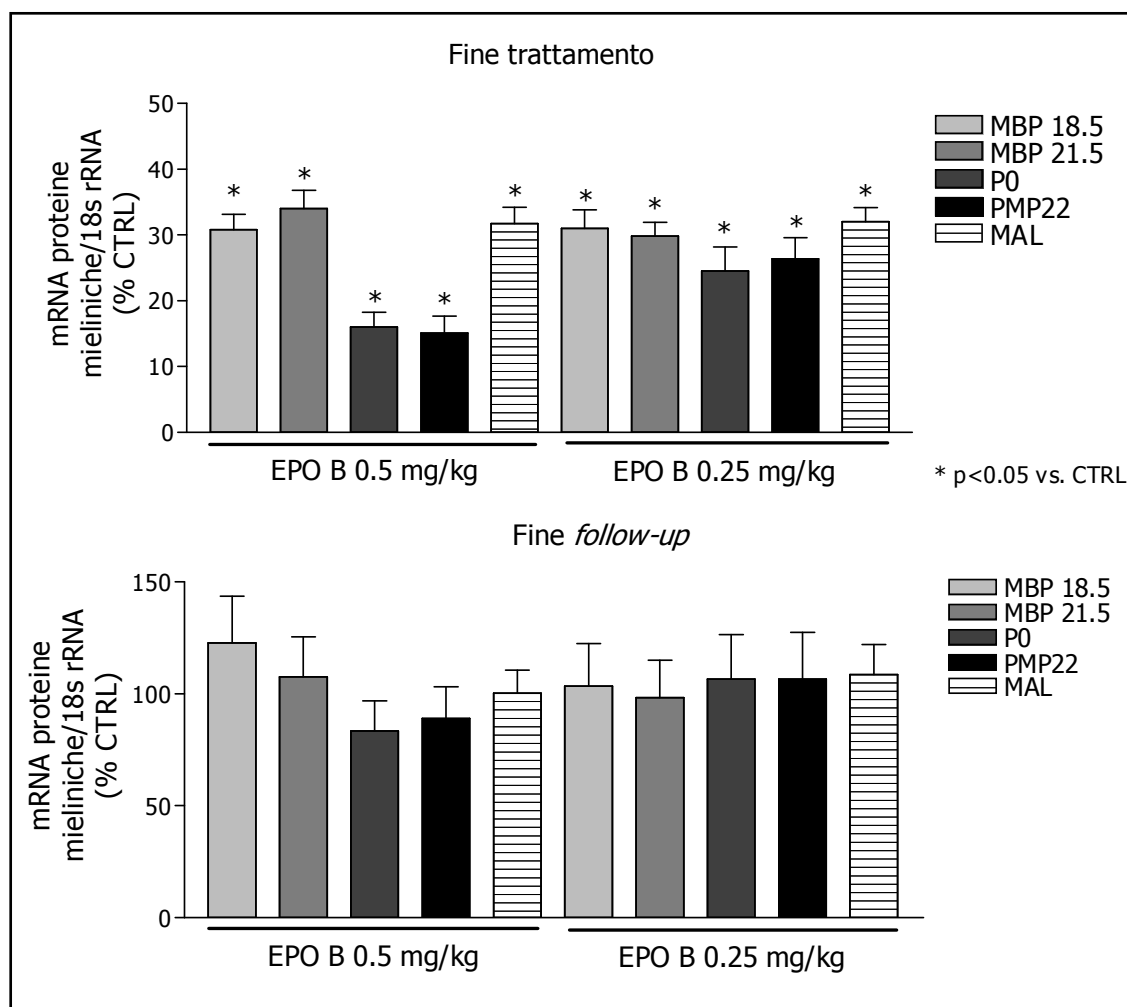


Fig. 24: i grafici riportano le medie dei valori di espressione delle proteine ottenuti nelle tre singole prove e sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$ in seguito a normalizzazione con l'rRNA 18s (grafico modificato da Chiorazzi et al., 2009).

2. STUDIO DELLA TOSSICITÀ PERIFERICA INDOTTA DALLA SOMMINISTRAZIONE DI SAGOPILONE

2.1 COLTURE ORGANOTIPICHE DEI GANGLI DELLE RADICI DORSALI TRATTATI CON SAGOPILONE

Come fatto per lo studio dell'epotilone B anche per il sagopilone prima di studiarne la tossicità periferica all'interno di un modello animale è stato condotto uno studio *in vitro* su DRG prelevati da embrioni di ratti Sprague-Dawley per valutare la tossicità di tale farmaco a livello dei neuriti dei corpi cellulari.

I DRG estratti sono stati trattati con differenti concentrazioni di sagopilone (10, 50 e 100 nM) e con il veicolo in cui viene risospeso il farmaco per vedere se questa stessa sostanza risulta tossica per le colture cellulari.

In questo esperimento, come mostrato nell'immagine e nei grafici riportati di seguito, l'allungamento del neurite dei DRG trattati con il veicolo non mostra alcuna variazione significativa rispetto a quello dei DRG controllo nei due punti di osservazione. Anche nei DRG trattati con la dose minore di farmaco (10 nM) non si osserva nessuna riduzione statisticamente significativa rispetto al controllo né dopo 24 ore di trattamento né dopo 48 ore. Al contrario si osserva che i DRG trattati con le concentrazioni più alte di farmaco (50 e 100 nM) mostrano una riduzione significativa della lunghezza del neurite rispetto ai DRG controllo (rispettivamente $p < 0.05$ e $p < 0.01$) dopo 24 ore dal trattamento. Dopo 48 ore i DRG trattati con sagopilone 50 nM mostrano ancora una riduzione statisticamente significativa pari a quella osservata dopo 24 ore di trattamento mentre i DRG trattati con la dose massima (100 nM) mostrano un aumento di significatività ($p < 0.001$). Come già visto per l'epotilone B anche il sagopilone sembra indurre, a dosi elevate, una riduzione maggiore della lunghezza del neurite dopo 48 ore che non dopo 24 ore.

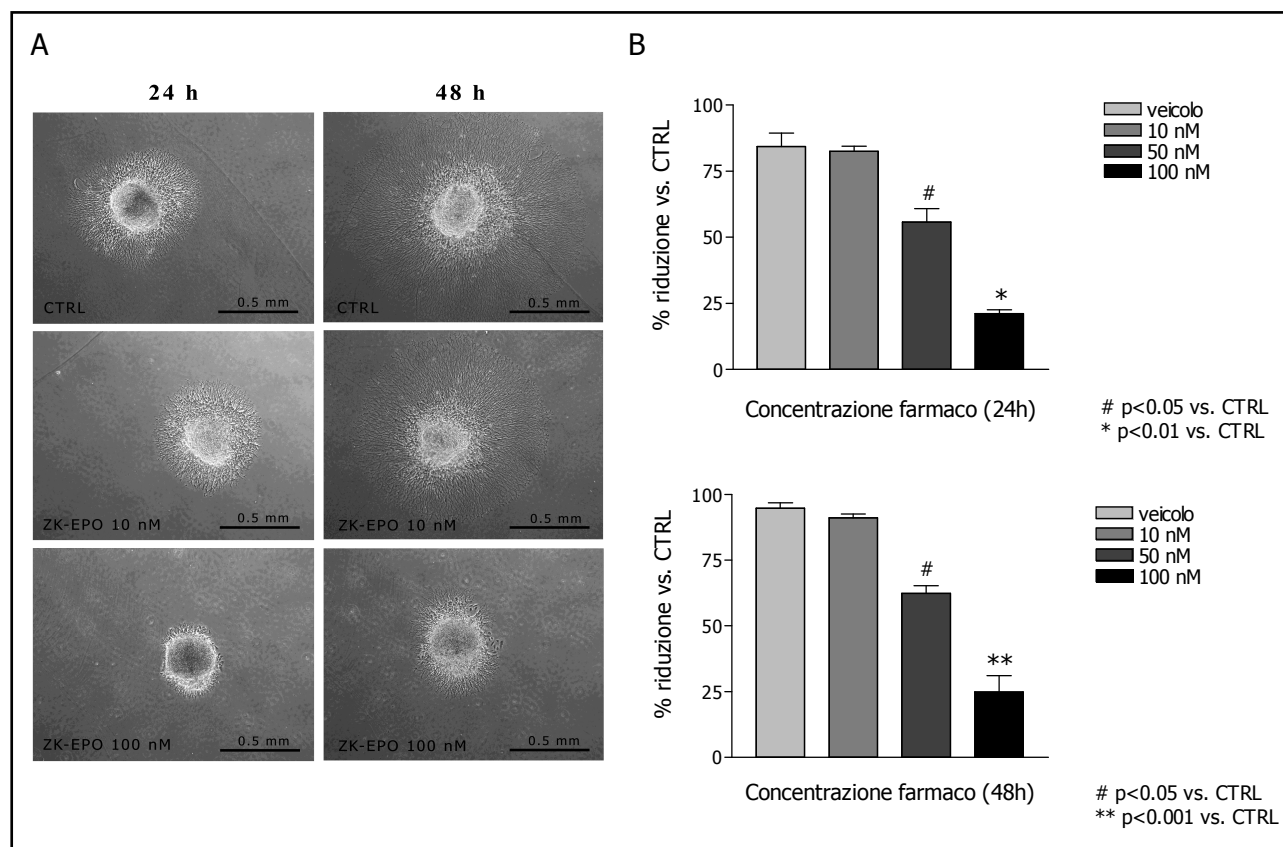


Fig. 25: L'immagine A è rappresentativa di alcune dosi di sagopilone prese in esame e mostra la riduzione della lunghezza del neurite dei DRG rispetto alle colture controllo dopo 24 e 48 ore dal trattamento. I grafici mostrano la percentuale di riduzione della lunghezza del neurite dei DRG trattati con sagopilone rispetto ai CTRL e l'analisi statistica effettuata con i dati ottenuti dalle diverse colture organotipiche.

2.2 MODELLO ANIMALE PER LA RICERCA DELLA MASSIMA DOSE TOLLERATA (MTD)

Prima di valutare quale sia il danno dato dalla somministrazione di sagopilone a livello dell'intero organismo è stato messo a punto un primo esperimento in grado di definire la dose di farmaco in grado di indurre l'insorgenza di neuropatia periferica nell'animale e la MTD. Per cercare quale sia la massima dose di farmaco tollerata dall'animale (ossia la dose che presenta una mortalità pari al 50%) sono state usate 4 differenti dosi di sagopilone (0.6, 1.2, 1.8 e 2.4 mg/kg). In questo primo esperimento è stato anche somministrato il veicolo in cui viene risospeso il sagopilone per vedere se esso può risultare tossico per l'animale.

- TOSSICITÀ GENERALE: MORTALITÀ, OSSERVAZIONI CLINICHE E VALUTAZIONE DEL PESO CORPOREO

Per verificare la presenza di una tossicità generale indotta dalla somministrazione di sagopilone è stata valutata la variazione del peso corporeo in ratti Wistar femmine di peso iniziale compreso tra 200-210 g all'inizio del trattamento, prima di ogni somministrazione e a fine trattamento.

In particolare, durante il periodo di trattamento, si è evidenziato che gli animali tollerano bene la dose minore di sagopilone che non induce un decremento significativo del peso corporeo mentre le dosi maggiori provocano negli animali maggiori effetti collaterali che si ripercuotono in una significativa perdita di peso corporeo. Il calo di peso corporeo, però, non avviene in maniera dose-dipendente. Nonostante l'insorgenza di effetti collaterali non si registra mortalità in nessun gruppo di animali trattati con sagopilone.

L'analisi statistica riportata nel grafico sottostante è stata effettuata considerando a ogni misurazione la media del peso corporeo dell'intero gruppo di animali riceventi il farmaco rispetto a quella riscontrata nel gruppo di animali controllo. Come mostrato dal grafico, già dopo la prima somministrazione di sagopilone si è osservata una diminuzione significativa dell'incremento di peso corporeo nei gruppi di animali trattati con ZK-EPO alle dosi di 1.2, 1.8 e 2.4 mg/kg rispetto al gruppo controllo. Dalle somministrazioni successive si mantiene tale differenza significativa mentre si aggiunge una differenza significativa di tali gruppi anche rispetto al gruppo trattato con il solo veicolo.

Durante tutto il periodo di trattamento gli animali appartenenti ai gruppi trattati con sagopilone 0.6 mg/kg e con il veicolo non presentano alcuna variazione di peso significativa rispetto al gruppo controllo.

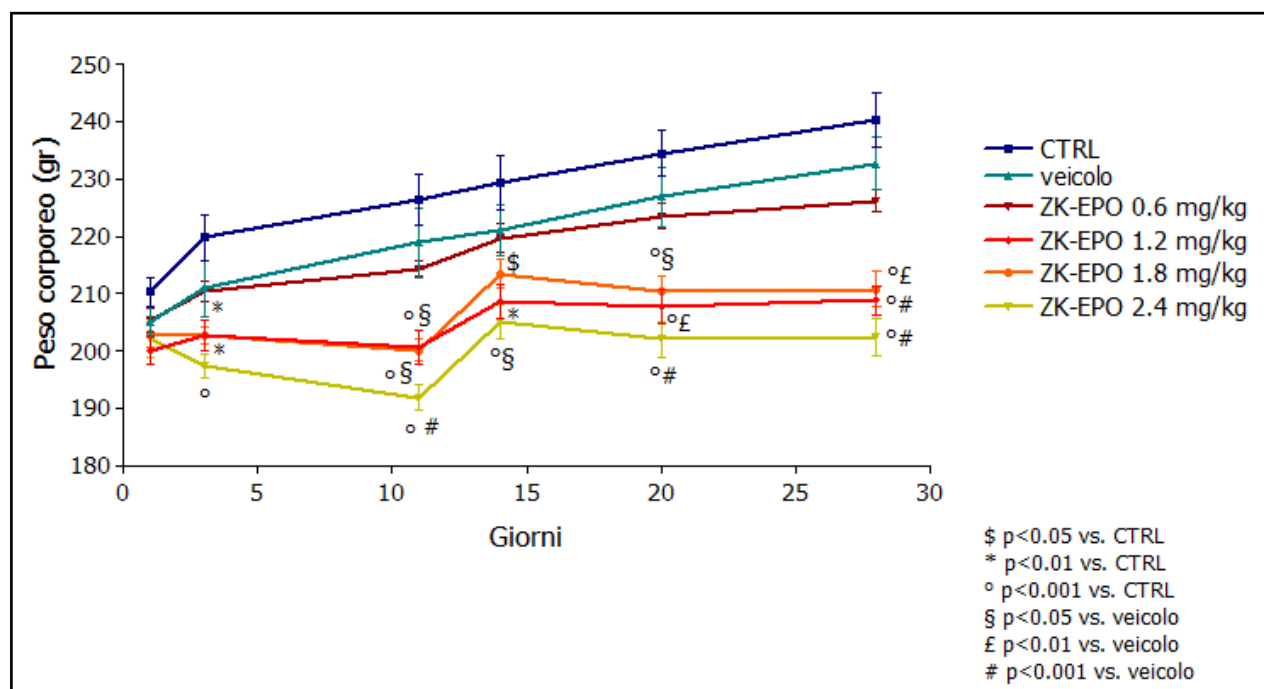


Fig. 26: variazione del peso corporeo e analisi statistica di tale variazione durante il periodo di trattamento di 4 settimane.

- NEUROTOSSICITÀ: VALUTAZIONE DELLA VELOCITÀ DI CONDUZIONE NERVOSA

Prima dell'inizio del periodo di trattamento (dato non riportato in quanto non presentava alcuna variazione tra i diversi gruppi), dopo due settimane dall'inizio del trattamento e alla fine delle quattro settimane di somministrazione del farmaco è stato misurato il valore della velocità di conduzione dell'impulso nervoso a livello della coda degli animali, appartenenti a ciascun gruppo.

Come mostrato nel grafico l'analisi statistica dei dati ottenuti ha evidenziato, dopo due settimane di trattamento, una riduzione significativa della VDC degli animali trattati con la dose maggiore di ZK-EPO rispetto agli animali controllo, agli animali trattati con il veicolo e agli animali trattati con la dose minore di sagopilone. Alla fine del periodo di trattamento tale differenza significativa si mantiene ma si osserva anche nel caso dei gruppi trattati con sagopilone 1.2 e 1.8 mg/kg.

Tali variazioni risultano essere dose-dipendenti sia per tempistiche di insorgenza che per significatività.

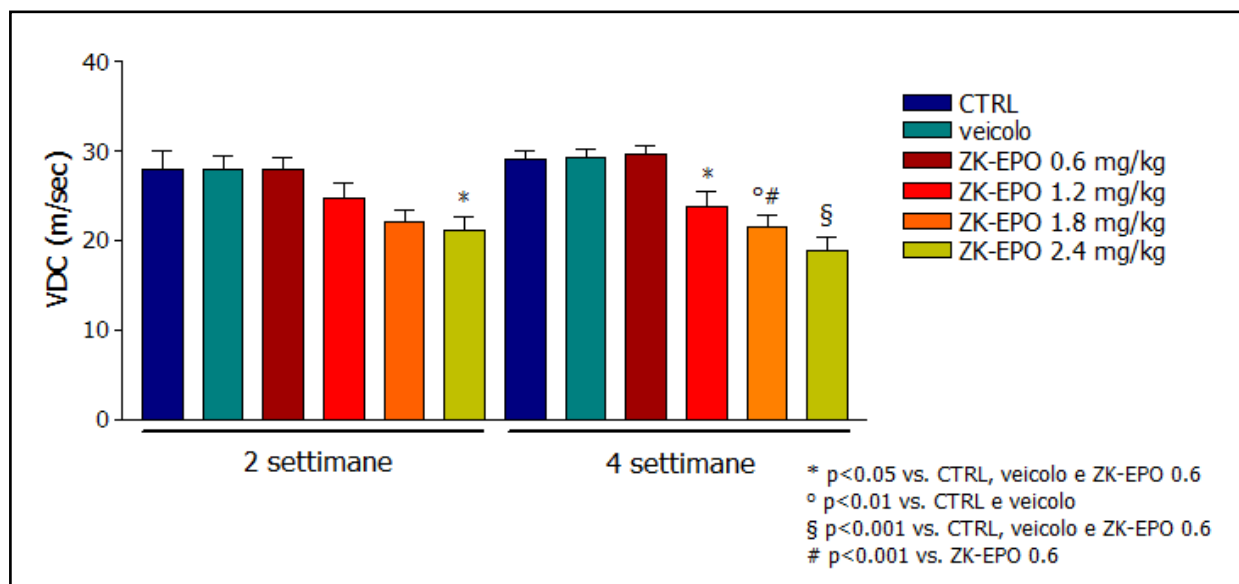


Fig. 27: misurazione della velocità di conduzione nervosa e analisi statistica di tale valore analizzati dopo due settimane dall'inizio del trattamento e a fine del periodo di trattamento.

Questo primo esperimento mostra quindi che il *range* di 1.2-2.4 mg/kg è effettivamente in grado di indurre l'insorgenza di tossicità generale e cambiamenti a livello neurofisiologico ma non ha permesso di evidenziare quale sia la massima dose tollerata di sagopilone da questi animali dal momento che in tutti i gruppi il tasso di mortalità registrato è stato pari allo 0%. Per questo motivo si è deciso, negli esperimenti seguenti, di usare solo le dosi di 1.2 e 2.4 mg/kg e al massimo, successivamente, di provare ad aumentare la dose somministrata a 3 mg/kg.

2.3 MODELLO ANIMALE PER LA RICERCA DELLA CORRETTA SCHEDE DI SOMMINISTRAZIONE

Dopo aver stabilito le dosi di sagopilone da utilizzare in ratti Wistar in grado di indurre l'insorgenza di neuropatia periferica si è deciso di sviluppare un modello per capire quale sia la corretta modalità di somministrazione del farmaco. A tale scopo si è deciso di utilizzare tre diverse tempistiche di somministrazione; in questo esperimento il farmaco è stato somministrato sempre per via endovenosa ma in bolo, con un'infusione

di 30 minuti e con un'infusione lenta di 3 ore. Per permettere la somministrazione tramite un'infusione di 30 minuti e di tre ore prima dell'inizio degli esperimenti gli animali sono stati incanulati con un catetere in polietilene a livello della giugulare.

- TOSSICITÀ GENERALE: MORTALITÀ, OSSERVAZIONI CLINICHE E VALUTAZIONE DEL PESO CORPOREO

Per verificare la presenza di una tossicità generale indotta dalla somministrazione di sagopilone è stata valutata la variazione del peso corporeo in ratti Wistar femmine di peso iniziale compreso tra 180-210 g all'inizio del trattamento, prima di ogni somministrazione e a fine trattamento.

Durante il periodo di trattamento si è evidenziato che gli animali che ricevono la somministrazione in bolo non presentano alterazioni a livello comportamentale. Al contrario i ratti che ricevono il sagopilone tramite infusione dopo un primo periodo di perlustrazione all'interno della gabbia si tranquillizzano ed iniziano ad accasciarsi sul lato destro (lato in cui hanno subito l'intervento) tenendo alzata la zampa destra.

La dose minore di sagopilone induce un calo di peso corporeo significativo rispetto agli animali controllo a partire dalla seconda somministrazione nel gruppo di animali che riceve il farmaco tramite infusione di 3 ore. Le somministrazioni successive inducono un calo significativo verso gli animali controllo anche per il gruppo che riceve la somministrazione in bolo. Al contrario si registra che il gruppo di animali che riceve ZK-EPO con un'infusione di 30 minuti presenta un calo significativo, durante tutto il periodo di trattamento, solo rispetto agli animali trattati con il veicolo.

L'analisi statistica riportata nel grafico sottostante è stata effettuata considerando a ogni misurazione la media del peso corporeo dell'intero gruppo di animali riceventi il farmaco rispetto a quella riscontrata nel gruppo di animali controllo. Durante tutto il periodo di trattamento gli animali appartenenti al gruppo trattato con il veicolo non presentano alcuna variazione di peso significativa rispetto al gruppo controllo.

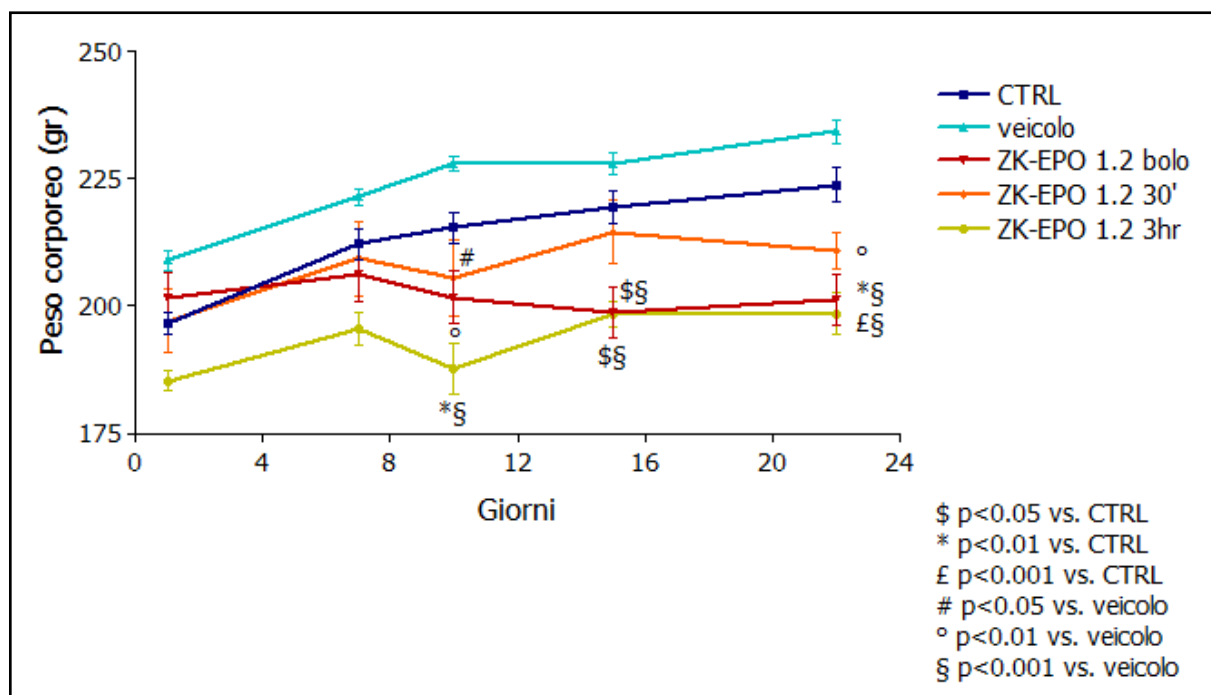


Fig. 28: variazione del peso corporeo e analisi statistica di tale variazione durante il periodo di trattamento di 4 settimane per gli animali trattati con sagopilone 1.2 mg/kg tramite tre diversi metodi di somministrazione.

La dose maggiore di sagopilone induce un calo di peso corporeo significativo rispetto agli animali controllo e agli animali trattati con il solo veicolo a partire dalla prima somministrazione in tutti e tre i gruppi di trattamento. In particolare tale variazione, contrariamente a quanto visto per la dose minore, sembra essere maggiormente evidente nei gruppi trattati in bolo e con infusione di 30 minuti. Alla fine del periodo di trattamento infatti il gruppo che riceve sagopilone con un'infusione di tre ore non presenta variazione significativa di peso corporeo né rispetto agli animali controllo né rispetto a quelli trattati con il veicolo. Il calo di peso corporeo sembra essere più evidente negli animali trattati con dose maggiore di sagopilone ma non sembra poter essere associato a una particolare modalità di somministrazione.

L'analisi statistica riportata nel grafico sottostante è stata effettuata considerando a ogni misurazione la media del peso corporeo dell'intero gruppo di animali riceventi il farmaco rispetto a quella riscontrata nel gruppo di animali controllo. Durante tutto il periodo di trattamento gli animali appartenenti al gruppo trattato con il veicolo non presentano alcuna variazione di peso significativa rispetto al gruppo controllo.

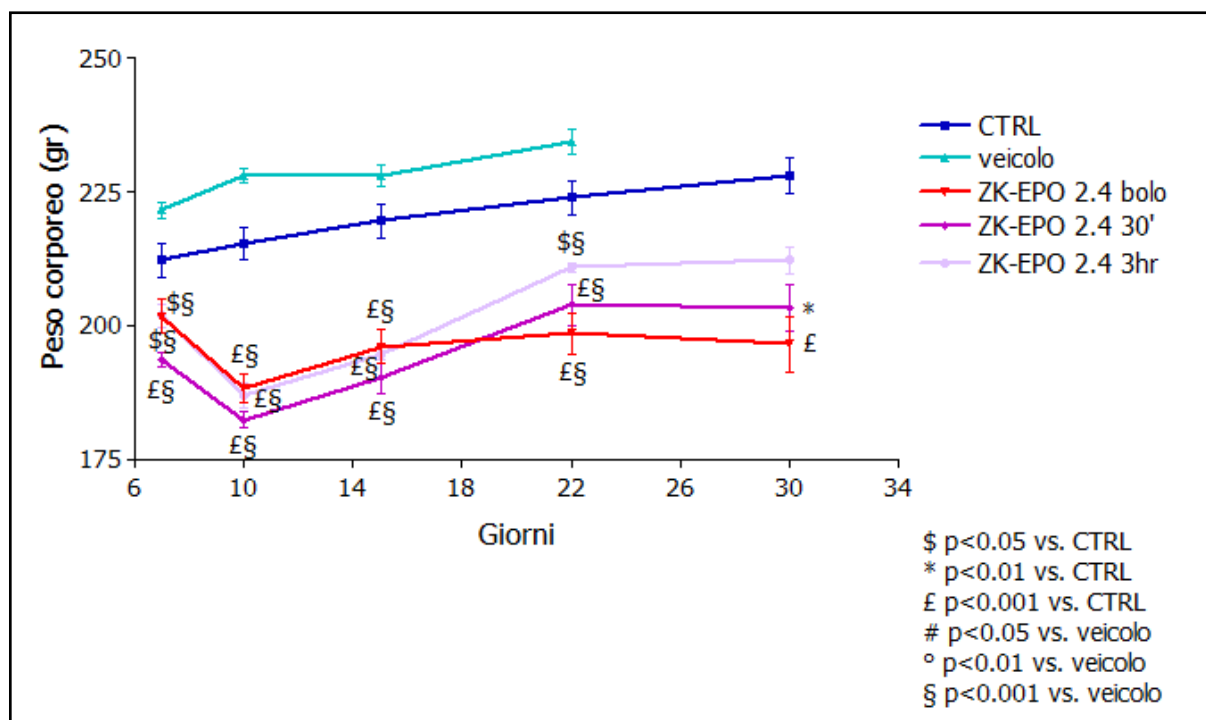


Fig. 29: variazione del peso corporeo e analisi statistica di tale variazione durante il periodo di trattamento di 4 settimane per gli animali trattati con sagopilone 2.4 mg/kg tramite tre diversi metodi di somministrazione.

- NEUROTOSSICITÀ: VALUTAZIONE DELLA VELOCITÀ DI CONDUZIONE NERVOSA

Prima dell'inizio del periodo di trattamento (dato non riportato in quanto non presentava alcuna variazione significativa tra i diversi gruppi), dopo due settimane dall'inizio del trattamento e alla fine delle quattro settimane di somministrazione del farmaco è stato misurato il valore della velocità di conduzione dell'impulso nervoso a livello del nervo caudale degli animali, appartenenti a ciascun gruppo.

Come mostrato nel grafico, dopo due settimane di trattamento, la dose minore di sagopilone non induce una variazione significativa della velocità di conduzione nervosa né verso il gruppo controllo né verso il gruppo di animali trattati con il veicolo. Al contrario, alla fine del periodo di trattamento, l'analisi statistica ha evidenziato una riduzione significativa di tale valore in tutti e tre i gruppi di trattamento rispetto agli animali controllo e a quelli trattati con il veicolo.

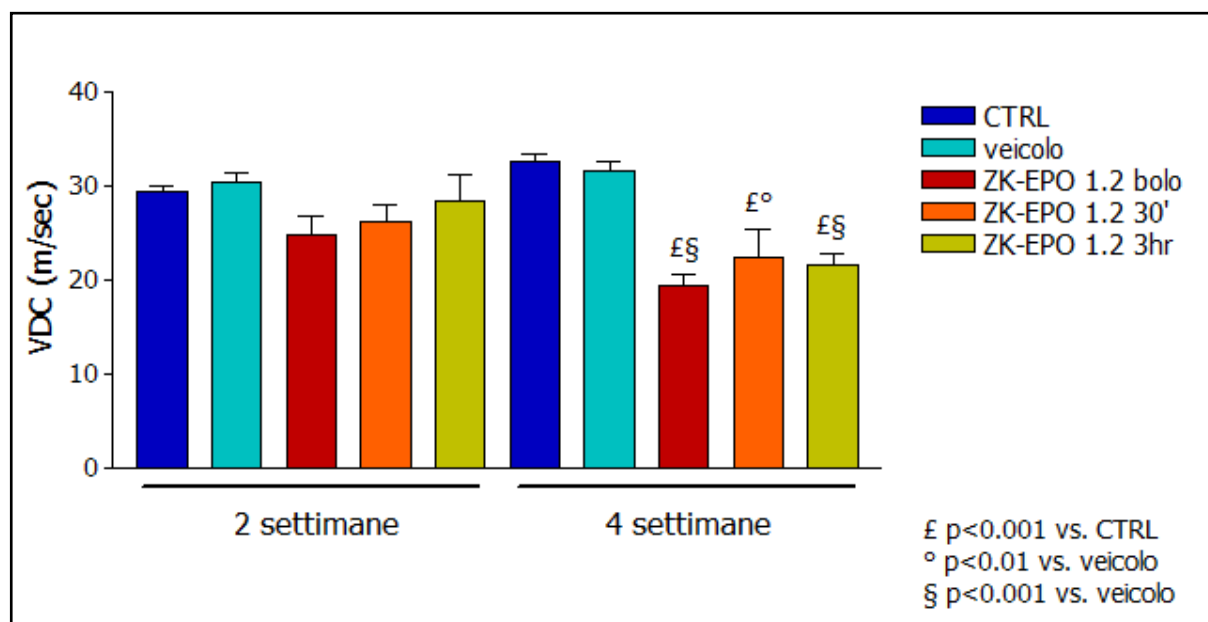


Fig. 30: misurazione della velocità di conduzione nervosa e analisi statistica di tale valore analizzato dopo due settimane dall'inizio del trattamento e a fine del periodo di trattamento per gli animali trattati con sagopilone 1.2 mg/kg tramite tre diversi metodi di somministrazione.

Come mostrato nel grafico sottostante la dose maggiore di sagopilone già dopo due settimane di trattamento è in grado di indurre una variazione significativa della velocità di conduzione nervosa nei gruppi trattati con sagopilone in bolo e tramite infusione di 30 minuti verso il gruppo controllo e verso il gruppo di animali trattati con il veicolo. Il gruppo di animali che riceve il farmaco tramite infusione di 3 ore, dopo due settimane di trattamento, presenta una variazione significativa solo verso il gruppo di animali trattati con il veicolo. Al contrario, alla fine del periodo di trattamento, l'analisi statistica ha evidenziato una riduzione significativa di tale valore in tutti e tre i gruppi di animali trattati con sagopilone sia verso i controlli che verso il gruppo trattato con il veicolo.

Analizzando i dati ottenuti dalla due dosi di trattamento la riduzione della velocità di conduzione nervosa risulta essere dose-dipendente; si registra, infatti, che la dose maggiore di farmaco, a differenza dell'altra, è in grado di provocare alterazioni a livello neurofisiologico già dopo due settimane di trattamento.

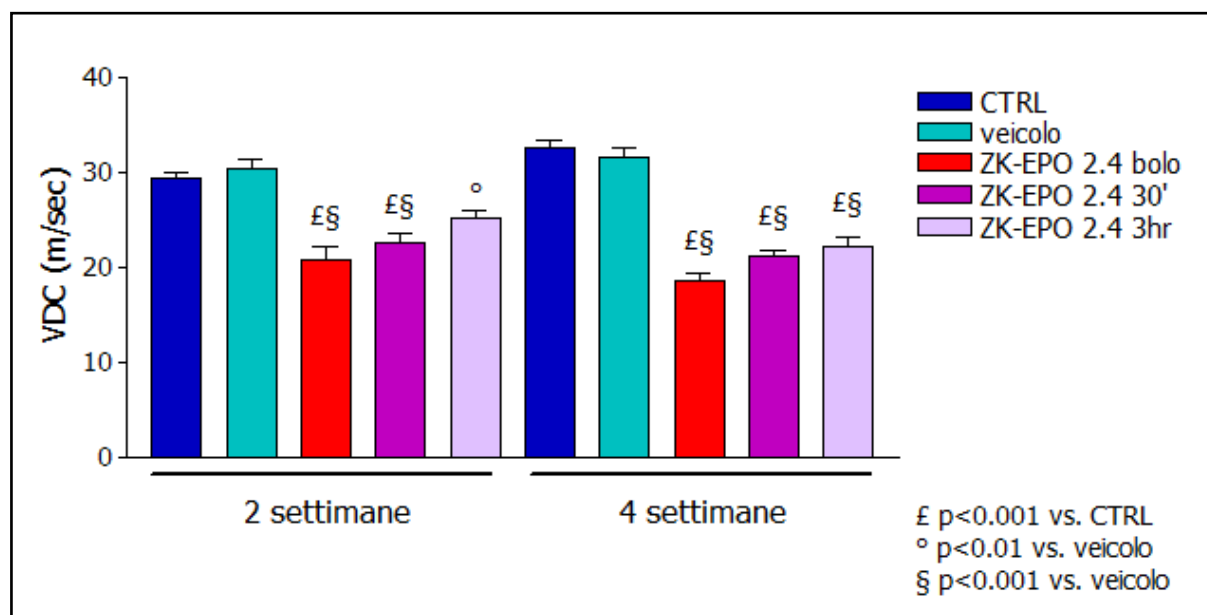


Fig. 31: misurazione della velocità di conduzione nervosa e analisi statistica di tali valori analizzati dopo due settimane dall'inizio del trattamento e a fine del periodo di trattamento per gli animali trattati con sagopilone 2.4 mg/kg tramite tre diversi metodi di somministrazione.

- NEUROTOSSICITÀ: ANALISI MORFOLOGICA e MORFOMETRICA DEL NERVO SCIATICO

Le sezioni trasverse dei nervi sciatici degli animali trattati con sagopilone sono state osservate al microscopio ottico e hanno evidenziato la presenza di fibre con morfologia alterata rispetto ai campioni di controllo; in particolare, in questi campioni, è stata osservata una assonopatia primaria associata a degenerazione mielinica secondaria. L'entità del danno a livello del nervo sciatico non sembra essere severa ma tuttavia presente in tutti gli animali trattati con ZK-EPO. Come evidenziato anche tramite le analisi di velocità di conduzione nervosa queste alterazioni morfologiche non possono essere correlate con la modalità e le tempistiche di somministrazione.

L'immagine sottostante mette in luce le differenze evidenziate tra gli animali controllo e gli animali trattati con la dose maggiore di farmaco (2.4 mg/kg).

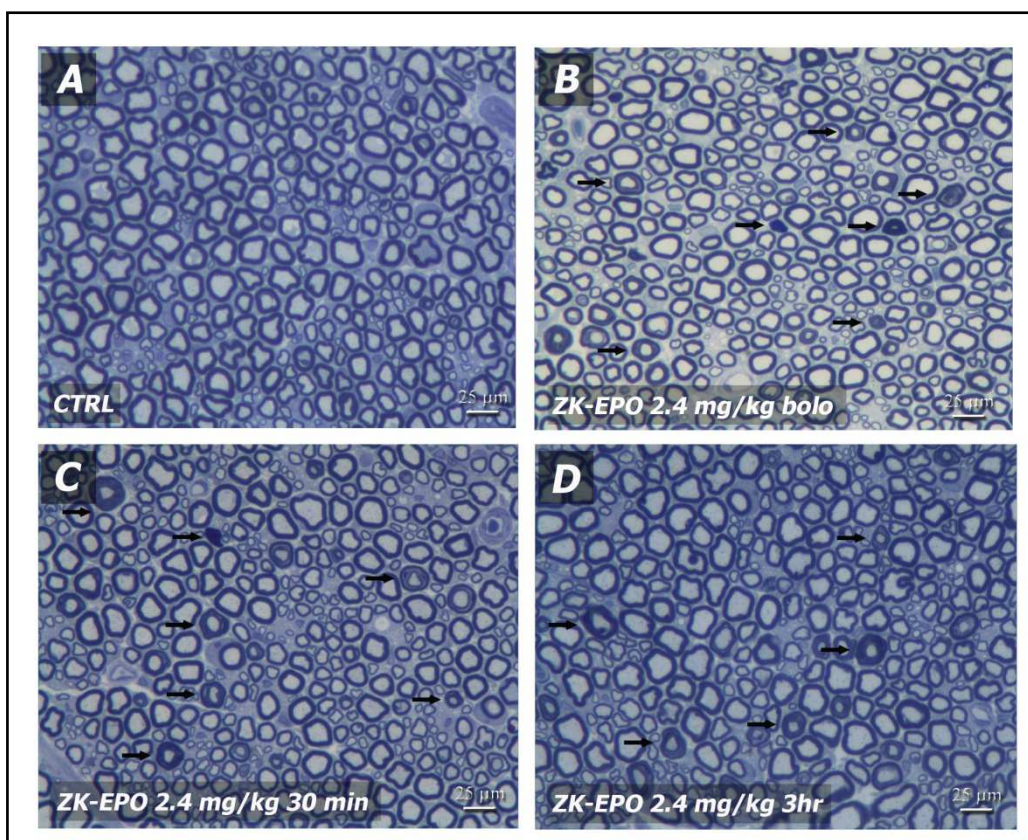


Fig. 32: l'immagine A è rappresentativa della morfologia del nervo sciatico degli animali controllo mentre le immagini B, C e D sono rappresentative degli animali trattati con la dose maggiore di ZK-EPO (2.4 mg/kg) e tramite i tre diversi modi di somministrazione. Le frecce indicano la presenza del danno a livello delle fibre di grosso calibro (barra 25 µm).

L'analisi morfometrica riportata di seguito è stata effettuata solo sui campioni di nervo sciatico degli animali che ricevono sagopilone in bolo e tramite infusione di 30 minuti alla dose di 2.4 mg/kg; l'analisi non è stata effettuata, invece, sui campioni degli animali che hanno ricevuto il farmaco tramite infusione di 3 ore dal momento che non sono stati evidenziati grandi cambiamenti rispetto all'infusione di 30 minuti. Come mostrato nei grafici e nella tabella sottostanti tale analisi ha messo in luce delle differenze tra la distribuzione dei valori di controllo e dei trattati. In particolare si è evidenziato un aumento significativo del diametro assonale ($p < 0.001$) e del diametro della fibra ($p < 0.05$) che si riflette in un aumento significativo del valore di *g-ratio* ($p < 0.001$) per gli animali che ricevono il sagopilone tramite un'infusione di 30 minuti. Per quanto riguarda gli animali che ricevono sagopilone in bolo non si evidenziano variazioni significative dei valori di diametro assonale e diametro della fibra ma si ha un aumento

significativo del valore di *g-ratio* ($p < 0.01$). I campioni degli animali trattati con sagopilone in bolo presentano un aumento del diametro dell'assone e del valore di *g-ratio* rispetto ai campioni degli animali trattati con sagopilone tramite infusione di 30 minuti.

I grafici e la tabella sottostanti mostrano le differenze riscontrate nei gruppi rispetto al controllo.

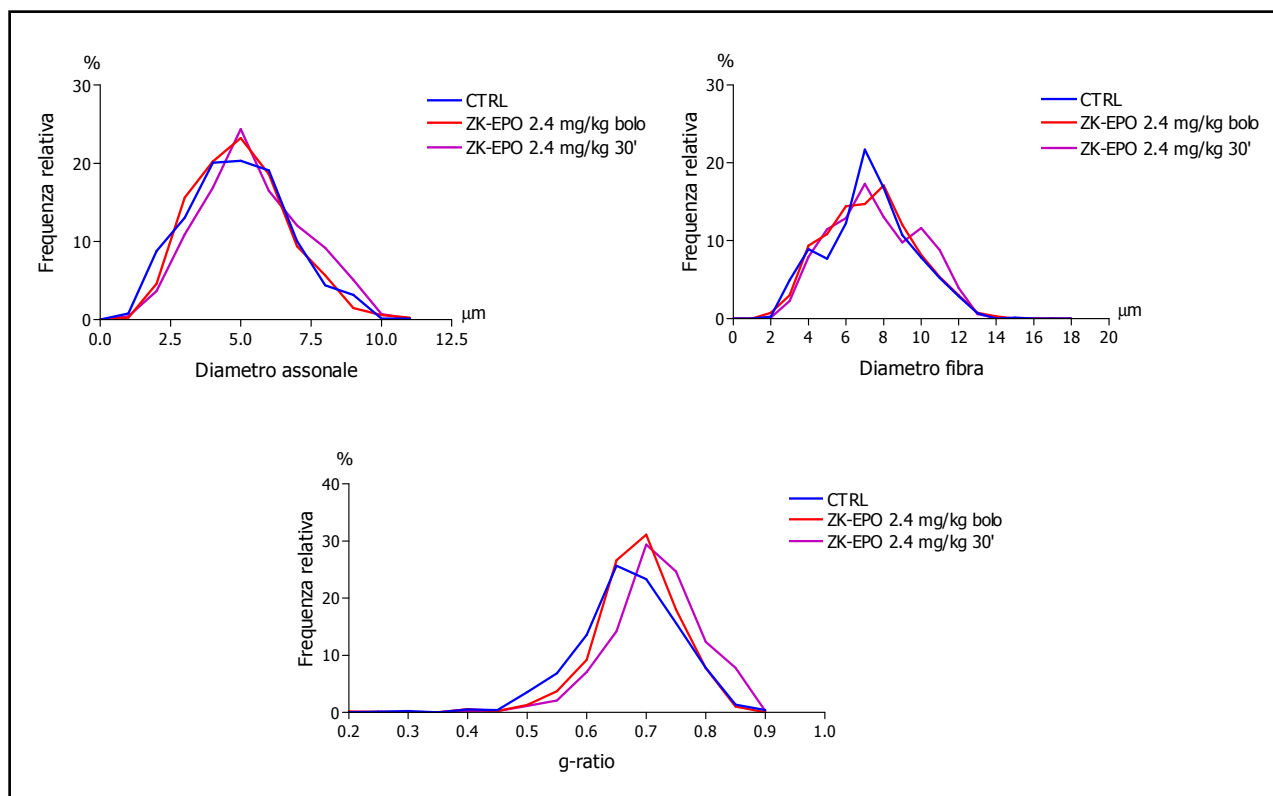


Fig. 33: risultato dell'analisi morfometrica condotta sui nervi sciatici che evidenzia un aumento del valore di *g-ratio* in entrambi i gruppi di trattamento presi in esame.

Gruppi	Diametro fibra (μm)	Diametro assonale (μm)	Spessore mielinico	<i>g-ratio</i>
CTRL	4.91±1.76	7.27±2.78	1.18±0.44	0.669±0.09
ZK-EPO 2.4mg/kg bolo	4.98±1.67	7.31±2.34	1.16±0.51	0.684±0.07
ZK-EPO 2.4mg/kg 30'	5.42±1.82	7.58±2.36	1.08±0.47	0.715±0.08

Tab. 2: valori dei diametri della fibra, degli assoni, dello spessore mielinico e della *g-ratio* calcolato in 500 fibre/nervo su tre nervi per ogni gruppo di trattamento espressi come media±SD.

- ANALISI ISTOPATOLOGICA DI RENE E FEGATO

L'analisi istopatologica ha evidenziato la presenza di vacuolizzazioni a livello del tubulo prossimale della corteccia renale in tutti gli animali trattati con ZK-EPO a diverse dosi e con le diverse modalità di somministrazione rispetto agli animali controllo e a quelli trattati con il veicolo. In particolare queste variazioni sono state osservate nel 100% degli animali che ricevono il farmaco in bolo a entrambe le dosi; nel 100% degli animali trattati con ZK-EPO 2.4 mg/kg attraverso un'infusione di 30 minuti e di 3 ore. Per quanto riguarda la dose minore di ZK-EPO queste alterazioni si verificano nel 75% e nel 66% degli animali trattati rispettivamente con un'infusione di 30 minuti e di 3 ore.

A livello del fegato questa indagine ha evidenziato la presenza di rare infiltrazioni linfocitarie non correlate al trattamento in quanto tali infiltrati, oltre a essere presenti negli animali trattati con ZK-EPO, sono presenti anche sia negli animali appartenenti al gruppo controllo che in quelli appartenenti al gruppo trattato con il veicolo.

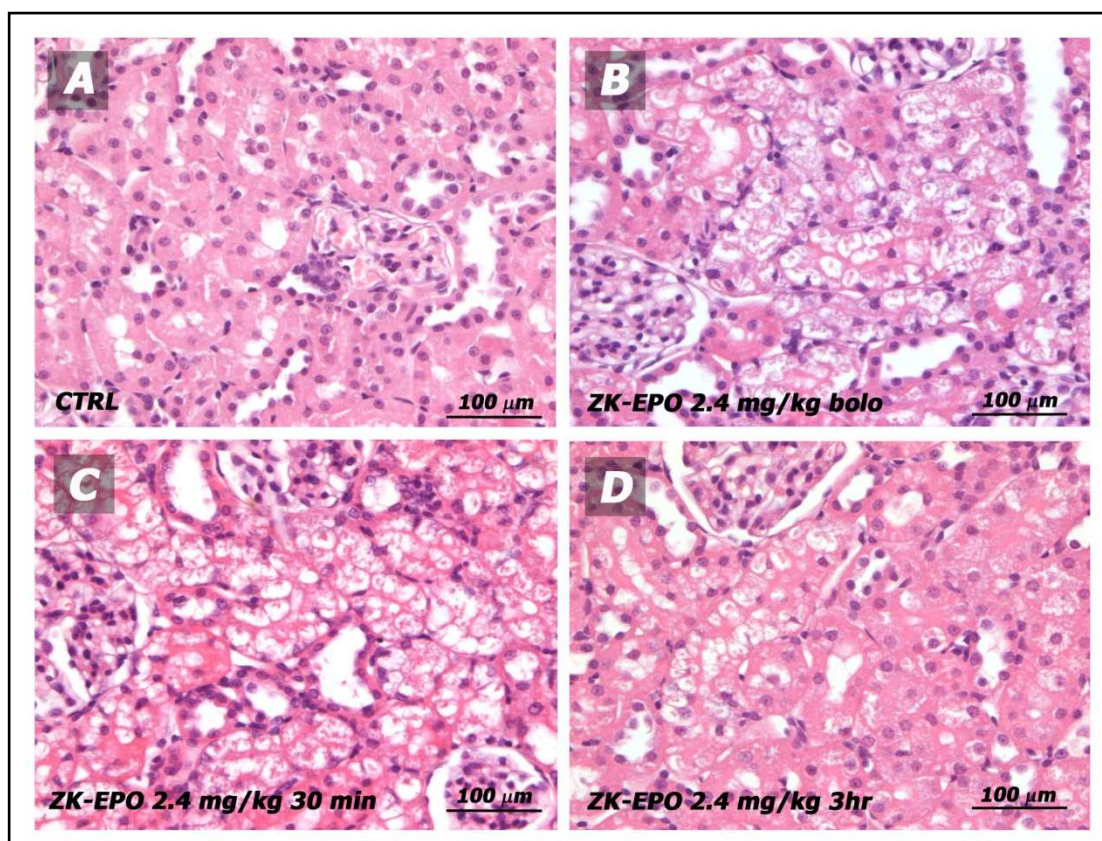


Fig. 34: l'immagine A è rappresentativa della morfologia del rene degli animali controllo mentre le immagini B, C e D sono rappresentative degli animali trattati con la dose maggiore di ZK-EPO (2.4 mg/kg) e tramite i tre diversi modi di somministrazione (barra 100 µm).

- ANALISI EMATOLOGICA ED EMATOCHIMICA

Al momento del sacrificio, da ciascun animale anestetizzato sia trattato che di controllo, è stato prelevato dall'aorta addominale un campione di sangue. Di questi campioni sono poi stati analizzati diversi parametri ematochimici ed ematologici quali la conta dei globuli rossi, dei globuli bianchi e delle piastrine, il valore di ematocrito e di emoglobina, i valori di creatininemia, urea, ALT e AST. Le medie dei valori misurati per gli animali di controllo e per gli animali trattati per ciascun parametro sono rappresentate nelle Tabelle 3 e 4.

	Globuli rossi ($5-10 \cdot 10^6 / \mu l$)	Globuli bianchi ($3-17 \cdot 10^3 / \mu l$)	Piastrine ($200-1500 \cdot 10^3 / \mu l$)	Hb (11-19 g/dl)	Ht (35-57%)
CTRL	7,6	6,3	605	15,2	42,8
Veicolo	7,4	7,3	690,8	15,1	42,8
ZK-EPO 1.2 mg/kg bolo	5,2 *	3,9	623	10,9 **	30,7 **
ZK-EPO 1.2 mg/kg 30'	5 *	4,7	620,7	10,9 **	30,5 **
ZK-EPO 1.2 mg/kg 3hr	5,3 *	6,8	567,3	11,1 **	31,4 **
ZK-EPO 2.4 mg/kg bolo	4,9 *	3,2 *	641,8 *	10,5 **	29,7 **
ZK-EPO 2.4 mg/kg 30'	5,1 *	5,6	423	10,5 **	30,2 **
ZK-EPO 2.4 mg/kg 3hr	5,3 *	6,6	509	11,2 **	31,8 **

Tab. 3: valori ematologici degli animali controllo e degli animali trattati con diverse dosi di sagopilone e diverse schede di somministrazione. I valori indicati con gli asterischi presentano una variazione statisticamente significativa rispetto ai valori controllo (* $p < 0.01$ vs. CTRL; ** $p < 0.001$ vs. CTRL; *** $p < 0.05$ vs. CTRL; Hb: emoglobina; Ht: ematocrito).

	Urea	Creatinina	ALT	AST
	<i>(12-23 mg/dl)</i>	<i>(0.4-1.4 mg/dl)</i>	<i>(36 UI/l)</i>	<i>(82 UI/l)</i>
CTRL	47	0,57	41	122
Veicolo	49	0,56	71 *	96
ZK-EPO 1.2 mg/kg bolo	55	0,71 ***	72 *	133
ZK-EPO 1.2 mg/kg 30'	42	0,57	55	129
ZK-EPO 1.2 mg/kg 3hr	44	0,54	59	121
ZK-EPO 2.4 mg/kg bolo	61	0,68	52	118
ZK-EPO 2.4 mg/kg 30'	37	0,57	44	176
ZK-EPO 2.4 mg/kg 3hr	39	0,54	42	138

Tab. 4: valori ematochimici degli animali controllo e degli animali trattati con diverse dosi di sagopilone e diverse schede di somministrazione. I valori indicati con gli asterischi presentano una variazione statisticamente significativa rispetto ai valori controllo (* p<0.01 vs. CTRL; ** p<0.001 vs. CTRL; *** p<0.05 vs. CTRL; ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartato aminotransferasi).

Come mostrato in tabella l'analisi statistica ha evidenziato delle variazioni significative tra alcuni gruppi di trattamento e il gruppo controllo; in particolare si evidenzia che entrambe le dosi e tutti e tre i metodi di somministrazione provocano una riduzione significativa a livello della conta dei globuli rossi e dei globuli bianchi e nei valori di emoglobina ed ematocrito. Solo il gruppo trattato con la dose maggiore di sagopilone in bolo presenta anche una piastrinopenia.

Per quanto riguarda l'analisi ematochimica, invece, si vede come solo il gruppo trattato con sagopilone 1.2 mg/kg in bolo presenta un aumento significativo a livello dei parametri di creatinina e ALT.

- QUANTIZZAZIONE DELL'INCREMENTO DI POLIMERIZZAZIONE DELLA β -TUBULINA

Come già visto anche in seguito a trattamento con epotilone B gli estratti proteici e le analisi di immunoblotting effettuate sui nervi sciatici hanno mostrato un incremento della quantità di β -tubulina polimerizzata nel pellet rispetto al surnatante in tutti i gruppi trattati con sagopilone rispetto al gruppo controllo. Questo risultato dimostra, quindi,

che il sagopilone è in grado di aumentare la polimerizzazione della tubulina a dosi che inducono l'insorgenza della neuropatia periferica.

In particolare, anche in questo caso, come nel caso dell'analisi morfometrica, il test è stato effettuato solo sui nervi sciatici degli animali trattati con la dose maggiore di farmaco e solo sui gruppi che ricevono la somministrazione in bolo e tramite infusione di 30 minuti. Non è stata effettuata la medesima analisi sugli animali che ricevono sagopilone tramite infusione di 3 ore dal momento che i due tempi di infusione non hanno mostrato differenze a livello di tossicità generale e neurotossicità.

Come mostrato nell'immagine e nel grafico sottostanti, si nota che il sagopilone è in grado di indurre un aumento della polimerizzazione rispetto al gruppo controllo; tale aumento si registra sia in seguito a somministrazione cronica di sagopilone in bolo che in seguito a infusione di 30 minuti.

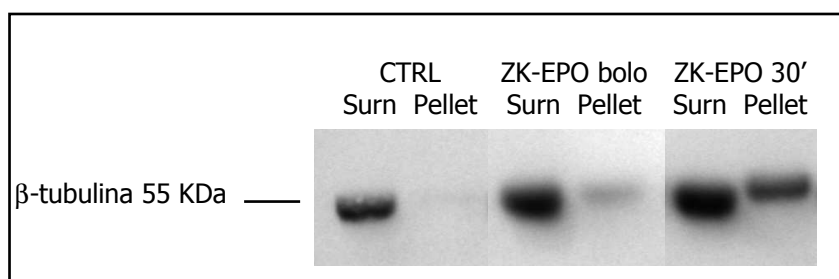


Fig. 35: immunoblotting rappresentativo di uno degli esperimenti condotti alla fine del periodo di trattamento sui nervi sciatici degli animali trattati con sagopilone 2.4 mg/kg in bolo e tramite infusione di 30' e che mostra l'aumento della polimerizzazione della β -tubulina in seguito a tale trattamento.

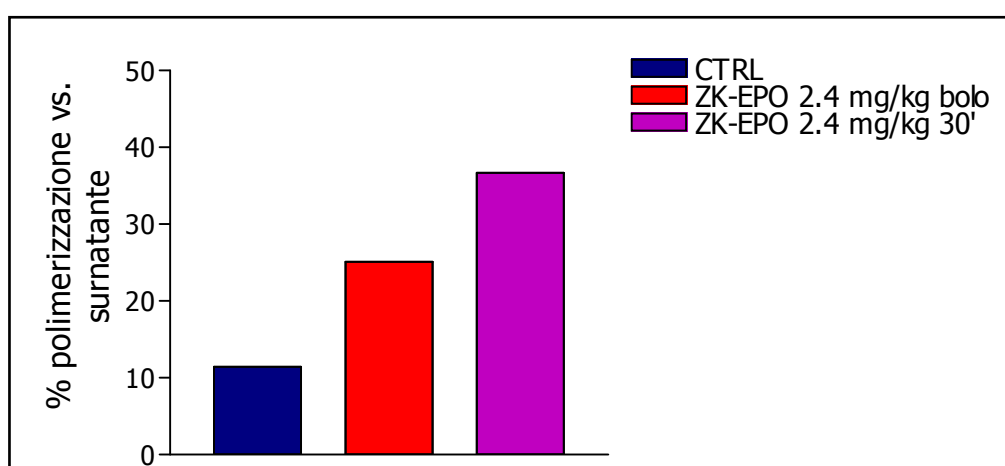


Fig. 36: rappresentazione della percentuale di β -tubulina polimerizzata all'interno del pellet rispetto alla β -tubulina polimerizzata all'interno del surnatante negli animali trattati con sagopilone 2.4 mg/kg.

Discussione

Gli antitubulinici rappresentano una delle classi di farmaci chemioterapici caratterizzati da una maggiore efficacia nella lotta contro alcune forme di tumori solidi quali il tumore alla mammella, al polmone e il carcinoma renale. La loro efficacia è però associata all'insorgenza di alcuni effetti collaterali tra cui la neuropatia periferica.

L'insorgenza della neuropatia periferica indotta da chemioterapici rappresenta uno dei principali fattori limitanti nel trattamento clinico dei tumori, in quanto è in grado di compromettere in modo significativo la qualità di vita dei pazienti in cura. Nonostante il sistema nervoso periferico sia un apparato in grado di rigenerarsi in seguito a lesioni, non sempre gli effetti collaterali della terapia antitumorale sono in grado di risolversi completamente e, a volte, il danno permane anche per anni dal termine del trattamento (Peltier and Russell, 2002).

In seguito alla scoperta degli alcaloidi della vinca, e successivamente del paclitaxel, sono stati condotti numerosi studi sugli antitubulinici volti a cercare di aumentarne l'efficacia antitumorale e ridurre gli effetti collaterali che inficiano la qualità di vita dei pazienti. Un primo tentativo per raggiungere questi obiettivi è stato condotto modificando la struttura naturale di alcuni farmaci e ricercando nuove molecole naturali con attività antitumorale.

Grazie a tale approccio sono stati portati alla luce diversi composti di origine batterica, vegetale o animale che possiedono attività antitubulinica; tra essi figurano gli epotiloni (Bollag et al., 1995) che presentano buone potenzialità antineoplastiche. Il gruppo di Bollag evidenziò tali potenzialità antineoplastiche mettendo in rilievo l'attività antitubulinica degli epotiloni e confrontandola con quella del paclitaxel. Nei loro studi, tramite osservazioni *in vitro*, mostrarono che gli epotiloni presentano cinetiche di interferenza con l'equilibrio dinamico dei microtubuli pari a quelle del paclitaxel dimostrandosi, quindi, efficaci nell'induzione dell'apoptosi cellulare in seguito a blocco nella fase G2/M in linee cellulari tumorali. In questi studi però l'osservazione più

importante fu quella relativa all'efficacia di queste molecole anche in linee tumorali resistenti al paclitaxel, esprimendo alti livelli di *Pgp* (Bollag et al., 1995).

Le potenzialità messe in luce da questo lavoro stimolarono un incremento degli studi su questa classe di composti.

Gli epotiloni, quindi, presentano tre vantaggi rispetto al paclitaxel che è il più comune antitubulinico usato in clinica:

- ✓ gli epotiloni naturali sono in grado di inibire la crescita cellulare in linee tumorali resistenti al trattamento con paclitaxel avendo ridotte interazioni con la proteina *Pgp*. Questa proteina è infatti responsabile dell'espulsione del paclitaxel e di altri farmaci dalla cellula riducendo la biodisponibilità del farmaco e quindi la sua efficacia antitumorale. Come accennato sopra, al contrario, gli epotiloni presentano un'affinità per la proteina *Pgp* inferiore di due/tre ordini di grandezza rispetto a quella dimostrata per il paclitaxel, rendendoli molto efficaci nel trattamento delle linee resistenti al paclitaxel (Wartmann and Altmann, 2002);
- ✓ la struttura chimica degli epotiloni naturali li rende maggiormente solubili e permette, nella preparazione della dose da somministrare, di non utilizzare solventi responsabili di frequenti reazioni di ipersensibilità nei pazienti in cura farmacologica;
- ✓ un ulteriore vantaggio è legato ad una più facile sintesi degli epotiloni rispetto al paclitaxel che è stato per lungo tempo prodotto per estrazione dalla corteccia di *Taxus brevifolia* mentre oggi è ottenuto per via semi-sintetica a partire da estratti di aghi di numerose specie di tasso, con un alto costo. Al contrario gli epotiloni sono facilmente ottenibili attraverso la fermentazione di *Sorangium cellulosum* ed altri *myxobacteria* (Mani et al., 2004; Walsh et al., 2003; Tang et al., 2005). Negli ultimi anni sono state messe a punto molecole di sintesi e semi-sintesi che hanno permesso un ulteriore abbattimento dei costi; sono stati anche sviluppati numerosi analoghi sintetici tra cui il sagopilone che rappresenta il primo epotilone di totale sintesi artificiale entrato in sperimentazione clinica (Klar et al., 2006).

Gli studi sull'efficacia degli epotiloni nelle diverse linee cellulari tumorali hanno dimostrato l'importante attività antiproliferativa di questi farmaci.

L'efficacia esercitata dall'epotilone B è stata evidenziata in linee di tumori solidi quali il carcinoma al polmone, alla mammella, al colon, alla prostata e all'ovaio. Questa maggiore efficacia è dovuta sia a una maggiore capacità di internalizzazione del farmaco nella cellula, che porta tali molecole ad essere fino a mille volte più concentrate all'interno della cellula rispetto all'esterno (Altmann et al., 2000; Lichtener et al., 2001), sia alla IC₅₀ di EPO B che risulta essere di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella di paclitaxel e EPO A (Wartmann and Altmann, 2002). Correlando le quantità di farmaco internalizzato con i relativi valori di IC₅₀ EPO B risulta possedere un'efficacia antitumorale a dosi inferiori rispetto a quelle di paclitaxel richieste per ottenere un effetto comparabile.

Anche gli epotiloni sintetici possiedono un'elevata efficacia antitumorale; attraverso lo sviluppo di modelli *in vitro*, infatti, si è dimostrato che il sagopilone presenta una potente attività antineoplastica su un ampio spettro di linee tumorali quali il carcinoma alla mammella, al colon, alla prostata, all'ovaio e allo stomaco già a concentrazioni più basse rispetto agli altri epotiloni (Schmidt et al., 2010; Klar et al., 2006). Questa sua caratteristica potrebbe essere utile nella messa a punto di *trial* clinici permettendo l'uso di una concentrazione inferiore del farmaco in modo da limitare l'insorgenza della neuropatia periferica associata al suo utilizzo.

Nonostante gli epotiloni naturali non siano esposti come i taxani al meccanismo di farmaco-resistenza mediato dalla proteina *Pgp* alcuni studi *in vitro* hanno evidenziato la presenza di linee cellulari resistenti al trattamento con epotiloni. Tale farmaco-resistenza è dovuta alla presenza di mutazioni sul gene della β -tubulina che rendono meno efficace il legame dell'epotilone alla proteina, e di conseguenza, il suo effetto stabilizzante sui microtubuli. Anche in questo caso l'epotilone B sembra essere più efficace rispetto all'epotilone A (Giannakakou et al., 2000).

L'epotilone naturale pur non essendo sottoposto ai normali meccanismi di espulsione dalla cellula presenta, quindi, un'attività ridotta nei confronti delle linee tumorali MDR(+) mentre lo studio effettuato da Klar e collaboratori nel 2006 ha mostrato come il sagopilone, al contrario, sia in grado di mantenere la sua elevata attività anche nei confronti di queste linee cellulari (Klar et al., 2006).

L'efficacia degli epotiloni in clinica si è dimostrata paragonabile, ed in alcuni casi migliore, rispetto a quella del paclitaxel, sebbene la sperimentazione clinica attualmente in corso per sette diversi epotiloni (EPO B, ixabepilone, KOS-862, BMS-310705, ABJ879, KOS-1584 e ZK-EPO) abbia mostrato alcuni risultati in contrasto con i dati preclinici (Goodin et al., 2004). L'elevata differenza di efficacia che si manifesta tra epotiloni e paclitaxel nei modelli *in vitro* e *in vivo* non si conferma allo stesso livello nei *trial* clinici; questa differenza potrebbe essere correlata ad una diversa farmacocinetica dell'epotilone B e del sagopilone nei modelli *in vivo* utilizzati in ambito preclinico e nell'uomo.

I primi dati clinici in seguito a somministrazione di epotiloni hanno evidenziato l'insorgenza di una neurotossicità che presenta caratteristiche differenti a seconda del tipo di epotilone utilizzato; ad esempio la sperimentazione di ixabepilone ha evidenziato l'insorgenza di una neuropatia dose-dipendente che ne limita l'impiego clinico mentre quella di EPO B evidenzia la comparsa di una neuropatia non dose-limitante (Cardoso et al., 2008; Cortes and Baselga, 2007; Fournier, 2007; Lee et al., 2006). Anche la sperimentazione effettuata tramite uno studio di fase I in pazienti trattati con sagopilone mostra, tra gli effetti collaterali, l'insorgenza di una neuropatia periferica sensitiva associata a nausea e atassia (Fumoleau et al., 2007). Il diverso grado di neurotossicità dei diversi epotiloni (naturali o sintetici) dipende da diversi fattori tra cui possiamo citare la capacità di attraversare la barriera emato-encefalica (Chiorazzi et al., 2009).

Nonostante l'insorgenza di numerosi effetti collaterali, tra cui la neurotossicità periferica, la terapia antitumorale non può essere evitata dal momento che viene utilizzata per la cura di patologie gravi; per tale motivo si cerca di investigare quali siano i meccanismi di neurotossicità esercitati dai farmaci in modo da rendere più selettiva l'azione del farmaco o permettere lo sviluppo di neuroprotettori da affiancare alla terapia antitumorale.

Attualmente, molti studi in letteratura dimostrano come l'efficacia antitumorale di ciascun chemioterapico sia legata alla dose e al meccanismo d'azione della classe a cui esso appartiene.

Per poter comprendere meglio quali siano i meccanismi che inducono l'insorgenza della CIPN è fondamentale lo sviluppo di modelli di neurotossicità *in vitro* e *in vivo*. Entrambi questi tipi di modelli risultano fondamentali in quanto sono in grado di fornirci informazioni differenti; i modelli *in vitro* permettono di determinare, all'interno di un sistema semplificato, le caratteristiche farmacodinamiche dei farmaci di nostro interesse. Con l'utilizzo dei modelli *in vivo*, invece, è possibile riprodurre, e meglio comprendere, i meccanismi che sono alla base di alcune patologie all'interno di un organismo complesso e paragonabile a quello umano. Nel nostro caso, 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.

Il meccanismo d'azione che porta all'insorgenza della neuropatia indotta dagli epotiloni non è ancora chiaro, in letteratura, infatti, non esistono studi *in vitro* o *in vivo* a riguardo ed è per questo che si è ritenuto necessario mettere a punto dei modelli sperimentali atti a caratterizzare, e cercare di prevenire, gli effetti collaterali sul sistema nervoso periferico causati dalla somministrazione cronica con epotiloni.

Il modello *in vitro* di neurotossicità da epotilone B è stato messo a punto somministrando dosi crescenti di farmaco a colture organotipiche di DRG estratti da embrioni di ratti Sprague-Dawley al 15° giorno di età. Le dosi più basse utilizzate in questo studio sono nell'ordine delle nM e questo risulta essere in accordo con i valori di IC₅₀ riportati in studi precedenti effettuati su cellule tumorali (Wartmann and Altmann, 2002).

Il modello è caratterizzato, dopo 24 ore dall'inizio del trattamento, da una buona correlazione tra la dose di farmaco somministrata e la regressione della lunghezza media del neurite. Tale regressione, che risulta essere dose-dipendente, mostra una tendenza al rallentamento per quanto riguarda i gruppi di DRG trattati con concentrazioni di farmaco superiori a 100 nM che non mostrano tra loro differenze statisticamente significative.

Dopo 48 ore acquistano significatività statistica le differenze tra il gruppo trattato con EPO B 5 nM e quelli trattati con concentrazioni inferiori. A tale tempo di trattamento si evidenzia la presenza di un effetto soglia tra il gruppo trattato con EPO B 5 nM e quello trattato con EPO B 50 nM, con una differenza che passa dal 40% delle 24 ore a un valore che supera il 50% dopo le 48 ore di trattamento.

Nel nostro modello l'epotilone B è in grado di indurre una riduzione statisticamente significativa della lunghezza media del neurite quando viene trattato ad una dose di 50 nM. Tale evidenza può essere correlata alle osservazioni presenti in letteratura secondo cui, aumentando il tempo di esposizione delle cellule di linee tumorali a basse concentrazioni di EPO B, si possono ottenere effetti inibitori sulle funzioni microtubulari paragonabili a quelli indotti dall'uso di alte dosi (Altmann et al., 2000). Questi dati sono anche in accordo con uno studio sull'*uptake* cellulare di epotilone e paclitaxel che evidenzia che, su linee cellulari tumorali, la IC_{50} dell'epotilone B è dell'ordine di grandezza del decimo nanomolare (Wartmann and Altmann, 2002).

Analizzando i gruppi di DRG trattati a concentrazioni inferiori a 50 nM, che non mostrano una regressione rilevante rispetto ai controlli, si può invece ipotizzare che il farmaco sia in grado di indurre una diminuzione della crescita tumorale che comporti l'insorgenza *in vitro* di una neurotossicità lieve e reversibile. L'osservazione di tali gruppi dopo 48 ore, al termine del quale i neuriti mostrano un netto recupero, sembra rafforzare questa ipotesi avvalorata anche dal fatto che, nel corso dei *trial* clinici, l'insorgenza della neuropatia non è sempre l'effetto collaterale che ne limita la dose e l'utilizzo (Hussain et al., 2005).

Prendendo in considerazione i DRG trattati con dosi superiori a 50 nM la regressione media della lunghezza del neurite appare livellata non mostrando differenze significative tra i DRG trattati con EPO B 100 nM e 1 μ M. Dopo 48 ore i neuriti dei diversi gruppi mostrano un ulteriore calo pur non presentando ancora differenze significative tra loro suggerendo quindi che l'aumento della dose non risulta essere correlato ad un aumento significativo della neurotossicità. Tale osservazione permette di ipotizzare che la curva dose-tossicità dell'epotilone B sia caratterizzata da una sorta di effetto *plateau*.

Questi risultati di tossicità sono in accordo con l'osservazione clinica che suggerisce che la finestra terapeutica è molto stretta (Chiorazzi et al., 2009).

Gli studi *in vivo* hanno evidenziato un'elevata efficacia antitumorale degli epotiloni in genere maggiore o uguale a quella esercitata dal paclitaxel ma, in numerosi casi, la tossicità generale correlata all'uso di tale farmaco si è rilevata clinicamente rilevante. In diversi studi clinici questo ha richiesto un aumento del tempo di infusione del farmaco (Chou et al., 1998); anche nei *trial* clinici in cui è stato necessario ridurre le concentrazioni di EPO B, infatti, l'efficacia del farmaco ha continuato ad essere elevata suggerendo che l'attività farmacologica risulta essere rilevante già a concentrazioni ridotte (Altmann et al., 2000).

Dopo un primo modello effettuato nei nostri laboratori su ratti Wistar si è deciso di analizzare la tossicità dell'epotilone B su ratti Fischer che ci permetteranno, in seguito, di testare in un unico modello l'efficacia antitumorale e la neurotossicità del farmaco in esame.

Il modello *in vivo* su ratti Fischer ha messo in luce una evidente tossicità dose-dipendente, con differenze statisticamente significative nel peso corporeo tra animali trattati ed animali di controllo. L'unico gruppo trattato che non presenta variazioni significative rispetto al controllo è stato quello a concentrazione minore (0.25 mg/kg); al contrario i gruppi trattati con le dosi maggiori (1 mg/kg e 1.5 mg/kg) hanno evidenziato una mortalità del 100% dopo le prime somministrazioni. L'evidenza che la dose minore non presenti variazioni rispetto al controllo sembra essere in accordo con i dati ottenuti nel modello *in vitro* nel quale basse concentrazioni di farmaco hanno indotto una regressione di entità trascurabile della lunghezza del neurite nelle colture organotipiche di DRG. Tale risultato può anche essere correlato alla buona tollerabilità dell'epotilone B a basse dosi (Hussain et al., 2005; Calvert et al., 2001; Rubin et al., 2001).

L'analisi elettrofisiologica effettuata alla fine del trattamento ha evidenziato un calo statisticamente significativo del valore di velocità di conduzione nervosa negli animali sopravvissuti rispetto ai controlli. Come per il peso corporeo, anche il calo della velocità

di conduzione nervosa risulta essere dose-dipendente mostrando una differenza significativa tra i due gruppi di trattamento. Alla fine del periodo di 4 settimane di *follow-up* si verifica un completo recupero di tale parametro in entrambi i gruppi di trattamento. Anche in questo caso il dato può essere correlato a quanto osservato nelle colture organotipiche di DRG dove, dopo 48 ore, si ha un recupero della lunghezza dei neuriti nei DRG trattati con dosi inferiori di EPO B.

Attraverso l'indagine morfologica di sezioni di nervo sciatico si è osservata una degenerazione assonale con frequenza di comparsa delle alterazioni patologiche dose-dipendente. La presenza di tale assonopatia evidenziata tramite osservazione al microscopio ottico è confermata anche dai cambiamenti neurofisiologici e comportamentali che sono stati osservati negli animali trattati tramite la misurazione della velocità di conduzione nervosa e l'*Hot plate test*. La riduzione della densità di fibre intraepidermiche evidenziata in questo modello potrebbe risultare utile nella pratica clinica poiché la biopsia di cute, che è una procedura semplice, sembra poter essere utilizzata per valutare l'insorgenza della neuropatia periferica. Tutti questi cambiamenti osservati nel nostro modello sono in completo accordo con quanto riportato nella pratica clinica dai pazienti trattati con epotilone. Ancora una volta, alla fine del periodo di *follow-up* si osserva un completo recupero di tutti i parametri analizzati in accordo con quanto visto anche per la tossicità generale dove si è osservata una completa reversione del danno indotto dalla somministrazione di EPO B.

L'analisi morfometrica ha mostrato un aumento statisticamente significativo del valore di *g-ratio*. La *g-ratio* è un parametro relativo alle singole fibre, definito come il rapporto tra il diametro assonale ed il diametro dell'intera fibra. Da questa definizione deriva che un aumento di tale parametro può essere dovuto o ad un aumento del diametro dell'assolemma o ad una riduzione dello spessore della guaina mielinica. Nel primo caso si ipotizza la presenza di una patologia assonale mentre nel secondo caso si ipotizza una demielinizzazione. Nel nostro modello l'aumento di tale valore è dovuto ad un aumento del calibro medio dei diametri dell'assolemma suggerendo quindi che la patologia indotta in seguito alla somministrazione cronica di EPO B sia a carico dell'assone e non legata a fenomeni di demielinizzazione.

La variazione del calibro assonale e della fibra si discosta da quanto osservato nello studio di Persohn e collaboratori relativamente alla neurotossicità dei taxani. In tale studio, infatti, il valore medio della *g-ratio* nei nervi sciatici dei ratti trattati con docetaxel non ha mostrato alcuna variazione significativa rispetto ai controlli mentre la *g-ratio* dei ratti trattati con paclitaxel ha evidenziato un calo statisticamente significativo di tale valore rispetto agli animali controllo dovuto ad una atrofia degli assoni. Il dato osservato nel nostro modello è, dunque, in contrasto con quanto osservato da Persohn e con quanto è riportato in letteratura relativamente alla atrofia assonale indotta da paclitaxel (Persohn et al., 2005; Kilpatrick et al., 2001; Cavaletti et al., 1995).

L'osservazione di tale differenza tra epotilone B e taxani permette quindi di ipotizzare che tale evento sia correlato ad un meccanismo di neurotossicità da epotilone B che si discosta da quello indotto dai taxani. Pur condividendo gran parte del profilo di tossicità con il paclitaxel, dunque, è possibile supporre la presenza di un meccanismo di neurotossicità esclusivo dell'epotilone B.

Per verificare l'effetto svolto dalla somministrazione di epotilone B a livello molecolare è stata analizzata la polimerizzazione della tubulina a livello del nervo sciatico degli animali trattati rispetto agli animali controllo. Quest'analisi ha mostrato una polimerizzazione dose-dipendente della tubulina negli animali trattati ma i cambiamenti microtubulari non sono stati confermati da una analisi a livello ultrastrutturale (dato non riportato).

L'alterazione dei valori di espressione delle proteine mieliniche osservata nel nostro modello è in accordo rispetto a quanto visto in altri modelli di neurotossicità. Tale alterazione è stata evidenziata sia in neuropatie demielinizzanti che in modelli di assonopatia e quindi, nel nostro modello, può rappresentare una dimostrazione della complessa interazione che esiste tra assoni e cellule di Schwann durante il processo di insorgenza della neuropatia periferica. Questo cambiamento però non risulta essere specifico per particolari patologie e quindi non può essere direttamente correlato con gli effetti indotti in maniera specifica dalla somministrazione di epotilone B.

Anche il modello *in vitro* di neurotossicità da sagopilone è stato messo a punto somministrando dosi crescenti di farmaco a colture organotipiche di DRG estratti da

embrioni di ratti Sprague-Dawley al 15° giorno di età. Le dosi utilizzate in questo modello sono nell'ordine delle nM e questo risulta in accordo con i valori di IC₅₀ riportati in studi precedenti effettuati su diverse linee cellulari tumorali (Klar et al., 2006).

Il modello è caratterizzato, dopo 24 ore di trattamento, da una buona correlazione tra la dose di farmaco somministrata e la regressione della lunghezza media del neurite. In particolare tale regressione risulta essere dose-dipendente dal momento che la dose minore testata non evidenzia una differenza statisticamente significativa rispetto ai DRG controllo mentre le due dosi maggiori mostrano differenze significative tra loro sia dopo 24 che dopo 48 ore di trattamento. Dopo 48 ore si osserva come le differenze tra il gruppo trattato con sagopilone 100 nM e quelli trattati con concentrazioni inferiori acquistano significatività statistica maggiore.

Nel nostro modello il sagopilone è in grado di indurre una riduzione statisticamente significativa della lunghezza media del neurite quando viene trattato ad una dose di 50 nM, mentre non è in grado di indurre tale fenomeno per dosi minori di farmaco.

Questi risultati sono in accordo con uno studio sull'efficacia antitumorale del sagopilone in confronto con paclitaxel, doxorubicina e cisplatino che evidenzia che, su diverse linee cellulari tumorali, il sagopilone presenta un valore medio di IC₅₀ dell'ordine delle nanomoli (Klar et al., 2006).

Prendendo in considerazione i DRG trattati con le dosi di 50 e 100 nM la regressione media della lunghezza del neurite appare dose-dipendente e dopo 48 ore i neuriti dei diversi gruppi mostrano un ulteriore calo evidenziato anche a livello statistico. In questo modello, a differenza di quanto osservato in precedenza nel modello di EPO B, i risultati ottenuti suggeriscono quindi che l'aumento della dose risulta essere correlato ad un aumento significativo della neurotossicità.

Non essendo presenti in letteratura dati preclinici riguardanti la neurotossicità indotta da sagopilone in modelli *in vivo* si è deciso di mettere a punto due modelli preliminari volti a investigare quale sia la dose in grado di indurre l'insorgenza di neuropatia periferica nell'animale e quale sia la corretta modalità di somministrazione del farmaco in esame. Lo *step* successivo sarà, anche in questo caso, come è già stato fatto nel

modello da epotilone B, di analizzare la tossicità del sagopilone anche su ratti Fischer per sviluppare un unico modello che ci permetterà di studiare l'effetto antitumorale e la neurotossicità del farmaco in esame.

Il primo modello *in vivo* sviluppato su ratti Wistar per ricercare la massima dose tollerata di sagopilone ha messo in luce una evidente tossicità generale non dose-dipendente, con differenze statisticamente significative nel peso corporeo tra animali trattati ed animali controllo. L'unico gruppo di trattamento che non presenta variazioni significative rispetto al gruppo controllo è stato quello somministrato con la concentrazione minore (0.6 mg/kg). In tutti i casi però il farmaco è risultato essere ben tollerato non avendo registrato episodi di mortalità in nessuno dei gruppi di trattamento.

L'analisi elettrofisiologica è stata effettuata dopo 2 settimane e alla fine del periodo di trattamento; dopo due settimane si evidenzia un calo statisticamente significativo del valore di velocità di conduzione nervosa rispetto ai controlli solo negli animali trattati con la dose maggiore di sagopilone (2.4 mg/kg). Alla fine del periodo di trattamento, invece, si ha un calo di tale valore anche negli animali appartenenti ai gruppi trattati con sagopilone 1.2 mg/kg e 1.8 mg/kg. Al contrario rispetto a quanto osservato per il calo di peso corporeo, il calo della velocità di conduzione nervosa risulta essere dose-dipendente sia per tempistiche di insorgenza che per significatività.

Questo esperimento mette in luce come la dose minore testata non sia in grado di indurre né tossicità generale né neurotossicità nell'animale in accordo con quanto visto nel nostro modello *in vitro* dove la dose minore di farmaco (10 nM) non è in grado di indurre una riduzione significativa rispetto ai controlli. Al contrario si osserva che la dose maggiore testata è in grado di indurre l'insorgenza di tossicità generale e neurotossicità già dopo metà del periodo di trattamento. Per ricercare la corretta modalità di somministrazione sono, dunque, state usate solo le dosi di 1.2 mg/kg e 2.4 mg/kg testate in questo esperimento.

In questo secondo modello si conferma l'insorgenza di una tossicità generale per entrambe le dosi già a partire dal secondo trattamento con il farmaco evidenziando però che la dose minore viene maggiormente tollerata se somministrata tramite infusione di 30 minuti mentre la dose maggiore se somministrata tramite infusione di tre ore. Questo dato viene avvalorato dai primi *trial* clinici in cui il sagopilone viene somministrato tramite un'infusione di 30 minuti ogni 3 settimane. Tuttavia questa modalità di somministrazione, pur risultando meno tossica, è comunque in grado di indurre l'insorgenza di una neuropatia periferica di grado 3 (Schmidt et al., 2005; Fumoleau et al., 2007).

Come visto anche nell'esperimento precedente entrambe le dosi e tutte e tre le tempistiche di somministrazione sono in grado di indurre l'insorgenza di neurotossicità periferica dopo 4 settimane se trattati con la dose minore e già dopo 2 settimane se trattati con la dose maggiore. Alla fine del periodo di trattamento non si registrano differenze significative tra i gruppi trattati con diverse dosi e tempistiche. Sebbene non sia presente una differenza significativa tra i vari gruppi di trattamento sembrerebbe possibile evidenziare un *trend* di tossicità per cui si ha una neurotossicità maggiore quando il farmaco è somministrato in bolo rispetto a quando è somministrato tramite infusione e si ha una neurotossicità maggiore quando il farmaco è somministrato tramite infusione di 30 minuti rispetto all'infusione di tre ore (bolo > infusione 30 minuti > infusione 3 ore). Questi risultati neurofisiologici sono anche confermati dall'analisi effettuata a livello del nervo sciatico che ha evidenziato l'insorgenza di assonopatia primaria associata a degenerazione mielinica secondaria.

L'analisi istopatologica degli organi interni ha mostrato l'insorgenza di vacuolizzazioni a livello del tubulo prossimale nella corteccia renale in maniera dose-dipendente ma senza presentare differenze tra le tre diverse tempistiche di somministrazione.

Anche l'analisi ematologica-ematochimica pur evidenziando variazioni rispetto agli animali controllo per quanto riguarda la conta dei globuli rossi, dei globuli bianchi, del valore di emoglobina e di ematocrito non mette in luce differenze significative tra le tre diverse modalità di somministrazione. Nei *trial* clinici si vede come nel siero il farmaco presenti, dopo la fine del trattamento, una rapida diminuzione associata a un rapido

uptake tissutale; si verifica però, in seguito, un lento accumulo a livello serico associato a un lento rilascio del farmaco da parte dei tessuti (Arnold et al., 2009).

Come osservato nel modello di EPO B, anche in questo caso l'analisi morfometrica ha mostrato un aumento statisticamente significativo del valore di *g-ratio* dovuto ad un aumento del calibro medio dei diametri dell'assolemma suggerendo quindi che la patologia indotta in seguito alla somministrazione cronica di sagopilone sia a carico dell'assone e non legata a fenomeni di demielinizzazione.

Come già discusso per l'epotilone B la variazione del calibro assonale e della fibra si discosta da quanto osservato nello studio di Persohn e collaboratori relativamente alla neurotossicità dei taxani dove si registra un calo del valore di *g-ratio* nei ratti trattati con paclitaxel dovuto ad una atrofia degli assoni. Il dato osservato nei nostri modelli di epotiloni è dunque in contrasto con quanto osservato da Persohn e con quanto è riportato in letteratura relativamente alla atrofia assonale indotta da paclitaxel (Persohn et al., 2005; Kilpatrick et al., 2001; Cavaletti et al., 1995).

L'osservazione di tale differenza anche nel modello *in vivo* da sagopilone permette, quindi, di avvalorare l'ipotesi già precedentemente discussa per cui potrebbe essere presente un diverso meccanismo di neurotossicità da epotiloni che si discosta da quello indotto dai taxani.

Per verificare l'effetto svolto dalla somministrazione di sagopilone a livello molecolare è stata analizzata la polimerizzazione della tubulina nei nervi sciatici degli animali trattati con la dose maggiore di sagopilone rispetto agli animali controllo. Quest'analisi ha mostrato un aumento del valore di polimerizzazione della tubulina negli animali trattati.

Questi modelli *in vivo* hanno quindi permesso di effettuare un confronto tra il profilo tossicologico degli epotiloni naturali e sintetici e rispetto ai comuni antitubulinici utilizzati indicando come la tossicità generale e quella a carico della velocità di conduzione nervosa siano ampiamente sovrapponibili. Questi modelli hanno però permesso di evidenziare come gli epotiloni, sia naturali che sintetici, inducano una patologia assonale di tipo differente rispetto a quella correlata alla somministrazione di paclitaxel.

Quest'ultima affermazione è stata messa in luce dall'osservazione, in entrambi i modelli, di un aumento del calibro medio dei diametri assonali indotto dalla somministrazione dei due diversi farmaci.

L'osservazione di un possibile diverso meccanismo di tossicità rispetto al paclitaxel lascia, quindi, aperto un nuovo campo di studio per poter comprendere meglio quale sia il meccanismo d'azione dei due antitubulinici presi in esame.

Abbreviazioni

ALT	Alanina aminotransferasi
Ara-C	Citosina arabinoside
AST	Aspartato aminotransferasi
AUC	Area sotto la curva
BMS-247550	ixabepilone
CIDP	Poliradicolonevrite infiammatoria demielinizzante cronica
CIPN	Neuropatia periferica indotta da chemioterapici
C _{max}	Concentrazione media del farmaco
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CTRL	Animali controllo
DMSO	Dimetilsulfossido
DNA	Acido desossiribonucleico
EAN	Neuriti Sperimentali Autoimmuni
EPO A	epotilone A
EPO B	epotilone B
EPO D	epotilone D
GTP	Guanidina tri-fosfato
iv	Somministrazione endovenosa
MAG	Glicoproteina associata alla mielina
MAL	Proteina mielinica e linfocitica
MAP	Proteine Associate ai Microtubuli
MBP	Proteina base della mielina
MDR	<i>Multi Drug Resistent</i>
MED	Minima dose efficace
MTD	Massima dose tollerata
NF	Neuro filamenti
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NT-3	<i>Neurotrophin-3</i>

P0	Glicoproteina zero
pb	Paia di basi
Pgp	Glicoproteina-P
PMP22	Proteina mielinica periferica 22
RNA	Acido ribonucleico
SGB	Sindrome di Guillain-Barrè
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SNP	Sistema Nervoso Periferico
VDC	Velocità di conduzione nervosa
ZK-EPO	sagopilone

Bibliografia

1. Adam A.M., Atkinson P.F., Hall S.M., Hughes R.A., Taylor W.A. Chronic experimental allergic neuritis in Lewis rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1989;15(3):249-264.
2. Aghajanian C., Burris H.A. 3rd, Jones S., Spriggs D.R., Cohen M.B., Peck R., Sabbatini P., Hensley M.L., Greco F.A., Dupont J., O'Connor O.A. Phase I study of the novel epothilone analog ixabepilone (BMS-247550) in patients with advanced solid tumors and lymphomas. *J. Clin. Oncol.*, 2007;25(9):1082-1088.
3. Altmann K.H. Recent developments in the chemical biology of epothilones. *Curr. Pharm. Des.*, 2005;11(13):1595-1613.
4. Altmann K.H., Pfeiffer B., Arseniyadis S., Pratt B. A., Nicolaou K.C. The chemistry and biology of epothilones--the wheel keeps turning. *Chem. Med. Chem.*, 2007;2(4):396-423.
5. Altmann K.H., Wartmann M., O'Reilly T. Epothilones and related structures--a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2000;1470(3):M79-91.
6. Argyriou, AA; Chroni, E; Koutras, A; Ellul, J; Papapetropoulos, S; Katsoulas, G; Iconomou, G; Kalofonos, HP. Vitamin E for prophylaxis against chemotherapy-induced neuropathy: a randomized controlled trial. *Neurology*, 2005 64, 26–31.
7. Argyriou, AA; Chroni, E; Koutras, A; Iconomou, G; Papapetropoulos, S; Polychronopoulos, P; Kalofonos, HP. Preventing paclitaxel-induced peripheral neuropathy: a phase II trial of vitamin E supplementation. *J. Pain Symptom Manage*, 2006 32, 237–244.

8. Arnold D., Voigt W., Kiewe P., Behrmann C., Lindemann S., Reif S., Wiesinger H., Giurescu M., Thiel E., Schmoll H.J. Weekly administration of sagopilone (ZK-EPO). A fully synthetic epothilone, in patients with refractory solid tumours: results of a phase I trial. *Br. J. Cancer*, 2009;101(8):1241-1247.
9. Arslanian R.L., Tang L., Blough S., Ma W., Qiu R.G., Katz L., Carney J.R. A new cytotoxic epothilone from modified polyketide synthases heterologously expressed in *Myxococcus xanthus*. *J. Nat. Prod.*, 2002;65(7):1061-1064.
10. Attalla H., Westberg J.A., Andersson L.C., Adlercreutz H., Mäkelä T.P. 2-Methoxyestradiol-induced phosphorylation of Bcl-2: uncoupling from JNK/SAPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998;247(3):616-619.
11. Authier N., Gillet J.P., Fialip J., Eschalier A., Coudore F. Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain Res.*, 2000;887(2):239-249.
12. Basu A., Haldar S. Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein. *Int. J. Oncol.*, 1998;13(4):659-664.
13. Bhalla K.N. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene*, 2003;22(56):9075-9086.
14. Bianchi G., Vitali G., Caraceni A., Ravaglia S., Capri G., Cundari S., Zanna C., Gianni L. Symptomatic and neurophysiological responses of paclitaxel- or cisplatin-induced neuropathy to oral acetyl-L-carnitine. *Eur. J. Cancer*, 2005; 41(12):1746-1750.

15. Bianchi R., Gilardini A., Rodriguez-Menendez V., Oggioni N., Canta A., Colombo T., De Michele G., Martone S., Sfacteria A., Piedemonte G., Grasso G., Beccaglia P., Ghezzi P., D'Incalci M., Lauria G., Cavaletti G. Cisplatin-induced peripheral neuropathy: neuroprotection by erythropoietin without affecting tumour growth. *Eur. J. Cancer*, 2007;43(4):710-717.
16. Blum W., Aichholz R., Ramstein P., Kühnöl J., Brügggen J., O'Reilly T., Flörsheimer A. In vivo metabolism of epothilone B in tumor-bearing nude mice: identification of three new epothilone B metabolites by capillary high-pressure liquid chromatography/mass spectrometry/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2001;15(1):41-49.
17. Bollag D.M., McQueney P.A., Zhu J., Hensens O., Koupal L., Liesch J., Goetz M., Lazarides E., Woods C.M. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.*, 1995;55(11):2325-2333.
18. Calvert P.M., O'Neill V., Twelves C. A phase I and pharmacokinetic study of EPO906 (epothilone B), given every three weeks, in patients with advanced solid tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2001; 20:108a.
19. Canta A., Chiorazzi A., Cavaletti G. Tubulin: a target for antineoplastic drugs into the cancer cells but also in the peripheral nervous system. *Curr. Med. Chem.*, 2009;16(11):1315-1324.
20. Cardoso F., de Azambuja E., Lago L.D. Current perspectives of epothilones in breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 2008;44(3):341-352.
21. Carlomagno T., Blommers M.J., Meiler J., Jahnke W., Schupp T., Petersen F., Schinzer D., Altmann K.H., Griesinger C. The high-resolution solution structure of epothilone A bound to tubulin: an understanding of the structure-activity relationships for a powerful class of antitumor agents. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2003;42(22):2511-2515.

22. Castro M.A., Klamt F., Grieneisen V.A., Grivicich I., Moreira J.C. Gompertzian growth pattern correlated with phenotypic organization of colon carcinoma, malignant glioma and non-small cell lung carcinoma cell lines. *Cell Prolif.*, 2003; 36:65-73.
23. 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;18:137-145.
24. Cavaletti G., Cavalletti E., Oggioni N., Sottani C., Minoia C., D'Incalci M., Zucchetti M., Marmioli P., Tredici G. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. *Neurotoxicology*, 2000;21:389-394.
25. Cavaletti G., Petruccioli M.G., Marmioli P., Rigolio R., Galbiati S., Zoia C., Ferrarese C., Tagliabue E., Dolci C., Bayssas M., Griffon Etienne G., Tredici G. Circulating nerve growth factor level changes during oxaliplatin treatment-induced neurotoxicity in the rat. *Anticancer Res.*, 2002;22(6C):4199-4204.
26. Cavaletti G., Tredici G., Braga M., Tazzari S. Experimental peripheral neuropathy induced in adult rats by repeated intraperitoneal administration of taxol. *Exp. Neurol.*, 1995;133(1):64-72.
27. Chen J.G., Horwitz S.B. Differential mitotic responses to microtubule-stabilizing and -destabilizing drugs. *Cancer Res.*, 2002;62(7):1935-1938.
28. Cheng K.L., Bradley T., Budman D.R. Novel microtubule-targeting agents – the epothilones. *Biologics: Targets & Therapy*, 2008;2(4):789-811.

29. Chiorazzi A., Nicolini G., Canta A., Oggioni N., Rigolio R., Cossa G., Lombardi R., Roglio I., Cervellini I., Lauria G., Melcangi R. C., Bianchi R., Crippa D., Cavaletti G. Experimental epothilone B neurotoxicity: results of in vitro and in vivo studies. *Neurobiol. Dis.*, 2009;35(2):270-277.
30. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 1987;162(1):156-159.
31. Chou T.C., O'Connor O.A., Tong W.P., Guan Y., Zhang Z.G., Stachel S.J., Lee C., Danishefsky S.J. The synthesis, discovery, and development of a highly promising class of microtubule stabilization agents: curative effects of desoxyepothilones B and F against tumor xenografts in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001;98(14):8113-8118.
32. Chou T.C., Zhang X.G., Harris C.R., Kuduk S.D., Balog A., Savin K.A., Bertino J.R., Danishefsky S.J. Desoxyepothilone B is curative against human tumor xenografts that are refractory to paclitaxel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998;95(26):15798-15802.
33. Cortes J., Baselga J. Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: the epothilones. *Oncologist.*, 2007;12(3):271-280.
34. Eddy N.B., Touchberry C.F., Lieberman J.E. Synthetic analgesics; methadone isomers and derivatives. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1950;98(2):121-137.
35. Flatters, SJ; Xiao, WH; Bennett, GJ. Acetyl-L-carnitine prevents and reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy. *Neurosci. Lett.*, 2006 397,219-223.
36. Fornier M.N. Ixabepilone, first in a new class of antineoplastic agents: the natural epothilones and their analogues. *Clin. Breast Cancer*, 2007;7(10):757-763.

37. Fumoleau P., Coudert B., Isambert N., Ferrant E. Novel tubulin-targeting agents: anticancer activity and pharmacologic profile of epothilones and related analogues. *Ann. Oncol.*, 2007;18 Suppl 5:v9-15.
38. Galluzzi L., Zamzami N., de La Motte Rouge T., Lemaire C., Brenner C., Kroemer G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis*, 2007;12(5):803-813.
39. Gerth K., Bedorf N., Höfle G., Irschik H., Reichenbach H. Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.*, 1996;49(6):560-563.
40. Giannakakou P., Gussio R., Nogales E., Downing K.H., Zaharevitz D., Bollbuck B., Poy G., Sackett D., Nicolaou K.C., Fojo T. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000;97(6):2904-2909.
41. Giannakakou P., Sackett D.L., Kang Y.K., Zhan Z., Buters J.T., Fojo T., Poruchynsky M.S. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J. Biol. Chem.*, 1997;272(27):17118-17125.
42. Goodin S., Kane M.P., Rubin E.H. Epothilones: mechanism of action and biologic activity. *J. Clin. Oncol.*, 2004;22(10):2015-2025.
43. Haldar S., Jena N., Croce C.M. Inactivation of bcl-2 by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;92:4507.
44. Hardt I.H., Steinmetz H., Gerth K., Sasse F., Reichenbach H., Höfle G. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains Soce90/B2 and Soce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J Nat. Prod.*, 2001;64(7):847-856.

45. Hoffmann J., Fichtner I., Lemm M., Lienau P., Hess-Stumpp H., Rotgeri A., Hofmann B., Klar U. Sagopilone crosses the blood-brain barrier in vivo to inhibit brain tumor growth and metastases. *Neuro Oncol.*, 2009;11(2):158-166.
46. Hoffmann J., Vitale I., Buchmann B., Galluzzi L., Schwede W., Senovilla L., Skuballa W., Vivet S., Lichtner R.B., Vicencio J M., Panaretakis T., Siemeister G., Lage H., Nanty L., Hammer S., Mittelstaedt K., Winsel S., Eschenbrenner J., Castedo M., Demarche C., Klar U., Kroemer G. Improved cellular pharmacokinetics and pharmacodynamics underlie the wide anticancer activity of sagopilone. *Cancer Res.*, 2008;68(13):5301-5308.
47. Hofle G., Bedorf N., Gerth K., Reichenbach H. DE 4138042, 1993 [Chem. Abstr. 1994, 120, 52841]
48. Hofle G., Bedorf N., Steinmetz H., Schomburg D., Gerth K., Reichenbach H. *Angew. Chem.*, 1996;108:1671; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996;35:1567.
49. Hussain M., Tangen C.M., Lara P.N. Jr, Vaishampayan U.N., Petrylak D.P., Colevas A.D., Sakr W.A., Crawford E.D. and Southwest Oncology Group. Ixabepilone (epothilone B analogue BMS-247550) is active in chemotherapy-naive patients with hormone-refractory prostate cancer: a Southwest Oncology Group trial S0111. *J. Clin. Oncol.*, 2005;23(34):8724-8729.
50. Jordan M.A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2002;2(1):1-17.
51. Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 2004;4:253-265.

52. Kilpatrick T.J., Phan S., Reardon K., Lopes E.C., Cheema S.S. Leukaemia inhibitory factor abrogates Paclitaxel-induced axonal atrophy in the Wistar rat. *Brain Res.*, 2001;911(2):163-167.
53. Klar U., Buchmann B., Schwede W., Skuballa W., Hoffmann J., Lichtner R.B. Total synthesis and antitumor activity of ZK-EPO: the first fully synthetic epothilone in clinical development. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2006;45(47):7942-7948.
54. Kowalski R.J., Giannakakou P., Hamel E. Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol®). *J. Biol. Chem.*, 1997;272(4):2534-2541.
55. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.*, 2007;87(1):99-163.
56. Kuwabara S. Shortened refractory periods in Human diabetic neuropathy. *Clin. Neurophysiol.*, 2003; 114:169-170.
57. Lauria G., Lombardi R., Borgna M., Penza P., Bianchi R., Savino C., Canta A., Nicolini G., Marmiroli P., Cavaletti G. Intraepidermal nerve fiber density in rat foot pad: neuropathologic-neurophysiologic correlation. *J. Peripher. Nerv. Syst.*, 2005;10(2):202-208.
58. Lee F.Y., Borzilleri R., Fairchild C.R., Kim S.H., Long B.H., Reventos-Suarez C., Vite G.D., Rose W.C., Kramer R.A. BMS-247550: a novel epothilone analog with a mode of action similar to paclitaxel but possessing superior antitumor efficacy. *Clin. Cancer Res.*, 2001;7(5):1429-1437.
59. Lee J.J., Low J.A., Croarkin E., Parks R., Berman A.W., Mannan N., Steinberg S.M., Swain S.M. Changes in neurologic function tests may predict neurotoxicity caused by ixabepilone. *J. Clin. Oncol.*, 2006;24(13):2084-2091.

60. Lichtner R.B., Rotgeri A., Bunte T., Buchmann B., Hoffmann J., Schwede W., Skuballa W., Klar U. Subcellular distribution of epothilones in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001;98(20):11743-11748.
61. Maestri A., De Pasquale Ceratti A., Cundari S., Zanna C., Cortesi E., Crinò L. A pilot study on the effect of acetyl-L-carnitine in paclitaxel- and cisplatin-induced peripheral neuropathy. *Tumori*, 2005;91(2):135-138.
62. Maggioni, D; Nicolini, G; Chiorazzi, A; Meregalli, C; Cavaletti, G; Tredici, G. Different effect of Erythropoietin in cisplatin and docetaxel-induced neurotoxicity: an in vitro study. *Journal of Neurosc. Res.*, in press.
63. Manfredi J.J., Horwitz S.B. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmac. Ther.*, 1984;25:83-125.
64. Mani S., McDaid H., Hamilton A., Hochster H., Cohen M.B., Khabelle D., Griffin T., Lebowitz D.E., Liebes L., Muggia F., Horwitz S.B. Phase I clinical and pharmacokinetic study of BMS-247550, a novel derivative of epothilone B, in solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2004;10(4):1289-1298.
65. Martini R. Animal models for inherited peripheral neuropathies: chances to find treatment strategies? *J. Neurosci. Res.*, 2000;61:244-250.
66. Maurer M., Toyka K.V., Gold R. Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies. *Rev. Neural.*, 2002;158:S7-15.
67. Meier T., Meyer M. Peripheral neuropathy with monoclonal gammopathy. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1990; 120:417-425.
68. Melli, G; Taiana, M; Camozzi, F; Triolo, D; Podini, P; Quattrini, A; Taroni, F; Lauria, G. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp. Neurol.*, 2008 214, 276-284.

69. Monforte R., Estruch R., Valls-Sole J., Nicolas J., Villalta J., Urbano-Marquez A. Autonomic and peripheral neuropathies in patients with chronic alcoholism. A dose-related toxic effect of alcohol. *Arch. Neurol.*, 1995; 52:45-51.
70. Nettles J.H., Li H., Cornett B., Krahn J.M., Snyder J.P., Downing K.H. The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science*, 2004;305(5685):866-869.
71. Nobbio L., Mancardi G., Grandis M., Levi G., Suter U., Nave K.A., Windebank A.J., Abbruzzese M., Schenone A. PMP22 transgenic dorsal root ganglia cultures show myelin abnormalities similar to those of human CMT1A. *Ann. Neurol.*, 2001;50(1):47-55.
72. Ojima I., Chakravarty S., Inoue T., Lin S., He L., Horwitz S.B., Kuduk S.D., Danishefsky S.J. A common pharmacophore for cytotoxic natural products that stabilize microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1999; 96(8):4256-4261.
73. O'Reilly T., Wartmann M., Brueggen J., Allegrini P.R., Floersheimer A., Maira M., McSheehy P.M. Pharmacokinetic profile of the microtubule stabilizer patupilone in tumor-bearing rodents and comparison of anti-cancer activity with other MTS in vitro and in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2008;62(6):1045-1054.
74. Peltier A.C., Russell J.W. Recent advances in drug-induced neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, 2002; 15:633-638.
75. Persohn E., Canta A., Schoepfer S., Traebert M., Mueller L., Gilardini A., Galbiati S., Nicolini G., Scuteri A., Lanzani F., Giussani G., Cavaletti G. Morphological and morphometric analysis of paclitaxel and docetaxel-induced peripheral neuropathy in rats. *Eur. J. Cancer*, 2005;41(10):1460-1466.

76. Rubin E.H., Rothermel J., Tesfaye F., Chen T., Hubert M., Ho Y.Y., Hsu C.H., Oza A.M. Phase I dose-finding study of weekly single-agent patupilone in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2005;23(36):9120-9129.
77. Rubin E.H., Siu L.L., Beers S. A phase I and pharmacologic trial of weekly epothilone B in patients with advanced malignancies. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2001;20:68a.
78. Sancho S., Magyar J.P., Aguzzi A., Suter U. Distal axonopathy in peripheral nerves of PMP22-mutant mice. *Brain*, 1999;122(Pt 8):1563-1577.
79. Schenone A., Zicca A., Cadoni A. Terapia del danno assonale nelle neuropatie periferiche. *Neurol. Sci.*, 2005;26:S305-308.
80. Schmidt P., Klewe P., Kuehnhardt D. A phase I study of the novel third generation epothilone ZK-EPO in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23(16s):147s.
81. Schmidt P., Kiewe P., Possinger K., Korfel A., Lindemann S., Giurescu M., Reif S., Wiesinger H., Thiel E., Kühnhardt D. Phase I study of the novel, fully synthetic epothilone sagopilone (ZK-EPO) in patients with solid tumors. *Ann. Oncol.*, 2010;21(3):633-639. Epub 2009 Oct 30.
82. Schmidt, Y; Unger, JW; Bartke, I; Reiter, R. Effect of nerve growth factor on peptide neurons in dorsal root ganglia after taxol or cisplatin treatment and in diabetic (db/db) mice. *Exp. Neurol.*, 1995 132, 16-23.
83. Scuteri A., Nicolini G., Miloso M., Bossi M., Cavaletti G., Windebank A.J., Tredici G. Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer Res.*, 2006;26(2A):1065-1070.

84. Sepp-Lorenzino L., Balog A., Su D.S., Meng D., Timaul N., Scher H.I., Danishefsky S.J., Rosen N. The microtubule-stabilizing agents epothilones A and B and their desoxy-derivatives induce mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 1999;2(1):41-52.
85. Snodgrass S.R. Vitamin neurotoxicity. *Mol. Neurobiol.*, 1992; 6:41-73.
86. Starks C.M., Zhou Y., Liu F., Licari P.J. Isolation and characterization of new epothilone analogues from recombinant *Myxococcus xanthus* fermentations. *J. Nat. Prod.*, 2003;66(10):1313-1317.
87. Strube A., Hoffmann J., Stepina E., Hauff P., Klar U., Käkönen S.M. Sagopilone inhibits breast cancer bone metastasis and bone destruction due to simultaneous inhibition of both tumor growth and bone resorption. *Clin. Cancer Res.*, 2009;15(11):3751-3759.
88. Tang L., Chung L., Carney J.R., Starks C.M., Licari P., Katz L. Generation of new epothilones by genetic engineering of a polyketide synthase in *Myxococcus xanthus*. *J. Antibiot.*, 2005;58(3):178-184.
89. Tasaki I. *Physiology and electrochemistry on nerve fibers*. 1982, Academic Press, New York, NY.
90. Walsh C.T., O'Connor S.E., Schneider T.L. Polyketide-nonribosomal peptide epothilone antitumor agents: the EpoA, B, C subunits. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2003;30(8):448-455.
91. Wang L.G., Liu X.M., Kreis W., Budman D.R. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1999;44:355-361.

92. Wartmann M., Altmann K.H. The biology and medicinal chemistry of epothilones. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2002;2(1):123-148.
93. Warzoc R., Wattig B. Systematic classification of the disorders of the peripheral nervous system. *Zentralbl Allg Pathol.*, 1990; 136:478-491.
94. Watkins E.B., Chittiboyina A.G., Jung J.C., Avery M.A. The epothilones and related analogues-a review of their syntheses and anti-cancer activities. *Curr. Pharm. Des.*, 2005;11(13):1615-1653.
95. Whitehead R.P., McCoy S., Rivkin S.E., Gross H.M., Conrad M.E., Doolittle G.C., Wolff R.A., Goodwin J.W., Dakhil S.R., Abbruzzese J.L. A Phase II trial of epothilone B analogue BMS-247550 (NSC#710428) ixabepilone, in patients with advanced pancreas cancer: a Southwest Oncology Group study. *Invest. New Drugs*, 2006;24(6):515-520.
96. Yemisci M., Bozdog S., Cetin M., Söylemezoglu F., Capan Y., Dalkara T., Vural I. Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *Neurosurgery*, 2006;59(6):1296-1302; discussion 1302-1303.

Ringraziamenti

Per ultima cosa ma non perché sia la meno importante è arrivato il momento dei ringraziamenti... i miei ringraziamenti più "seri" vanno al prof. Tredici e al prof. Cavaletti che in questi tre anni mi hanno dato la possibilità di crescere dal punto di vista lavorativo e sono riusciti a trasmettermi l'amore per questo lavoro ma anche la voglia di farmi sentire a mio agio nel loro ambiente...

Un grazie molto speciale va allo stupendo gruppo di persone con cui lavoro tutti i giorni gomito a gomito Norberto, Annalisa, Valentina, Cristina e Barbara... in questi anni per me sono stati colleghi ma soprattutto amici... per me sono stati fondamentali per vivere al meglio questa esperienza...e loro sono stati capaci di sopportare ogni mio umore...

Un grazie va anche a tutte le persone del DNTB che sono state capaci di vivere con me i giorni un po' bui e i giorni più divertenti di questi tre anni... riuscendo sempre a farmi sentire "a casa"... grazie a Cecilia, Gabriella, Roberta, Dana, Virginia, Mario, Elisabetta, Arianna, Juliana, Cristina, Elisa, Silvia, Mila e Daniele...

I ringraziamenti più speciali però vanno al di fuori del laboratorio... alla mia famiglia... la mia mamma, il mio papà, mio fratello, mia sorella, mio cognato e il mio piccolo Riky... che hanno sempre creduto in me e mi hanno sempre sostenuta in questi anni... condividendo i momenti belli e dandomi la forza di non arrendermi nei momenti meno belli... con la loro vicinanza e la loro pazienza hanno contribuito a farmi diventare quella che sono e sono riusciti a darmi una mano per costruire insieme a me il mio "futuro"...

Un ultimo grazie non meno importante va a tutte le mie amiche e a tutti i miei amici... quelli che mi hanno seguita in questo percorso vivendolo con me... e quelli che magari non sanno molto ma che anche inconsapevolmente, mi hanno aiutata, con tanti discorsi, a vivere al meglio ciò che mi succedeva...