

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO**

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA**

**TESI DI LAUREA**

**NEUROTOSSICITÀ E NEUROPATIE PERIFERICHE  
INDOTTE DALLA CHEMIOTERAPIA: METODI  
DIAGNOSTICI DI RILEVAZIONE E STRATEGIE  
TERAPEUTICHE**

**RELATORE: Chiar.ma Prof.ssa Rocchina Lucia Colucci**

**LAUREANDO: Lorenzo Degan**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**

## INDICE

1- RICERCA E SVILUPPO DI UN FARMACO: PRINCIPI GENERALI.....	2
2- SVILUPPO DI UN FARMACO ENEUROTOSSICITA' .....	5
3- METODI DI RILEVAZIONE DELLA NEUROTOSSICITA' .....	6
3.1- Modelli in vitro.....	6
3.2- Modelli pre-clinici.....	8
3.3- Misure elettrofisiologiche e istologiche.....	10
3.4- Rilevazione della neurotossicità in ambito clinico.....	12
3.5- Biomarcatori fluid-based.....	17
3.5.1- Tecniche di Imaging.....	20
3.5.2- Identificazione di un biomarcatore di tossicità.....	21
3.6- Biomarcatori plasmatici.....	22
4- TIPOLOGIE DI MECCANISMI DI NEUROTOSSICITA' E TIPOLOGIE DI NEUROTOSSICITA' .....	27
5- NEUROPATIA PERIFERICA DA CHEMIOTERAPIA: FATTORI DI RISCHIO E FARMACI CHEMIOTERAPICI.....	29
6- PREVENZIONE E TRATTAMENTO DEGLI EFFETTI NEUROPERIFERICI DELLA CHEMIOTERAPIA.....	32
7- NEUROTOSSICITA' DA COMPOSTI DEL PLATINO.....	37
7.1- Trattamento della neuropatia periferica da composti del platino.....	41
8-NEUROTOSSICITA' DA TAXANI.....	55
8.1- Trattamento della neuropatia periferica da taxani.....	58
9- NEUROTOSSICITA' DA ALCALOIDI DELLA VINCA.....	72
9.1- Trattamento della neurotossicità da alcaloidi della vinca.....	74
10-NEUROTOSSICITA' DA INIBITORI DEL PROTEASOMA.....	88
10.1- Trattamento della neurotossicità da inibitori del proteasoma.....	91
11-NEUROPATIA PERIFERICA: EFFETTI NEUROLOGICI DELL'IMMUNOTERAPIA ANTICANCRO.....	103
12-RUOLO DEI TRASPORTATORI DEI FARMACI NELLA NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA CHEMIOTERAPIA.....	108
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	115

## CAPITOLO 1

### **RICERCA E SVILUPPO DI UN FARMACO: PRINCIPI GENERALI**

Lo sviluppo di un farmaco trae origine dalla ricerca e dall'indagine di un grande numero di piccole molecole che vengono analizzate in base alla loro affinità chimico-fisica per il target molecolare responsabile della patogenesi, della progressione di una malattia o dall'alterazione fisiologica di recettori, enzimi e proteine di membrana. Una volta che il target è stato identificato, si procede con uno screening delle molecole candidate per selezionare quelle che possiedono i parametri ottimali come potenza, selettività, solubilità e ripartizione (Walker et al,2018).

#### **Target Safety Assessment**

Uno step importante in questa fase è definito dal “*target safety assessment*”, che rappresenta un processo di valutazione della sicurezza del bersaglio farmacologico necessario per caratterizzare i potenziali effetti collaterali che possono essere causati dall'attivazione o inibizione del target. Inoltre, grazie alle conoscenze fornite dalla farmacogenetica, è possibile analizzare le variazioni genetiche nei geni che codificano per il bersaglio e per gli enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci, con l'obiettivo di predire se il paziente potrà andare incontro a effetti collaterali gravi dovuti all'accumulo di metaboliti oppure, nel caso contrario, alla inefficacia terapeutica dovuta all'inattivazione del pro-farmaco a farmaco con conseguente ridotta metabolizzazione del farmaco e conseguente accumulo nell'organismo (Walker et al, 2018).

Alla fine della prima fase, verrà selezionata una sola molecola che potrà essere utilizzata nella prosecuzione delle altre fasi di sviluppo del farmaco. Terminata questa fase, vengono eseguiti dei saggi di valutazione della molecola tramite colture cellulari del tessuto bersaglio (test in vitro), con il compito di analizzare la risposta delle cellule in vitro in presenza della molecola (Walker et al, 2018). Successivamente la molecola verrà valutata nella fase definita **pre-clinica**, attraverso l'utilizzo dei modelli sperimentali animali per determinate patologie, in modo da definire un profilo di efficacia e sicurezza della nuova molecola nell'animale tale da permetterne la prosecuzione alle fasi successive dello sviluppo del farmaco. Se l'utilizzo della molecola negli animali da risultati idonei a proseguire la sperimentazione, il passo successivo è rappresentato dalla **sperimentazione clinica**, ovvero nella specie umana. La sperimentazione clinica è divisa in 4 fasi (Walker et al, 2018).

## **Fase 1**

La maggior parte degli studi clinici di fase 1 sono condotti su soggetti volontari sani, in genere 10, per stabilire le caratteristiche base di un farmaco ovvero analizzando:

- i parametri farmacocinetici,
- la tollerabilità,
- la conferma del meccanismo d'azione della nuova molecola

In questa fase è fondamentale definire l'efficacia (Walker et al, 2018). Per patologie gravemente invalidanti, come ad esempio nelle patologie neoplastiche, i soggetti da analizzare non saranno dei volontari sani ma i pazienti affetti dal tumore nei confronti dei quali si vuole definire una nuova molecola efficace

## **Fase 2**

In questa fase sono arruolati mediamente un gruppo di 200-500 pazienti e vengono definiti con maggior precisione non solo i parametri farmacocinetici, ma anche e soprattutto i parametri biologici quantitativi per fornire dei dati sull'efficacia, la dose che verrà utilizzata nelle fasi successive le potenziali interazioni tra farmaci. In questa fase comunque gli sperimentatori non sono ancora in grado di definire se la nuova molecola possa essere efficace o meno (Walker et al, 2018).

## **Fase 3**

La fase 3 studia una coorte di circa 1000 pazienti ed è quella che attribuirà se il nuovo farmaco è efficace attraverso la **randomizzazione dei pazienti** divisi in 2 gruppi:

- pazienti che riceveranno la molecola oggetto di studio
- pazienti che riceveranno solamente il placebo

Questi studi vengono condotti o in doppio cieco per eliminare ogni potenziale intervento esterno in grado di danneggiare, alterare o interferire con il risultato della sperimentazione, arrivando così a determinare i soggetti guariti dalla malattia o che possono trarre beneficio da un miglioramento della condizione patologica, rispetto ai soggetti non guariti, con l'obiettivo di ottenere un profilo di efficacia e sicurezza del farmaco (Walker et al, 2018).

Se il farmaco supera tutte queste fasi finora elencate, sarà autorizzato all'immissione in commercio e quindi potrà essere registrato.

#### **Fase 4**

Una volta che il farmaco viene registrato, si prosegue con la fase 4, consistente nel monitoraggio post-*marketing* di tutti gli aspetti che rientrano nell'ambito della sicurezza, come l'eventuale insorgenza di effetti collaterali gravi, che se presenti in elevata frequenza e in un nesso causale e temporale all'utilizzo del farmaco, possono indurre le autorità a disporre il ritiro dal commercio (Walker et al, 2018).

## CAPITOLO 2

### SVILUPPO DI UN FARMACO E NEUROTOSSICITA'

Le complicazioni correlate alla sicurezza di una molecola in fase di sperimentazione, sono una problematica di interesse rilevante nella ricerca e nello sviluppo di un farmaco. La ragione più frequente responsabile del fallimento nello sviluppo di un farmaco è il rischio cardiovascolare, anche se la neurotossicità è un problema predominante (Cook et al, 2014). La neurotossicità è responsabile della maggior parte dei fallimenti nelle sperimentazioni cliniche e questo determina conseguenze invalidanti in termini di risorse e sicurezza dei pazienti.

I fallimenti durante i test tossicologici eseguiti secondo le norme GLP (*Good Laboratory Practices*) mostrano che la neurotossicità non è molto frequente (Figura 1a), ma i fallimenti dovuti alla manifestazione degli effetti avversi in tutte le fasi di sviluppo hanno dimostrato che la neurotossicità è responsabile di circa il 25% dei fallimenti sperimentali ed è frequente anche nelle aree terapeutiche cardiovascolare e gastrointestinale (Figura 2b, 2d). Inoltre, gli effetti collaterali neurotossici vengono rilevati più facilmente durante i trials clinici rispetto alla fase preclinica (Figura 2c) (Cook et al, 2018).

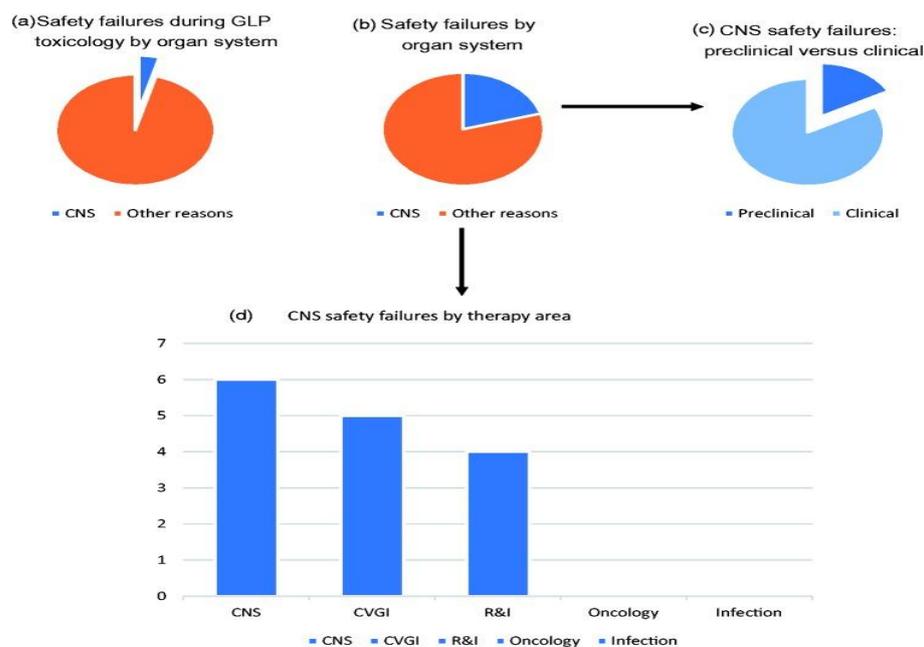


Figura 1: Illustrazione dei fattori che contribuiscono all'interruzione dello sviluppo farmacologico (Cook et al, 2018).

## CAPITOLO 3

### METODI DI RILEVAZIONE DELLA NEUROTOSSICITA'

#### 3.1 Modelli *in vitro*

Nell'ambito della rilevazione dei meccanismi alla base della neurotossicità, lo sviluppo di modelli *in vitro* appropriati può contribuire a comprendere la patogenesi di una neuropatia da chemioterapia e per identificare quelli che possono essere degli interventi terapeutici (Eldridge et al, 2020; Hoke, 2012; Jones et al, 2018). La neuropatia da chemioterapia è una condizione clinica che deriva dalla somma di diversi meccanismi d'azione condivisi da più farmaci, e per questo motivo, la scelta di un modello *in vitro* dovrebbe sempre considerare le tipologie di farmaci utilizzati in terapia.

Negli anni sono stati sviluppati molti modelli *in vitro*. Agli inizi vennero impiegate colture composte da una linea cellulare di neuroni, costituita da colture primarie ed organotipiche di DRG, differenziata in seguito in fenotipi neuronali maturi che rappresentavano il target principale della maggior parte dei farmaci (Sandy Eldridge et al, 2021). Queste colture cellulari sono state usate per rigenerare le caratteristiche fisiopatologiche della neuropatia periferica e della degenerazione assonale e per comprendere i meccanismi alla base della CIPN (Ferrier et al, 2013; Fehrenbacher, 2015).

Uno degli effetti più evidenti dei farmaci neurotossici nei modelli DRG è la riduzione della lunghezza delle fibre nervose. Tuttavia le colture primarie erano limitate da una mancanza intrinseca di riproducibilità e standardizzazione e i modelli basati sui roditori non potevano essere considerati un sostituto ideale per le cellule umane (Eskes et al, 2017). Non essendo inoltre possibile accedere al tessuto nervoso umano, insieme alle difficoltà di creare un ambiente di coltura idoneo per queste cellule, si è giunti alla produzione di organoidi, cioè un insieme di cellule che riproducono in tempo reale le funzioni di uno specifico organo utilizzando le cellule staminali pluripotenti indotte per lo sviluppo di modelli *in vitro* dei neuroni DRG (Chibber et al, 2020). Tuttavia, per un impiego efficace e preciso di questi modelli cellulari, è necessario allestire dei protocolli per la differenziazione delle cellule staminali nei diversi citotipi di neuroni periferici. Dal momento che questi modelli *in vitro* sono prodotti su vasta scala per essere successivamente utilizzati come modelli di malattia o screening terapeutico, risulterà fondamentale utilizzare dei saggi in grado di assicurare che i risultati ottenuti siano precisi e accurati). I protocolli devono fare riferimento alle condizioni sperimentali che possono essere sorgente di variabilità nella misura, includendo le modalità

di preparazione della coltura, la caratterizzazione, il mezzo di coltura, la stabilità e la densità cellulare (Chibber et al, 2020).

Nel caso di neuroni periferici, questi presentano i corpi cellulari localizzati nei gangli della radice dorsale del cordone spinale, mentre le terminazioni assonali si trovano sempre nel cordone spinale e nelle vie nervose periferiche che attraversano il corpo (vie sensitive). Sebbene i meccanismi fondamentali della CIPN non siano ben compresi, uno dei marker specifici in questa sindrome è il fenomeno del “*dying back*”, caratterizzato dalla degenerazione assonale delle terminazioni nervose distali. Un modello in vitro di cellule neuronali periferiche derivato dalle cellule staminali pluripotenti, può fungere da sistema sensibile a quegli agenti che causano neuropatia periferica, permettendo inoltre uno *screening* dei possibili interventi terapeutici che possono prevenire o ridurre gli effetti avversi della chemioterapia. I parametri cellulari che sono rilevanti nell’identificare l’insorgenza di questo tipo di neuropatia, includono:

- la vitalità delle cellule neuronali
- la crescita assonale
- la degenerazione in termini di lunghezza e area delle fibre nervose
- la ramificazione degli assoni che riflette il fenomeno “*dying back*” osservato clinicamente rilevante.

Nel valutare la neurotossicità periferica è necessario ricordare che i neuroni sensitivi periferici hanno il compito di ricevere e trasmettere i segnali derivanti dagli stimoli esterni al cordone posteriore del midollo spinale (19, Fukuda et al, 2017); tutti questi segnali sono trasmessi attraverso l’attivazione di vie di trasduzione, comprendenti canali del sodio, del potassio e una varietà di canali del calcio voltaggio-dipendenti.

Un esempio è dato dal **paclitaxel**, che altera l’espressione genica dei suddetti canali ionici. Le colture di DRG possono essere usate per determinare lo stato di eccitabilità, i profili di espressione genica che possono rivelare il contributo che danno specifici geni all’attivazione di vie di segnale correlate alla neuropatia (North et al, 2019).

E’ possibile riprodurre in questi modelli in vitro, anche gli altri meccanismi di neurotossicità, come per esempio la risposta infiammatoria indotta dal paclitaxel. E’ stato osservato che l’inizio della cascata infiammatoria per attivazione del recettore TLR4 e della proteina chemo-attraente dei monociti nei neuroni DRG con conseguente insorgere dello stato infiammatorio (Zhang et al, 2016), determina ipersensibilità e si manifesta come perdita delle fibre nervose intraepidermiche. Altra alterazione osservabile con questi modelli in vitro è l’effetto sui mitocondri dei neuroni, che si manifesta con un’alterazione dello stato

energetico mitocondriale con azione secondaria sulle proteine del citoscheletro (Boukelmoune et al, 2021).

In aggiunta, con questi modelli in vitro possono essere analizzati e quantificati, mediante l'utilizzo di software di imaging, i cambiamenti negli eventi fisiopatologici che avvengono nello sviluppo di una neuropatia per una migliore valutazione dell'effetto dei farmaci. Con le recenti innovazioni nelle tecnologie di microscopia, si possono analizzare le neuropatie assonali, grazie alla creazione di un sistema micro fisiologico di neuroni periferici, in grado di riprodurre la complessità dei nervi periferici umani, utilizzando le variazioni dei parametri assonali (lunghezza, area), per valutare il danno alle fibre sensitive (Sharma et al, 2019).

### **3.2 Modelli pre-clinici**

Uno dei primi interventi per rilevare gli effetti neurotossici dei farmaci chemioterapici consisteva nell'attuare sperimentazioni per osservare in prima istanza l'attività comportamentale degli animali e in seguito i danni tissutali mediante l'analisi elettrofisiologica e istologica dei tessuti nervosi. I modelli animali sono stati trattati con i farmaci oggetto di studio e per riuscire a ottenere una comparazione tra gli effetti dei vari agenti, è stato definito un intervallo di tempo sperimentale a più stadi, tramite una fase iniziale, una media e una tardiva, sia nei test comportamentali che elettrofisiologici (Boehmerle et al, 2014).

In generale, uno dei primi effetti che si è potuto constatare, negli animali trattati con cisplatino è stata una significativa perdita di peso, rispetto sia ai controlli e a quelli trattati con paclitaxel, vincristina e bortezomib. Questo è un effetto che si è rilevato molto frequentemente dopo la somministrazione di cis-platino (Figura 2A) (Hoke et al, 2014). Lo step successivo, è stato analizzare il comportamento degli animali in quello che viene definito "*test a campo aperto*", dove i movimenti degli animali vengono seguiti e costantemente monitorati.

L'interesse dei ricercatori era analizzare quanti animali trattati con chemioterapia diventavano meno attivi in termini di movimento, per verificare se questo poteva essere un segno di tossicità generale o neuropatia motoria. Nella fase iniziale della sperimentazione, gli animali trattati con paclitaxel e cis-platino erano in grado di percorrere distanze più ampie rispetto a quelli trattati con vincristina e bortezomib (Figura 2B) (Hoke et al, 2014).

Nell'ambito dell'analisi comportamentale, assume una certa rilevanza l'allodinia meccanica, una condizione che si può manifestare a seguito di un'inflammatione o una lesione ai nervi, è legata ad un'ipersensibilità dei neuroni sensitivi periferici oppure può essere dovuta ad

un'amplificazione a livello del midollo spinale del segnale nocicettivo trasmesso da quei neuroni; rappresenta un marcatore comune di neuropatia da chemioterapia (Authier et al, 2009). E' noto che tutti i trattamenti chemioterapici determinano una riduzione della soglia di ritiro dallo stimolo meccanico ed è stata osservata a inizio sperimentazione per tutti i farmaci somministrati (figura 2D, 2E), ma l'aspetto comportamentale più significativo è quello legato all'osservazione dell'andatura nel movimento, per verificare la scioltezza e la coordinazione dei movimenti, aspetti fondamentali in presenza di una neuropatia periferica (Hoke et al, 2014).

Per valutare l'andatura degli animali, è stato definito un parametro che teneva in considerazione l'andatura nel movimento in tutte le sue fasi e comprendeva la somma della fase di posizionamento, di oscillazione e prendendo anche in considerazione se le alterazioni dell'andatura fossero predominanti negli arti anteriori o posteriori dell'animale. Si è potuto osservare che le cavie trattate con paclitaxel, cisplatino e vincristina manifestavano una riduzione della capacità di posizionamento degli arti inferiori, diminuendo sempre di più nel periodo tardivo dell'esperimento. Al contrario, per gli animali trattati con bortezomib, la riduzione della capacità di posizionamento era maggiore negli arti anteriori. Questi risultati hanno evidenziato per tutti i farmaci impiegati, lo sviluppo di un'allodinia meccanica e le conseguenti alterazioni nell'andatura degli animali (Figura 2F, 2G) (Han et al, 2013; Authier et al, 2009).

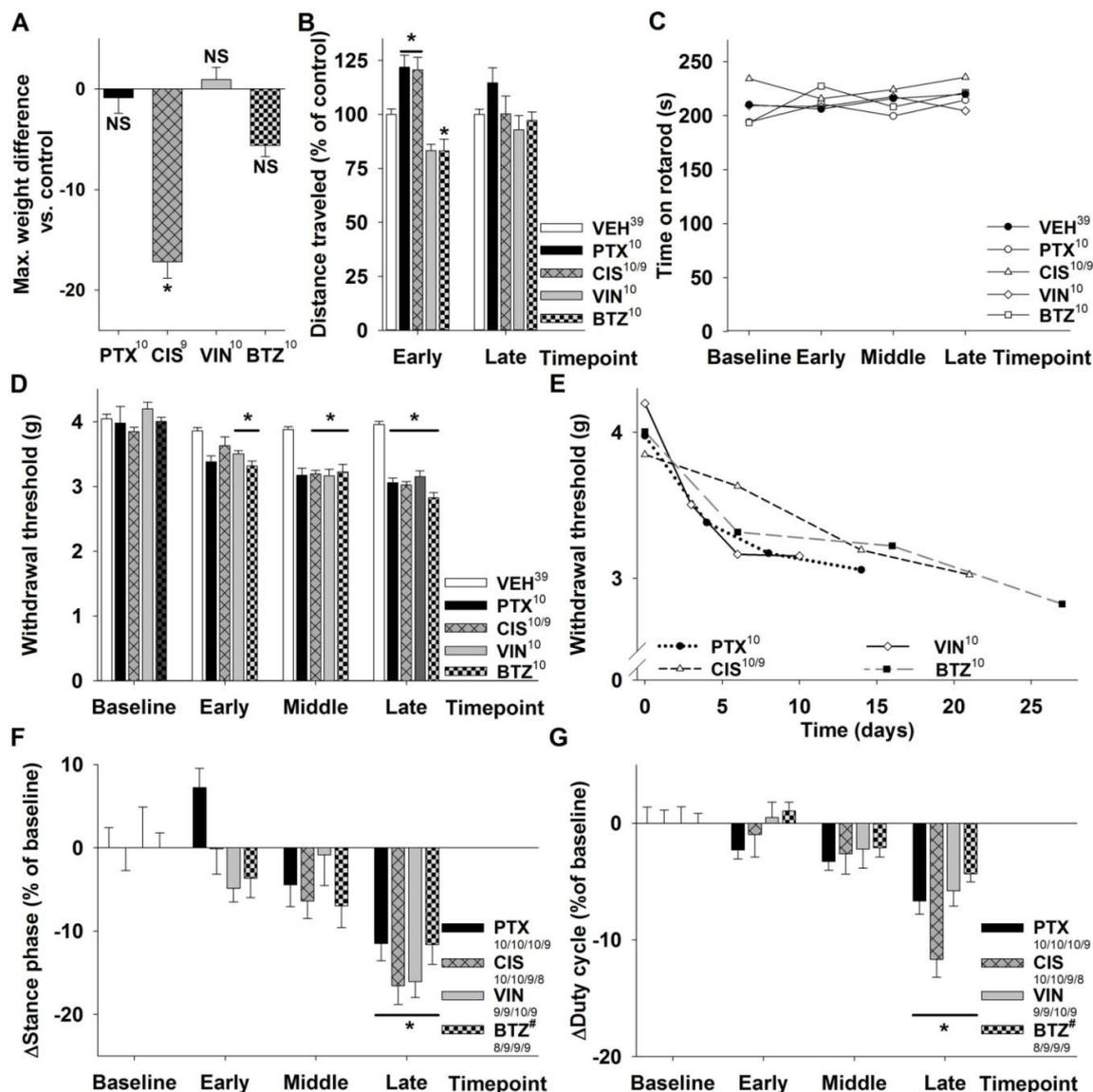


Figura 2: Osservazione dei comportamenti negli animali riceventi farmaci antineoplastici (Authier et al, 2009; Hoke et al, 2014).

### 3.3 Misure elettrofisiologiche e istologiche

I test elettrofisiologici hanno come finalità quella di caratterizzare le neuropatie sensitive, perché permettono misure di parametri specifici delle cellule neuronali. I test più diffusi attualmente disponibili comprendono la misura della velocità di conduzione nervosa e dell'ampiezza del potenziale d'azione dei nervi sensitivi, che attuati mediante la stimolazione del nervo caudale, permettono di rilevare cambiamenti fisiologici significativi di questi due parametri nel tempo (Authier et al, 2009; Hoke et al, 2014). Nella fase tardiva della sperimentazione, tutti i protocolli di trattamento hanno determinato una riduzione dell'ampiezza del potenziale d'azione in percentuali diverse a seconda dei farmaci impiegati

(Figura 3). Tuttavia il cisplatino si è rivelato responsabile di una forte demielinizzazione delle fibre come dimostrato dalla riduzione della velocità di conduzione nervosa negli animali del trattamento, sia durante la fase media che tardiva (Figura 3) (Authier et al, 2009).

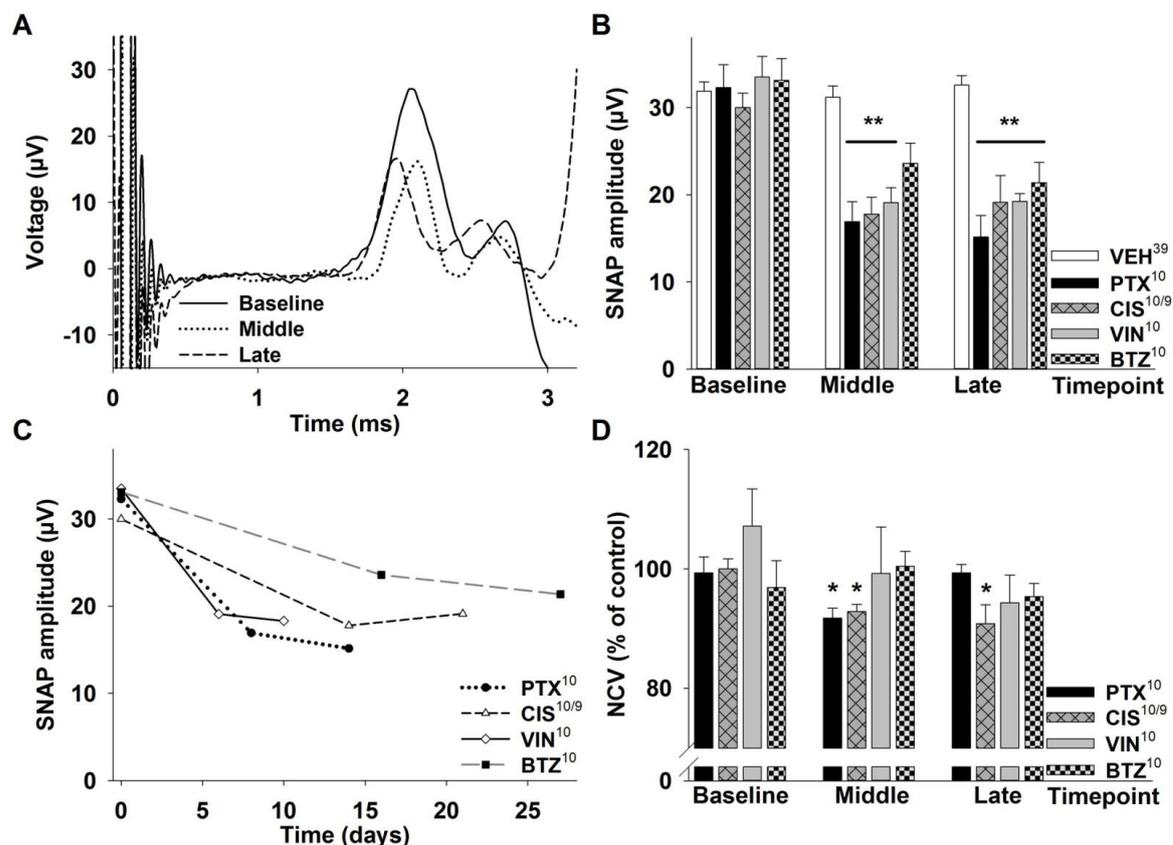


Figura 3: Misure elettrofisiologiche nei modelli CIPN (Authier et al, 2009; Hoke et al 2014).

Al termine dei test comportamentali e di analisi dei parametri elettrofisiologici, dagli animali è stato prelevato del tessuto proveniente dal nervo sciatico, sottoposto a esame microscopico morfometrico, con lo scopo di quantificare il diametro assonale e lo spessore dello strato di mielinizzazione (Figura 4). Negli animali trattati con paclitaxel o vincristina si osserva una diminuzione del diametro rispetto a quanto osservato negli animali di controllo non trattati (Figura 4F). Con bortezomib il diametro assonale risulta maggiore (Figura 4G,4H) (Kilkenny et al, 2010).

Per valutare i cambiamenti nella mielinizzazione, si è calcolato il rapporto numerico tra il diametro degli assoni e il diametro esterno della fibra mielinizzata implicando quindi un aumento del rapporto g che determina ipomielinizzazione (Kilkenny et al, 2010). Negli animali trattati con cis-platino, si osserva un aumento del rapporto g con una riduzione della velocità di conduzione nervosa misurata a livello del nervo caudale (Figura 4J), mentre la

densità delle fibre mieliniche si è rivelata molto ridotta con ogni tipo di trattamento (Figura 4K).

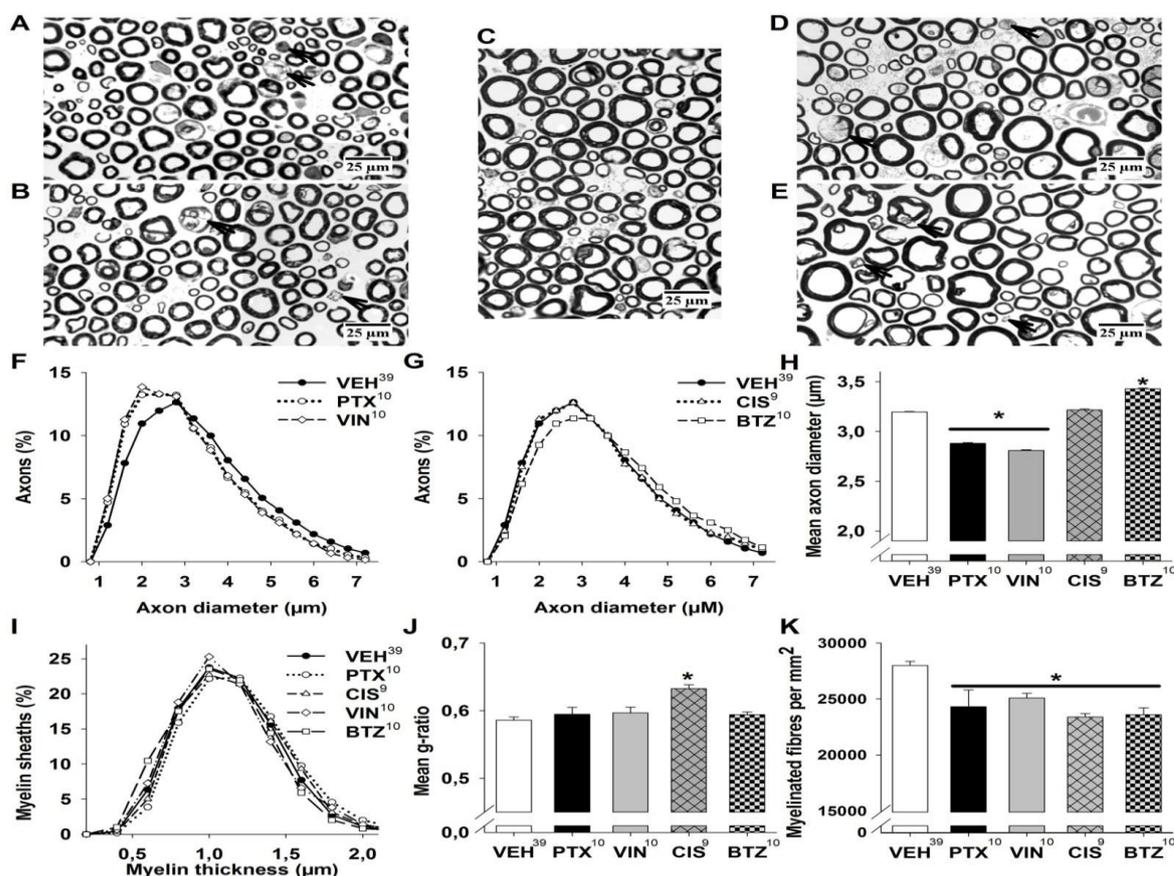


Figura 4: Analisi istologica del nervo sciatico (Authier et al, 2009; Hoke et al, 2014).

### 3.4 Rilevazione della neurotossicità in ambito clinico

La neuropatia periferica da chemioterapici colpisce prevalentemente il sistema nervoso periferico dai corpi cellulari dei neuroni, agli assoni e la maggior parte delle fibre nervose periferiche, e produce come effetto predominante una lesione alle fibre sensoriali mielinizzate di largo diametro (fibre Aβ) e danno ai neuroni dei gangli della radice dorsale. Gli studi di conduzione nervosa forniscono una quantificazione plausibile della funzione di queste fibre sensitive e sono di grande aiuto per gli scienziati, tuttavia non sono sempre applicabili o disponibili. Queste tecniche si occupano di rilevare una diminuzione o un'eliminazione dei potenziali d'azione sensitivi e quindi delle velocità di conduzione dell'impulso oppure una degenerazione assonale distale (morte retrograda). Fenomeni come questi si manifestano dapprima negli arti inferiori e successivamente in quelli superiori (Fuglsang-Frederiksen, Pugdhal, 2011; Krarup-Hansen et al, 2007).

Tra i farmaci utilizzati in chemioterapia, i composti del platino sono quelli che causano la maggior parte dei danni neurotossici, mentre le altre classi farmacologiche come i taxani e la vincristina determinano per lo più una neuropatia assonale lunghezza dipendente (Lavoie-Smith et al, 2015). Uno dei nervi principali su cui sono stati attuati questi studi è il **nervo surale**, un nervo sensoriale presente nella regione del polpaccio (sura) della gamba, nello specifico il suo coinvolgimento si verifica sia nelle neuronopatie non lunghezza dipendente che nelle neuropatie lunghezza dipendenti. L'analisi del nervo surale ha un valore predittivo e può distinguere i pazienti tra quelli che sono più ad alto rischio di neuropatia grave. La porzione dorsale del nervo surale è stata studiata in molti laboratori e può essere indicativa di una disfunzione allo stadio iniziale correlata alle neuropatie (Argyriou et al, 2005; Velasco et al, 2014). Gli studi di conduzione nervosa sul nervo surale dorsale sono stati effettuati in 200 pazienti con carcinoma colon-rettale e una diminuzione dell'ampiezza dei potenziali d'azione misurati a metà trattamento, era in grado di predirne il risultato dal punto di vista neurologico, una volta completata la chemioterapia. Un altro studio neurologico di conduzione nervosa, è stato utilizzato per sviluppare un algoritmo: le misurazioni prese a metà trattamento assegnavano a ogni paziente a una specifica classe di rischio neurofisiologico per l'insorgenza di neuropatia alla fine del trattamento (Alberti et al, 2015). Sebbene gli studi di conduzione nervosa facciano parte dei test diagnostici più sensibili per la valutazione della neuropatia, hanno anch'essi i loro limiti. Se è vero che possono fornire quantificazioni precise della funzione delle fibre nervose A $\beta$ , non danno informazioni sugli altri tipi di fibre, ma sono considerati il metodo *gold standard* nella rilevazione e monitoraggio della neuropatia da chemioterapici e vengono spesso utilizzati insieme all'analisi dei biomarcatori di danno neurologico (Argyriou et al, 2019).

Le variazioni del potenziale d'azione nei vari tipi di neuropatia, sensoriale e motoria, spiegano le differenze tra neuropatia lunghezza dipendente e non lunghezza dipendente. Nella neuropatia sensitiva lunghezza dipendente abbiamo un'ampiezza normale del potenziale d'azione nel nervo radiale dopo stimolazione del polso, mentre viene ridotta nel nervo surale dopo stimolazione della caviglia (Figura 5A). Nel caso di neuropatia sensitiva non lunghezza dipendente, entrambi i potenziali d'azione nei due nervi risultano diminuiti (Figura 5B). Nella neuropatia motoria lunghezza dipendente si riscontra un normale potenziale d'azione nella componente distale del nervo mediano e una riduzione del potenziale nella componente distale del nervo peroneale, rispettivamente dopo stimolazione del polso e della caviglia (Figura 5C). Nel caso di neuropatia non lunghezza dipendente,

come per quella sensitiva, la diminuzione dei potenziali d'azione avviene in entrambe le componenti distali dei nervi mediano e peroneale (Figura 5D) (Argyriou et al, 2019).

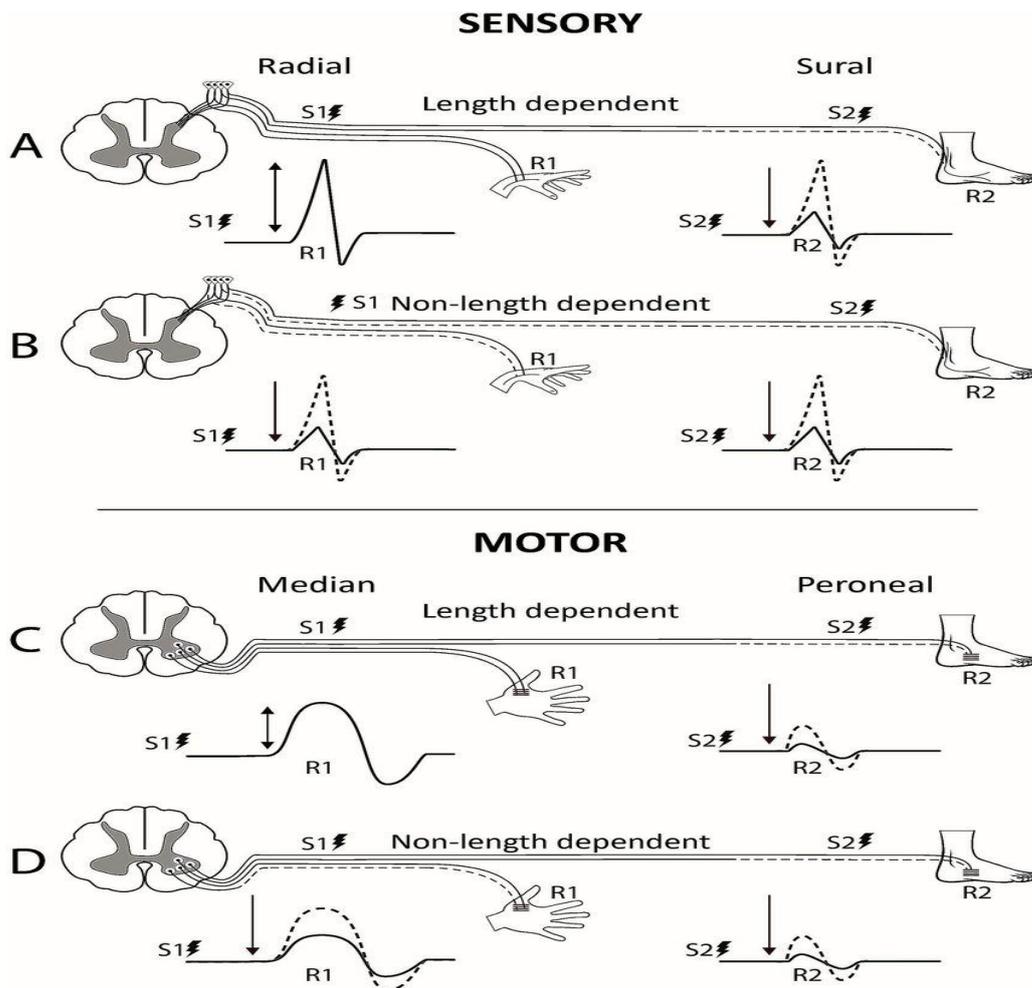


Figura 5: Principali caratteristiche della neuropatia periferica lunghezza-dipendente e non lunghezza-dipendente (Argyriou et al, 2019).

Un'evoluzione degli studi di conduzione è rappresentata dal **test quantitativo sensoriale** (QST) che determina la funzione sensoriale soggettiva, in cui è inclusa la soglia termica e dolorosa associata alle fibre C e fibre  $A\delta$ , la soglia meccanica e vibrazionale associata alle fibre  $A\beta$ . Il test QST è stato utilizzato nella neuropatia da chemioterapici per definire profili specifici di disfunzione sensoriale nel contesto dei trial clinici (Argyriou et al, 2019).

Attraverso tale tecnica, risulta che la neuropatia da chemioterapia è associata prevalentemente alla perdita delle fibre  $A\beta$ . Uno studio molto esteso su pazienti ha identificato un aumento della soglia vibrazionale, suggerendo che anche le fibre più piccole possono essere coinvolte, in base al tipo di chemioterapia. In particolare, i pazienti trattati

con paclitaxel avevano una ridotta attivazione della soglia meccanica e un aumento della soglia vibrazionale (Vibration detection threshold), prevalentemente negli arti inferiori distali. La perdita di sensibilità alle vibrazioni era infatti maggiore rispetto ai cambiamenti nella percezione termica nei pazienti trattati con paclitaxel. Risultati simili sono stati riscontrati anche durante il trattamento con i composti del platino, osservando tra l'altro che l'aumento della VDT persisteva a lungo termine nei pazienti trattati con cis-platino (Argyriou et al, 2019).

I pazienti trattati con vincristina e bortezomib invece, hanno manifestato variazioni nella soglia del tatto, in aggiunta alle variazioni sensoriali menzionate in precedenza, conseguenti a danni alle fibre A $\beta$ , A $\delta$  e C. Sebbene ognuno di questi farmaci vada a colpire diversi tipi di fibre sensitive, tra i pazienti che sviluppano le forme più gravi di neuropatia, l'incremento della VDT è in grado di fornire un metodo predittivo di quella che sarà la prognosi in questi pazienti (Argyriou et al, 2019).

Gli studi QST, presentano anche degli svantaggi in quanto dipendono dalla cooperazione dei pazienti che possono essere influenzati dalla cognizione degli stessi e rischiano di essere dei marcatori aspecifici di patologia. Inoltre sono in grado di rilevare in tempo reale alterazioni della sensibilità, anche se quest'ultime potrebbero essere correlate ad altre patologie concomitanti, come spesso si verifica nei pazienti in chemioterapia (Argyriou et al, 2019).

Quando si parla di neuroni e di processi neuropatologici che li coinvolgono, tra i metodi di analisi e rilevazione non mancano di certo gli studi sull'eccitabilità dei nervi, in grado di rilevare informazioni complementari agli studi di conduzione nervosa convenzionali sulle principali fasi di eccitabilità di una membrana. Questi studi di eccitabilità nervosa sono stati presi in considerazione nei pazienti trattati con ossaliplatino, esaminando mediante elettromiogramma i profili di tossicità sia acuta che cronica negli assoni sensitivi e motori. E' emerso dall'elettromiogramma un'attività motoria ad alta frequenza, in aggiunta a scariche ripetute dell'impulso nervoso (potenziale d'azione), indicative di uno stato di ipereccitabilità. I potenziali d'azione spontanei ad alta frequenza sono stati identificati in tutti i pazienti dopo due giorni di somministrazione di ossaliplatino e rimasero evidenti anche due settimane dopo nel 25% dei pazienti (Argyriou et al, 2019). In maniera simile, le variazioni nell'eccitabilità erano evidenti negli assoni motori in seguito alla somministrazione di ossaliplatino servendosi di studi di eccitabilità nervosa in grado di rilevare la soglia di attivazione. I nervi motori hanno dimostrato un aumento del periodo refrattario (quello che intercorre tra un potenziale d'azione e il successivo), mentre gli assoni sensitivi hanno dimostrato una ridotta diminuzione dell'ipereccitabilità (Argyriou et al,

2019). Questi cambiamenti nell'eccitabilità acuta motoria e sensitiva erano correlati, quindi i pazienti con variazioni rilevanti negli assoni sensitivi dimostravano anche delle anomalie in ambito motorio. A loro volta questi cambiamenti nell'eccitabilità nervosa motoria possono derivare da alterazioni funzionali nei canali del sodio, lungo l'assone.

Queste variazioni si verificano a inizio terapia e sono predittive della gravità della neuropatia cronica. In contrasto, quando la neuropatia si cronicizza, l'eccitabilità degli assoni motori rimane invariata e nel *follow-up*, le alterazioni dell'eccitabilità sensoriale si normalizzano anche se rimangono alcuni deficit, indicativi come marcatori di disfunzione a lungo termine (Argyriou et al, 2019). Gli studi di eccitabilità hanno fornito risultati corrispondenti anche nei pazienti trattati con paclitaxel e bortezomib, rilevando un incremento della soglia di stimolo e una diminuzione dell'ampiezza dei potenziali d'azione sensitivi, precedenti alla perdita sensoriale. Anche gli assoni motori hanno registrato cambiamenti simili a inizio terapia, infatti possono essere impiegati per identificare danni dovuti ad una neurotossicità precoce (Argyriou et al, 2019).

Infine, analizziamo le tecniche di *nerve imaging*, sono tecniche utilizzate per la mappatura diretta o indiretta della struttura, della funzione e anche della farmacologia del sistema nervoso e sono impiegate in questo caso nello studio dei fenomeni neuropatologici da chemioterapici. Tra queste un ruolo importante riveste la neurografia di risonanza magnetica, che valuta il nervo, le dimensioni, la morfologia, la struttura fascicolare e la presenza di fluido perineurale ed endoneurale. I nervi anormali appariranno iperintensi e allargati a causa dell'incremento del fluido interno, offrendo la possibilità di fornire informazioni anche quantitative sulla microstruttura delle fibre nervose (Gasparotti et al, 2017). In casi sospetti di neuropatia da chemioterapici, l'MRN può essere d'aiuto mostrando strutture nervose come radici e plessi nervosi che risultano allargati. A tal proposito in uno studio di neuroimaging condotto sul midollo spinale di pazienti affetti da mieloma multiplo trattati con bortezomib, è stato rilevato un aumento della radice lombare di questi pazienti che in seguito hanno sviluppato una neuropatia periferica con gravi compromissioni motorie (Argyriou et al, 2019). Un altro studio ha evidenziato anche ipertrofia nei gangli della radice dorsale che rappresentano uno dei bersagli più colpiti dei farmaci, soprattutto da parte dei composti del platino.

Tutte queste metodiche finora elencate, sono ora disponibili per determinare i vari stadi della neuropatia, da quelli iniziali, permettendo di comprendere i meccanismi che possono far insorgere una patologia neuronale, a quelli terminali (Argyriou et al, 2019). Bisogna comunque precisare, che mentre gli studi di conduzione nervosa rimangono il gold standard

per la diagnosi di neuropatia periferica a livello clinico, l'impiego delle altre tecniche è spesso limitato dalla necessità di un addestramento specifico da parte del personale e dalla necessità di disporre delle attrezzature idonee. Inoltre gli studi di conduzione nervosa sono in grado di implementare le capacità diagnostiche nei vari stadi della patologia e inoltre di determinare l'estensione e la gravità dei danni alle fibre nervose più grandi oltre ad essere utilizzati per monitorare i risultati a lungo termine (Argyriou et al, 2019).

### **3.5 Biomarcatori fluid-based**

I metodi disponibili di rilevazione di danno funzionale, si basano essenzialmente sull'osservazione dei sintomi nervosi come tremori o altre alterazioni motorie. Tuttavia questi sintomi possono essere non diagnosticati o mal interpretati durante le sperimentazioni, ed è per questo che si è preferito utilizzare altri metodi di rilevazione ben più precisi e affidabili basati sull'analisi di biomarcatori molecolari rilevabili dai fluidi corporei (Roberts et al, 2015). Lo sviluppo di biomarcatori di neurotossicità rappresenta un obiettivo condiviso da tutti gli scienziati con il fine di utilizzare i metodi più sensibili e specifici per diagnosticare e predire un effetto neurotossico. Essi hanno inoltre il vantaggio di essere facilmente disponibili come campioni da analizzare in quanto si ritrovano in fluidi corporei facilmente prelevabili come il plasma, il siero, le urine e il fluido cerebrospinale (Wan et al, 2012). Questi biomarcatori sono associati a variazioni istopatologiche delle strutture nervose che a loro volta riflettono variazioni di parametri funzionali rilevabili con le moderne apparecchiature di diagnosi strumentale, come la risonanza magnetica di imaging (Roberts et al, 2015).

Attualmente i biomarcatori di neurotossicità normalmente più comuni sono:

- **microRNA,**
- **isoprostani-F2,**
- **proteina acida fibrillare gliale,**
- **l'idrolasi L1** (dominio C-terminale dell'ubiquitina),
- **proteina basica mielinica,**
- **proteina-2** (associata ai microtubuli)

Tutti questi marcatori di danno strutturale e neuronale, sono implicati e associati a specifiche modificazioni fisiopatologiche neuronali e alle malattie neurodegenerative. L'utilizzo dei biomarcatori permette un monitoraggio continuo dello stato di malattia e dell'efficacia farmacologica, permettendo una migliore gestione della malattia (Blennow et al, 2012; Perrin et al, 2009)

Particolare importanza rivestono i biomarcatori nel fluido cerebrospinale a causa della prossimità di quest'ultimo ai tessuti target, per cui modificazioni biochimiche nel target si riflettono anche nella composizione del fluido cerebrospinale, oltre a permettere anche una precisa discriminazione dei biomarcatori provenienti da altri tessuti, dal momento che non sono in grado di accedervi (Wan et al, 2012)

A scopo didascalico, segue una lista dei principali biomarcatori proteici:

1. La proteina acida fibrillare gliale (Tabella 1) e' un biomarcatore di astrogliosi, una condizione patologica che indica sia danno neuronale che a livello delle cellule gliali.
2. La proteina-2 associata ai microtubuli (Tabella 1) e' marcatore di danno a livello
3. dei dendriti dei neuroni, tipicamente associato al danno traumatico cerebrale.
4. La idrolasi-L1 del dominio C-terminale dell'ubiquitina (Tabella 1) riflette il danno ai corpi cellulari neuronali e generalmente si riscontra in condizioni come danno traumatico cerebrale, ischemia o emorragia cerebrale.
5. I microRNA (Tabella 1) sono implicati nei processi regolativi dello sviluppo del sistema nervoso, alcuni di questi, miR-134, miR132 e miR124, potrebbero essere coinvolti nei meccanismi di sviluppo dei dendriti, mentre miR134 e miR138 sono implicati nei processi di maturazione delle sinapsi (Schratt, 2009). In condizioni patologiche osserviamo livelli di espressione alterati di questi biomarcatori.
6. La proteina basica mielinica (Tabella 1) è una proteina estrinseca della guaina mielinica. E' stata identificata inizialmente come uno dei principali bersagli del sistema autoimmune nella patogenesi della placca attiva tipica della sclerosi multipla (Mondello et al, 2012).
7. Gli isoprostani-F2 (Tabella 1) rappresentano un marcatore di danno ossidativo che si verifica principalmente in seguito al danno cerebrale traumatico (Bayir et al, 2004).

## Potential Biomarkers of Neurotoxicity<sup>4</sup>

### Fluid Based - Direct analysis of plasma, serum, urine, or CSF – longitudinal and minimally invasive

Biomarker	Endpoint	Comments
F <sub>2</sub> -IsoPs (F <sub>2</sub> -iso prostanes)	Indirect measurement of oxidative injury	Used clinically as biomarker of exposure Not specific for neurotoxicity
GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Biomarker of all types of neural (neuronal and glial) damage	ELISA already developed GFAP is a sensitive and specific marker of astrogliosis (indicative of all types of CNS damage)
MAP-2 (microtubule-associated protein)	Biomarker of dendritic injury	ELISA already developed
MBP (myelin basic protein)	Biomarker of myelin disruption	Immunoassay developed, but not widely used
Microtubule-associated protein tau (total tau, phosphorylated tau, and cleaved tau)	Biomarker of neurodegeneration/axonal injury	of ELISAs developed
Neurofilament (light chain and phosphorylated heavy chain)	Biomarkers of axonal injury	ELISA exists
Spectrin breakdown product (SBDP-145)	Found in the CSF as a biomarker for neurodegeneration (apoptosis and necrosis)	Recently reported Has been validated in a variety of preclinical models of neurotoxicity including preclinical and clinical imaging
TSPO (translocator protein)	Biomarker of activated glia	
UCH-L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase)	Biomarker of cell body injury	Immunoassay developed
Imaging - less invasive, longitudinal analysis in living animals, high-resolution in postmortem fixed animals		
MRI T <sub>2</sub> relaxation	Detects edema, hemorrhage, water	Data obtained using T2

## Fluid Based - Direct analysis of plasma, serum, urine, or CSF – longitudinal and minimally invasive

Biomarker	Endpoint	Comments
	redistribution, cellular disruption, cellular density, infiltration, blood flow changes, and temperature changes	relaxation is quantitative
		Correlation to pathology can be achieved via digital analysis
MicroPET	Molecular level view of biochemical, physiological, pathological, and pharmacological processes in vivo	Tags for specific neurotransmitter receptor systems can be used  Resolution less than MRI needs specific short-lived radiolabeled ligand to probe the function of interest

Abbreviations: CFS, cerebrospinal fluid; CNS, central nervous system; ELSIA, enzyme-linked immunosorbent assay; MRI, magnetic resonance imaging; PET, positron emission tomography.

Tabella 1: Biomarcatori di neurotossicità utilizzabili nella pratica clinica (Roberts et al, 2015).

### 3.5.1 Tecniche di imaging

Le tecniche di neuroimaging sono vantaggiose per identificare potenziali biomarcatori di neurotossicità. Le più utilizzate nel rilevare i danni al sistema nervoso sono:

- la risonanza magnetica di imaging
- tomografia a emissione di positroni (PET)

La risonanza magnetica di imaging può rilevare modificazioni nella struttura cellulare in termini di variazione dell'integrità e della densità cellulare, offrendo una scansione e una mappatura in tempo reale di tutte le aree del sistema nervoso centrale. La tomografia a emissione di positroni permette un imaging funzionale a livello molecolare, permettendo di comprendere i processi chimici, fisiologici e patologici alla base della neurotossicità (Hanig et al, 2014; Liachenko et al, 2015). La tomografia ad emissione di positroni richiede dei ligandi che emettono positroni, progettati per fungere da traccianti di specifici eventi cellulari come ad esempio modificazioni della membrana cellulare in seguito ad apoptosi.

Le tecniche di imaging hanno il vantaggio di essere usate non soltanto per monitorare la localizzazione delle lesioni e la loro progressione, ma anche di monitorare specifiche regioni

cerebrali; in queste indagini è di mettere insieme le caratteristiche dei biomarcatori con le tecniche di imaging per la valutazione della neurotossicità (Liachenko et al, 2015).

### **3.5.2 Identificazione di un biomarcatore di tossicità**

Per testare l'utilità di un biomarcatore, si possono utilizzare agenti neurotossici come modello per determinare se il biomarcatore candidato è in grado di rilevare la tossicità in vivo.

L'agente neurotossico maggiormente descritto in letteratura come modello è il **TMT** (trimetil stagno cloruro). Gli studi mostrano che il TMT provoca dei cambiamenti nell'espressione dei microRNA neurali associati con diversi sintomi neurologici, suggerendo che i biomarcatori che identificano i microRNA alterati sono validi in ambito clinico (Balaban et al, 1988). La somministrazione di TMT produce un insieme di sintomi comportamentali depressivi, ma sono difficili da rilevare in quanto si possono confondere con altri sintomi neurologici (Ogata et al, 2015).

In seguito alla somministrazione di TMT e all'insorgenza del successivo danno neurale, è possibile analizzare campioni dei fluidi biologici per rilevare la presenza dei biomarcatori *fluid-based*, ove questi siano maggiormente espressi (Roberts et al, 2015). Inoltre, implementando queste analisi con le tecniche di imaging, viene creato un profilo completo con tutti i parametri molecolari e funzionali, indicativi della neurotossicità indotta dall'agente prototipo.

Una prerogativa fondamentale di tutti i biomarcatori è la sensibilità e la specificità, devono essere sensibili per fornire una bassa incidenza di falsi negativi, e specifici per fornire una bassa incidenza di falsi positivi (McMilian et al, 1986). I migliori biomarcatori forniranno informazioni specifiche sul target molecolare, aprendo la strada per l'opportunità di identificare nuovi bersagli farmacologici.

Non esistono strategie valide per prevenire o limitare l'insorgenza di neuropatia. Attualmente non ci sono metodi standard convalidati per la valutazione della neuropatia, come pure la definizione di danno nervoso sub-clinico con i metodi disponibili. In aggiunta esistono anche delle differenze interindividuali nella comparsa di queste reazioni avverse in ambito clinico in quanto i chemioterapici possono determinare neurotossicità attraverso una varietà di meccanismi che culminano con disfunzioni sensoriali, motorie e autonome (Moser, 1996).

E' necessario trovare delle strategie efficaci per l'identificazione nel breve termine di questo fenomeno, prevenirlo e gestirlo in maniera adeguata, anche perché i pazienti sono meno propensi alla prosecuzione della terapia se sviluppano complicazioni gravi come la neuropatia.

L'identificazione di biomarcatori molecolari presenti nel sangue periferico (blood molecular biomarkers, BMB) che possono fornire informazioni in tempo reale sullo stato della neuropatia, individuando di conseguenza anche strategie terapeutiche efficaci per impedirne l'insorgenza o limitarne la progressione. BMB includono diversi tipi di molecole rilasciate nel sangue che indicano la presenza e la gravità della neurotossicità (Meregalli et al, 2020).

Come per ogni nuova metodica di rilevazione, i modelli animali sono stati molto utilizzati per comprendere i meccanismi alla base della neuropatia e anche se con alcune limitazioni, i BMB hanno un valore diagnostico confermato per essere impiegati anche in clinica, soprattutto per prevedere parametri importanti come l'incidenza e la gravità della malattia.

### **3.6 Biomarcatori plasmatici**

I primi che prenderemo in considerazione sono i **fattori neurotrofici** (NFs) molecole fondamentali nello sviluppo fisiologico del sistema nervoso centrale e periferico, ma presenti anche nei processi di riparazione durante il danno neuronale. E' stato dimostrato che l'attivazione delle vie metaboliche da essi controllate viene coinvolta anche durante l'esposizione ai chemioterapici. Studi in vitro e su modelli animali in vivo hanno permesso di indagare come queste vie metaboliche possono essere regolate per arrivare a ottenere un effetto neuro protettivo nel corso di una chemioterapia. I due principali fattori neurotrofici sono il **fattore di crescita nervoso** (Nerve growth factor, NGF) e il **fattore di crescita derivato dall'encefalo** (Brain Derived neurotrophic factor, BDNF) (Aloe et al, 2000).

Il fattore di crescita nervoso regola lo sviluppo, il mantenimento e l'integrità dei neuroni, esercitando la sua azione sulle piccole fibre nervose che controllano il dolore, la temperatura e le funzioni del sistema nervoso autonomo. Tramite l'utilizzo di test ELISA specifici durante la chemioterapia, sia in fase preclinica e in alcuni studi clinici, è possibile determinare alterazioni dei suoi livelli sierici (Anand et al, 1991)

Gli studi pre-clinici hanno potuto dimostrare che il recettore ad alta affinità del fattore di crescita nervoso che attiva il recettore A tropomiosino-chinasico, TRKA è espresso nei neuroni dei gangli della radice dorsale che sono maggiormente colpiti da danno neurotossico durante l'esposizione ai chemioterapici (composti del platino, paclitaxel, alcaloidi della vinca, bortezomib). In particolare, NGF è in grado di riparare il danno nei neuroni colpiti da

morte cellulare indotta dal cisplatino, tramite l'interazione con il suo recettore TRKA, di conseguenza non solo ha un ruolo nello sviluppo dei neuroni periferici, ma è anche in grado di proteggerli dal danno neuronale. La maggior parte delle sperimentazioni sui ratti dimostra appunto che in seguito all'esposizione a cisplatino e ossaliplatino, i livelli circolanti di NGF diminuiscono e questa riduzione è strettamente correlata con l'insorgenza della neuropatia periferica. A conferma di ciò, la somministrazione di NGF riduce la gravità della neuropatia (Apfel et al, 1991).

In ambito clinico, i livelli sierici di NGF in pazienti che hanno ricevuto differenti protocolli di chemioterapia risultano più bassi di quelli dei pazienti non trattati e soggetti sani, evidenziando anche il fatto che le cellule secernenti NGF non sintetizzano né rilasciano quantità sufficienti di NGF per riparare il danno ai tessuti nervosi periferici. A sostegno di questi dati, sono stati eseguiti diversi studi clinici, con lo scopo di valutare la correlazione tra i livelli circolanti di NGF con lo stato neurologico dei pazienti. A tal riguardo sono state arruolate 62 donne colpite da carcinoma cervicale squamoso in fase avanzata con assenza di neuropatia periferica e successivamente trattate con cisplatino e paclitaxel. Le pazienti sono state sottoposte a monitoraggio per verificare eventuali sintomi sensoriali e motori con i metodi di rilevazione neurologica standard (elettroencefalogramma, studi di conduzione nervosa, neuroimaging). Il risultato ottenuto da questo studio ha evidenziato che i livelli ridotti di NGF rispetto a quelli basali, erano responsabili della neuropatia periferica grave manifestata a livello clinico (Aloe et al, 2000). La diminuzione dell'NGF associata a neuropatia è stata osservata anche nei pazienti con tumori ematologici trattati con bortezomib, vincristina e talidomide (Apfel et al, 1991).

Tuttavia, le sperimentazioni successive hanno fornito risultati opposti per altri tipi di tumori, in particolare in pazienti affetti da tumori solidi, i quali dopo aver ricevuto uno specifico regime terapeutico a base di taxani e composti del platino, pur evidenziando l'insorgenza di neuropatia periferica, non presentavano una riduzione dei livelli di NGF, bensì un aumento probabilmente perché in determinate condizioni patologiche, l'incremento dei livelli di NGF è dovuto all'instaurarsi di una risposta biologica dei tessuti nervosi danneggiati tramite un meccanismo di compensazione delle fibre nervose al danno neuronale (Anand et al, 1991).

Un altro fattore importante per il neurotrofismo è il *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), appartenente anch'esso alla famiglia delle neurotrofine e partecipa ai processi di accrescimento, maturazione, differenziazione e riparazione dei neuroni. BDNF è prodotto in diversi tipi di cellule e può agire mediante meccanismi paracrini, cioè attraverso l'azione su cellule più lontane dal sito di rilascio e autocrini, cioè attraverso l'azione sulle cellule nelle

immediate vicinanze del sito di rilascio esercitando la sua attività tramite interazione con un altro recettore della famiglia dei recettori tropomiosino-chinasici, (*Tropomyosin-related Kinase Receptor B*). Negli studi pre-clinici, sono disponibili dati limitati sulla correlazione tra i livelli anormali di BDNF e lo sviluppo e la gravità della neuropatia periferica. Sono stati in particolare studiati gli effetti del bortezomib sull'interferenza in alcuni meccanismi di organizzazione delle strutture cellulari nei neuroni dei gangli della radice dorsale, determinando una grave compromissione della sintesi proteica che si rifletteva a sua volta in una diminuzione dei livelli sierici di BDNF (Aloe et al, 2000).

In ambito clinico, l'analisi dei livelli circolanti di BDNF ha dato risultati simili osservati per l'NGF, cioè una riduzione del BDNF sierico in seguito al trattamento di alcuni pazienti con il bortezomib che avevano sviluppato neuropatia periferica. Inoltre, dal momento che le piastrine sono coinvolte nell'omeostasi del BDNF nel sangue, si è potuto osservare che il bortezomib, con il suo effetto inibitorio sull'attivazione e aggregazione piastrinica causava una diminuzione del rilascio del BDNF dalle piastrine, riducendo in seguito anche la sua disponibilità nella riparazione del danno nervoso periferico (Anand et al, 1991). E' stato inoltre ipotizzato che la differente suscettibilità dei pazienti alla BIPN sia dovuta a una variazione nel gene codificante per BDNF, nello specifico è stata descritta una correlazione tra un polimorfismo a singolo nucleotide non conservativo nel gene BDNF (val66Met) e il deficit nella sua produzione (di BDNF) a livello cellulare. Per confermare ciò 45 pazienti affetti da mieloma multiplo o linfoma di Hodgkin trattati con bortezomib sono stati valutati per lo sviluppo di neuropatia periferica e anche per la presenza o meno di questo polimorfismo e della sua correlazione con i livelli circolanti di BDNF ed emerse che alte riserve sieriche di BDNF, contenute principalmente nelle piastrine, erano correlate allo sviluppo di una neuropatia periferica (Apfel et al, 1991).

Una classe importante di biomarcatori sono i **microRNA non codificanti**, caratterizzati da una sequenza media di 22 nucleotidi. Essi agiscono principalmente con un meccanismo di down-regulation dei geni bersaglio interferendo con la trascrizione e la traduzione genica. A differenza degli altri acidi nucleici, i microRNA possono essere sfruttati come biomarcatori dal momento che sono molto stabili nei fluidi corporei (principalmente sangue) e questo li rende dei biomarcatori di malattia estremamente efficaci in quanto resistenti all'azione delle RNAsi. Una variazione dei loro livelli può essere rilevata tramite un saggio di RealTime PCR in un campione di sangue. La loro presenza è anche indicativa di dolore cronico attraverso un'alterazione dell'espressione genica, quindi rilevanti nel caso di dolore neuropatico severo (Aloe et al, 2000).

Alterazioni dei livelli di microRNA nel plasma si sono manifestate in modelli animali di neuropatia periferica indotta da chemioterapici. Trattando gli animali con un agente antitumorale appartenente alla famiglia degli inibitori di istone-deacetilasi, si è potuto osservare che il farmaco induceva ipersensibilità nervosa insieme a variazioni nei livelli di 5 tipi di microRNA (Anand et al, 1991).

In ambito clinico, la letteratura scientifica evidenzia un solo studio che conferma l'efficacia dei microRNA nel predire i fenomeni neuropatici. E' stata valutata l'espressione sierica dei microRNA in pazienti con carcinoma mammario che hanno ricevuto paclitaxel ed è stato identificato un biomarcatore specifico, il microRNA miR-451a, coinvolto nella regolazione della proteina di trasporto dei farmaci, la glicoproteina P che è responsabile del metabolismo del paclitaxel. Attraverso l'inibizione dell'attività della glicoproteina P, miR-451a consente l'efflusso dalle cellule e un accumulo di paclitaxel nell'organismo con conseguente insorgenza di neuropatia periferica (Apfel et al, 1991).

La ricerca ha permesso di individuare altri biomarcatori molecolari strettamente correlati con la struttura dei neuroni, in particolare i neuro filamenti, che vengono espressi solo nei neuroni i cui assoni sono altamente mielinizzati e quindi preposti a sviluppare una velocità di conduzione dell'impulso nervoso sostenuta. Al verificarsi del danno assonale, vengono rilasciati nello spazio extracellulare e possono essere rilevati nel sangue e nel fluido cerebrospinale e, in virtù della loro specifica espressione nei neuroni, i loro livelli elevati nei campioni di sangue periferico sono indicatori specifici di danno neuronale (Anand et al, 1991). Essi possono essere quantificati utilizzando una versione a elevata sensibilità dei test ELISA basata su un metodo che è in grado di rilevare una molecola per volta, soprattutto quando i livelli di concentrazioni sono molto bassi.

I neuro filamenti sono costituiti da tre subunità proteiche principali che differiscono per il loro peso molecolare: i neurofilamenti a catena leggera (**NF-L**), media (**NF-M**) e pesante (**NF-H**), si trovano nei neuroni in forma prevalentemente fosforilata, resistente alla degradazione proteica. La forma fosforilata del neuro filamento a catena pesante (pNF-H) regola i processi che determinano non solo la stabilità neuronale, ma soprattutto i livelli ematici di pNF-H che sono stati rilevati sia in modelli pre-clinici che clinici in seguito a danno ai cordoni spinali e ai motoneuroni. Dal momento che livelli elevati di NF-L sono stati trovati sia nel sangue che nel fluido cerebrospinale nei soggetti con sclerosi multipla, si ritiene che possa essere correlato ad una neuropatia indotta da chemioterapici clinicamente grave in pazienti sottoposti a regimi terapeutici combinati (Aloe et al, 2000).

Alla base delle varie forme di neuropatia da chemioterapici può esserci anche il processo neuro-infiammatorio responsabile delle reazioni autoimmuni contro i tessuti del sistema nervoso. Ad esempio, alcuni chemioterapici, in genere i taxani, determinano un incremento dei livelli ematici delle principali citochine infiammatorie tra cui **IFN- $\gamma$** , **IL-1 $\beta$** , **IL-6** e **IL-8**, tramite stimolazione di cellule immunitarie (neutrofili, linfociti) nei confronti delle strutture e i tessuti autologhi neuronali.

La componente genetica esercita il suo impatto anche in questo fenomeno, in quanto le alterazioni genetiche possono essere responsabili dell'insorgenza non solo della malattia, ma anche della variabilità nella risposta ai farmaci soprattutto in termini di eventi avversi (Anand et al, 1991). Nell'ambito della tossicità da chemioterapia, sono coinvolti i geni che codificano per alcuni target molecolari nella neuropatia, e prendendo in considerazione i polimorfismi a singolo nucleotide presenti in questi geni target, si possono avere variazioni geniche soprattutto nelle seguenti categorie:

1. Geni associati alle funzioni dei microtubuli
2. Geni associati ai canali ionici, in particolare i canali del sodio voltaggio-dipendenti
3. Geni responsabili di neuropatie ereditarie;
4. Geni associati alle funzioni dei processi infiammatori;
5. Geni associati al trasporto e al metabolismo dei farmaci

I polimorfismi a singolo nucleotide possono comportare, durante l'esposizione ai chemioterapici, una maggiore suscettibilità allo sviluppo di una neuropatia a causa della presenza di genotipi mutati rispetto ai *wild-type*. Essi si traducono in una maggiore o minore produzione della proteina target o in un maggiore o minore suo funzionamento. Altri geni sono quelli codificanti per i recettori efrinici, una famiglia di recettori tirosin-chinasici coinvolti nello sviluppo neuronale, geni che codificano per proteine che riparano il DNA e implicate nella progressione del ciclo cellulare (Apfel et al, 1991).

## CAPITOLO 4

### MECCANISMI DI NEUROTOSSICITA' E TIPOLOGIE DI NEUROTOSSICITA'

Per neurotossicità si intende un cambiamento non fisiologico nella struttura o nella funzione del sistema nervoso centrale e/o periferico, conseguente all'esposizione a specifici agenti chimici, fisici o biologici (Walker et al, 2018).

La tossicità a livello del sistema nervoso centrale e periferico solitamente è causata da diversi meccanismi di danno molecolare che hanno come bersaglio d'azione principalmente le strutture e funzioni delle cellule nervose:

- degenerazione assonale e degradazione dei terminali sinaptici dei neuroni
- alterazioni nel sistema di trasporto assonale
- processi neuro-infiammatori e neuro-immunitari
- produzione di radicali liberi derivanti dallo stress ossidativo
- degenerazione della guaina mielinica

Tutti questi processi se protratti nel tempo e in modo non controllato, portano a degenerazione dei tessuti nervosi con conseguente neurotossicità, determinando l'insorgenza di malattie neurodegenerative croniche come il **morbo di Parkinson**, e la **sclerosi multipla** (Walker et al, 2018).

La degenerazione assonale e dei terminali nervosi, specialmente a livello dei motoneuroni rappresentano una delle principali cause di neuropatie periferiche e dolore neuropatico. Gli agenti neurotossici possono infatti modificare e danneggiare la struttura delle proteine del citoscheletro come la **tubulina**, distruggendo la struttura dei neuroni (Was et al, 2018).

Il sistema nervoso centrale non è composto solamente dai neuroni, ovvero le cellule nervose preposte alla trasmissione degli impulsi nervosi, ma anche da altre cellule accessorie, rappresentate dagli **astrociti** e dalla **microglia**. Gli astrociti hanno il compito di sostenere le funzionalità neurotrofiche di crescita e mantenimento delle cellule nervose, attraverso la produzione di fattori neurotrofici specifici, mentre la microglia è fondamentale per la generazione di una protezione immunitaria contro gli agenti esterni e contro i danni.

Nel sistema nervoso, essendo composto da cellule non rigenerabili, in alcune condizioni particolari come ad esempio in presenza di un agente neurotossico, può verificarsi una iperattivazione del sistema immunitario microgliale, con il rilascio di citochine infiammatorie e l'instaurarsi di uno stato di infiammazione.

Tra i meccanismi di danno neurologico, merita una particolare attenzione il processo neuro-infiammatorio. La risposta immunitaria (innata e adattativa) e la stimolazione delle

secrezioni di mediatori chimici pro infiammatori (citochine e chemochine), sono responsabili dei sintomi dolorosi nei pazienti, mentre l'attivazione delle cellule nervose accessorie come le cellule gliali e di Schwann, contribuiscono al mantenimento del processo neuro infiammatorio rispettivamente nei gangli della radice dorsale e negli assoni.

Le cellule gliali satelliti e le cellule di Schwann negli assoni, sono in grado di produrre mediatori responsabili della eccitabilità neuronale fino a determinare fenomeni di ipersensibilità, e contemporaneamente, dopo il rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie, determinano il reclutamento dei monociti che partecipano al processo infiammatorio, mentre la microglia e gli astrociti si sono dimostrati responsabili nel determinare l'insorgenza del dolore neuropatico nel sistema nervoso centrale.

Tutti questi meccanismi, concorrono a determinare due tipologie di neurotossicità:

- **strutturale**
- **funzionale**

La neurotossicità strutturale è associata al danno tissutale, mentre quella funzionale si manifesta con modificazioni delle funzioni cerebrali o alterazioni dell'attività di conduzione elettrica nelle fibre nervose. Nell'ambito dello sviluppo di un farmaco, esistono diverse modalità metodologiche di studio dei fenomeni neurotossici tra studi clinici e non clinici, e se i danni alle strutture nervose possono essere rilevati e valutati in modelli animali tramite analisi istopatologiche, non si può dire lo stesso per i danni funzionali, di più difficile rilevazione soprattutto a livello clinico.

## CAPITOLO 5

### NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA CHEMIOTERAPIA FATTORI DI RISCHIO E FARMACI CHEMIOTERAPICI

La neuropatia periferica da chemioterapia è uno degli effetti collaterali più comuni del trattamento con farmaci antineoplastici. Essa ha una prevalenza intorno al 12-96% (Eckhoff et al, 2015) e l'impatto sulla qualità della vita dei pazienti che la sviluppano è significativo; Per i clinici questa condizione si presenta una sfida in quanto devono essere in grado di diagnosticarla e gestirla al fine di limitarne i danni, specialmente in quei pazienti che manifestano già patologie concomitanti o preesistenti che colpiscono il sistema nervoso periferico (Eckhoff et al, 2015). Infatti esiste una specifica predisposizione all'insorgenza della neuropatia da chemioterapici in quei pazienti i cui sono già stati esposti a fattori come diabete mellito, abuso di alcol, disfunzioni tiroidea, stati infettivi e carenze di vitamine. Inoltre alcuni farmaci che appartengono ai chemioterapici, ma che sono spesso usati nei pazienti oncologici, tra cui antibiotici come metronidazolo e sulfasalazina o antiepilettici come la fenitoina, si sono dimostrati capaci di causare sviluppo di neurotossicità periferica (Bao et al, 2016).

La ricerca dei fattori di rischio più plausibili nell'insorgenza della neuropatia a livello oncologico è andata avanti, ha rilevato anche altre condizioni patologiche come l'obesità, un elevato indice di massa corporea, l'insonnia e la depressione (Bao et al, 2016).

Uno studio prospettico osservazionale sulla prevalenza della neuropatia da chemioterapia si è svolto nei sei mesi dopo l'inizio di una chemioterapia; Il campione includeva pazienti trattati con composti del platino (principalmente cis-platino) o con taxani (docetaxel), per il trattamento del carcinoma alla mammella, al polmone, ovarico e gastrointestinale.

I potenziali fattori di rischio sono stati esaminati per capire quale fosse il loro impatto nello sviluppo della neuropatia, tra questi abbiamo:

- 1) Una diagnosi di neuropatia ereditaria o acquisita, provocata da condizioni di diabete, malattia renale, ipotiroidismo, malattie del tessuto connettivo, una storia preesistente di neuropatia anche familiare
- 2) Una diagnosi di neuropatia con malattie infettive concomitanti o precedenti (HIV, poliomielite, epatite B e C)
- 3) Terapie con farmaci neurotossici come ciclosporina, vancomicina e cimetidina

Inoltre i pazienti sono stati classificati per:

- 1) Età
- 2) Stato di malattia
- 3) Tipo di chemioterapia (distinguendo tra ionoterapia e terapie combinate), numero di cicli di chemioterapia e dose cumulativa di ciascun farmaco, abitudine di fumare e bere alcolici, abitudini alimentari

Per identificare e determinare il grado di neurotossicità sono stati impiegati i criteri adottati dal National cancer institute, un sistema che include criteri e definizioni per definire e quantificare la neuropatia, creando una scala graduata che comprende due elementi con una valutazione di tipo motorio e sensoriale; questa scala ha un range che va da 1 a 5 (Molassiotis et al, 2019).

I dati sono stati riassunti utilizzando la statistica descrittiva; il test del chi-quadrato ha mostrato differenze nelle variabili categoriche, mentre i test di student sono stati impiegati per comparare le variabili continue; Modelli di regressione logistica sono stati utilizzati per l'analisi dei fattori di rischio principali, mentre le covariazioni rilevanti per l'inclusione iniziale del modello, sono state identificate usando un'analisi multivariata, con regole per il trattenimento delle variabili nel modello (valore  $p < 0,20$ ); Il modello finale così includeva solamente le variabili significative; Questo approccio è raccomandato per rimuovere le covariazioni non rilevanti, quindi è molto più adatto per un insieme di variabili che possono venire analizzate con tecniche statistiche più complesse (Ottiano et al, 2016; Armstrong et al, 2005).

Dai risultati è emerso che l'incidenza di CIPN in sei mesi era del 30% (Eckoff et al, 2015). Pazienti che hanno ricevuto chemioterapie a base di farmaci di platino hanno meno del 17%-27% di probabilità di sviluppare CIPN, rispetto a quelli che invece hanno ricevuto una chemioterapia a base di taxani. Per quanto riguarda l'età dei pazienti analizzati, l'anzianità contribuisce qualche volta alla CIPN. Storie di neuropatie preesistenti erano correlate nello specifico con la neuropatia motoria, per cui i pazienti che avevano una storia precedente di neuropatia erano sottoposti a un rischio di 8 volte maggiore nello sviluppare la CIPN di tipo motorio. Per quanto riguarda l'utilizzo di farmaci in terapie concomitanti, l'utilizzo di statine rappresentava un fattore di rischio per la CIPN, sebbene questo risultato non sia stato confermato a causa del ridotto numero di pazienti riceventi statine nel campione in analisi (Molassiotis et al, 2019). Per di più, un lavoro più recente proveniente da un studio caso-controllo dimostrò che qualsiasi utilizzo delle statine non era associato a un elevato rischio di polineuropatia, rimane certo però che questi risultati necessitano di ulteriori elaborazioni nel futuro, perché un rischio di questo tipo esiste, anche se minimo. Un altro farmaco che

rappresenta un potenziale fattore di rischio, come abbiamo detto prima è il metronidazolo; l'incidenza di sviluppare CIPN nei pazienti che lo assumono è alta (fino al 41,7%), infatti la letteratura suggerisce l'insorgenza di una neuropatia sensoriale autonoma come risultato della sua co-somministrazione alla chemioterapia (Ottiano et al, 2016).

L'insieme dei sintomi è una nuova variabile implicata nello sviluppo della CIPN; di 18 sintomi specifici, due di questi hanno mostrato una forte correlazione con la CIPN, tra cui la costipazione e la difficoltà di memoria; il nesso tra neuropatia autonoma e costipazione potrebbe essere il risultato di una disautonomia neurogena/intestinale, oppure la costipazione potrebbe essere essa stessa un'indicazione di neuropatia autonoma. Le difficoltà cognitive causate dalla CIPN potrebbero essere dovute invece a una neuro-infiammazione post-chemioterapica, indicata come potenziale meccanismo di insorgenza dei danni comportamentali (Armstrong et al, 2005). Il ruolo dell'utilizzo cronico di alcol è tuttavia meno chiaro, i risultati suggeriscono che il mancato consumo di alcol esercita un effetto protettivo nella CIPN, ma questo non può essere confermato, in quanto come nel caso delle statine, il campione oggetto di studio comprendeva un numero ridotto di consumatori di bevande alcoliche e questo potrebbe aver impattato sui risultati; più che altro l'utilizzo di alcol, come il diabete, potrebbe essere associato allo sviluppo di neuropatia prima dell'inizio della chemioterapia e abbiamo visto che la presenza di una neuropatia preesistente rappresenta un fattore di rischio cruciale della CIPN. Parlando della chemioterapia, non c'entra tanto la dose cumulativa quanto piuttosto il periodo successivo all'inizio della chemioterapia, il quale può essere correlato allo sviluppo di CIPN, suggerendo appunto che quest'ultima sia tempo-dipendente piuttosto che dose-dipendente, anche se la correlazione tra la dose cumulativa e la CIPN è stata riportata in precedenza nella letteratura. Altri fattori di rischio, come un indice elevato di massa corporea e l'obesità non sono stati approfonditi nelle analisi, ma potrebbero essere inclusi nel futuro (Bao et al, 2016).

## CAPITOLO 6

### PREVENZIONE E TRATTAMENTO DEGLI EFFETTI NEUROPERIFERICI DELLA CHEMIOTERAPIA: INTRODUZIONE

Nella pratica clinica, diversi farmaci sono impiegati per trattare la neuropatia periferica da chemioterapici, Tra questi abbiamo la pregabalina, gli antidepressivi triciclici e gli inibitori del reuptake di noradrenalina e serotonina (Brewer et al, 2016). Tuttavia la maggior parte di questi farmaci hanno mostrato un'efficacia ridotta, ad eccezione della duloxetina, farmaci come la metformina e la venlafaxina necessitano di un'ulteriore conferma della loro efficacia.

E' stato introdotto il concetto del "drug repositioning", ovvero nuove indicazioni terapeutiche per farmaci già esistenti con l'obbiettivo di identificare azioni inaspettate dei farmaci già approvati da impiegare nella pratica clinica, con il vantaggio di ridurre la durata e il costo dello sviluppo farmacologico perché i profili di farmacocinetica e sicurezza dei farmaci così approvati sono già stati definiti (Durand et al, 2012).

Gli studi di "drug repositioning" vengono suddivisi in studi sui meccanismi d'azione e studi basati sullo screening, utilizzando una serie di dati che includono farmaci approvati per scoprire le nuove azioni di un farmaco per la prevenzione e il trattamento della CIPN, vediamo per primi quelli basati sul meccanismo d'azione; Come abbiamo detto in precedenza, la CIPN indotta da farmaci antitumorali specifici è accompagnata da danno neuronale correlato alla degenerazione assonale del nervo sciatico in modelli sperimentali di roditori. Diversi farmaci approvati per i disturbi neurodegenerativi sono stati indagati per capire quali di essi siano i più idonei per la prevenzione e il trattamento della degenerazione assonale e del dolore neuropatico indotti dalla chemioterapia. Tra questi, il **dimetil fumarato**, un farmaco per la terapia della sclerosi multipla, ha effetti antiossidanti mediati per mezzo della via dell'Nrf2 ed esercita quindi effetti neuroprotettivi. Se somministrato contemporaneamente all'ossaliplatino, migliora la neuropatia da esso indotta e senza interferire con l'attività antitumorale (Durand et al, 2012).

Un altro esempio è il **donepezil** (Tabella2), inibitore dell'acetilcolinesterasi, impiegato principalmente per il morbo di Alzheimer. Anch'esso efficace nella prevenzione della degenerazione neuronale in modelli in vitro e in vivo, tuttavia esistono diversi sottotipi recettoriali correlati all'acetilcolina alla stessa maniera abbiamo bisogno di antagonisti e agonisti specifici per questi sottotipi, per controllare i segnali dell'acetilcolina importanti nel trattamento della CIPN (Kawashiri et al, 2019).

Per quanto riguarda gli studi basati sul meccanismo d'azione dei chemioterapici, l'inibizione dell'uptake degli stessi nel sistema nervoso è una strategia promettente per prevenire la neuropatia periferica; OCT2 o OATP1B2 sono trasportatori predominanti espressi nei gangli della radice dorsale e regolano l'uptake di ossaliplatino e paclitaxel rispettivamente ed è qui che può essere utilizzata la **cimetidina** (Tabella 2), antistaminico approvato per il trattamento dell'ulcera peptica, inibitore competitivo di OCT2 in grado di prevenire anche l'allodinia fredda acuta dopo il trattamento con ossaliplatino (Sprowl et al, 2013). Anche altri antitumorali possono venirci utili in questa azione: un caso è quello del **nilotinib** (Tabella 2), farmaco impiegato nel trattamento della leucemia mieloide cronica e appartenente alla famiglia di inibitori delle tirosin chinasi che blocca l'attività di trasporto di OATP1B2 sopprimendo l'insorgenza del dolore neuropatico indotto dal paclitaxel (Chen et al, 2017).

Anche i canali ionici sono coinvolti nel meccanismo d'azione dei chemioterapici e in particolare, basandoci sul processo di sovra-regolazione di TRPM8 (sovra-espressione dei nocicettori TRP responsabili dell'iperalgnesia), diversi inibitori di canali ionici sono stati esaminati per la prevenzione dell'allodinia fredda indotta da ossaliplatino. La co-somministrazione di **nifedipina** e **diltiazem** (Tabella 2), bloccanti dei canali del calcio di tipo L, insieme agli inibitori dei canali di Na<sup>+</sup> come mexiletina (Tabella 2), prevengono l'allodinia. A sostegno di ciò, uno studio retrospettivo su 69 pazienti ricevuti ossaliplatino ha dimostrato che 26 di essi che nel contempo hanno ricevuto un trattamento con bloccanti dei canali del calcio, tra cui **nifedipina**, **amlodipina** e **diltiazem** (Tabella 2), hanno avuto una bassa incidenza di ipersensibilità al freddo da ossaliplatino comparata con 43 pazienti usati come controllo (p=0,0438) (Brewer et al, 2016).

Tra i meccanismi d'azione che comportano neurotossicità, bisogna menzionare l'interferenza dei farmaci, in particolare i derivati del platino, con l'omeostasi del glutammato. Il **riluzolo** (Tabella 2) è un possibile candidato per la prevenzione della neuropatia periferica indotta da ossaliplatino attraverso meccanismi multipli, modula le attività di diversi canali ionici tra cui TRPM8 e TREK1 riducendo l'allodinia, in più l'ossaliplatino non riesce ad interferire con l'omeostasi del glutammato nel cordone spinale, dopo trattamento con riluzolo, questo anche nei neuroni dei gangli della radice dorsale (Yamamoto et al, 2018). Tuttavia in uno studio recente di un campione limitato la co-somministrazione di riluzolo non è risultata efficace contro la neuropatia indotta da ossaliplatino. Sono necessari ulteriori studi clinici condotti su larga scala per chiarire il ruolo effettivo del riluzolo. Il trattamento si focalizza nella compromissione dell'omeostasi del

glutammato con attivazione eccessiva di vie del segnale nel sistema nervoso centrale, come si è visto per la **memantina** e **ifenprodil** (Tabella 2), due farmaci approvati che avevano dimostrato efficacia nella CIPN indotta da ossaliplatino, per mezzo dell'inibizione dell'attività del recettore NMDAR (recettore dell'N-metil-D-aspartato).

Altri farmaci già approvati che secondo le evidenze scientifiche possono essere impiegati nella risoluzione della neuropatia periferica sono gli antidiabetici, specialmente quelli correlati al *glucagone-like peptide-1* (GLP-1), come gli agonisti del recettore GLP-1 e inibitori della dipeptidil peptidasi 4. Gli studi condotti sui modelli murini dopo trattamento con **exenatide** e **alogliptin** (antidiabetici, Tabella 2) hanno dimostrato una riduzione della degenerazione assonale e dell'allodinia meccanica (Chen et al, 2017).

Ora vediamo l'altra strategia, basata sullo screening. Negli ultimi 5-10 anni, le librerie di dati contenenti tutti i farmaci approvati sono state ampiamente utilizzate per indagare su funzioni farmacologiche non ancora note; come ben sappiamo, uno dei marker di CIPN è la degenerazione assonale, riprodotta in modelli cellulari in vitro nella forma di lunghezza accorciata del neurite o di branche del neurite ridotte, usando modelli *in vitro*, gli studi di drug repositioning hanno scoperto effetti neuroprotettivi inaspettati per alcuni farmaci già approvati, come per esempio il **fulvestrant** (Tabella 2), un antitumorale impiegato nel trattamento del carcinoma mammario che ha mostrato la riduzione del danno neuronale in un modello cellulare, effetti neuroprotettivi in un modello di roditore trattato con ossaliplatino, prevenendo la degenerazione assonale del nervo sciatico e lo sviluppo sempre di allodinia meccanica (Yamamoto et al, 2018); in un approccio simile, **minoxidil** e **pirenzepina** (Tabella 2), farmaci approvati per l'ipertensione/alopecia e ulcera peptica rispettivamente, hanno anch'essi dimostrato di essere neuroprotettivi. Nello specifico, il minoxidil è neuroprotettivo e contrasta i danni neuronali del paclitaxel nei neuroni DRG, alleviando la CIPN indotta dal paclitaxel attraverso l'inibizione della neuroinfiammazione e rimodellando anche lo squilibrio nell'omeostasi del calcio nei neuroni DRG (Chen et al, 2017). La pirenzepina invece ha dimostrato nel topo un effetto protettivo nei confronti della neurodegenerazione periferica causata da chemioterapici, diabete e proteine dell'envelope dell'HIV tramite l'azione antagonista al recettore colinergico muscarinico di tipo 1 migliorando anche la disfunzione mitocondriale.

Come discusso in precedenza, molti enzimi e trasportatori di farmaci sono implicati nel ridotto metabolismo o nell'accumulo dei chemioterapici all'interno dell'organismo, generando come abbiamo visto effetti neurotossici. Per questo è stato effettuato uno screening su larga scala di composti (circa 8086) e di questi ne è stato identificato uno,

approvato dall’FDA, appartenente alla classe farmacologica degli inibitori di tirosin chinasi, nello specifico il **dasatinib** (Tabella 2), anch’esso un antitumorale; è un potente inibitore del trasportatore di cationi organici OCT2, coinvolto nell’uptake dell’ossaliplatino nei neuroni DRG, grazie a questa sua azione, il trattamento con dasatinib è sufficiente per ridurre l’accumulo di platino a livello neuronale, diminuendo di conseguenza anche lo sviluppo del dolore neuropatico indotto da ossaliplatino (Sprowl et al, 2016).

Per quanto riguarda gli enzimi metabolici, l’attività di screening per il drug repositioning ha identificato il **telmisartan** (Tabella 2) come inibitore del citocromo CYP2J, i cui livelli risultano incrementati a livello dei neuroni DRG dopo trattamento con paclitaxel, dal quale risultano aumentati anche i livelli di mediatori lipidici pronocicettivi. Il telmisartan appartiene alla classe terapeutica degli antagonisti del recettore dell’angiotensina 2 nel trattamento dell’ipertensione ed è un potente inibitore del CYP2J e riesce a contrastare in questa maniera il dolore neuropatico indotto dal paclitaxel (LeBlanc et al, 2018).

IDrug	Approved diseases	Effects (Prevention <sup>(a)</sup> or Treatment <sup>(b)</sup> )	Proposed mechanism	References
Acetazolamide	Edema	Oxaliplatin (acute) <sup>(a)</sup>	Inhibition of carbonic anhydrase	Potenzieri et al. (2020)
Alogliptin	Type 2 diabetes mellitus	Oxaliplatin (chronic) <sup>(a)</sup> , but Not oxaliplatin (acute), paclitaxel, and bortezomib	Unknown	Shigematsu et al. (2020)
Cimetidine	Heartburn, peptic ulcers	Oxaliplatin (acute) <sup>(a)</sup>	Inhibition of OCT2	Sprowl et al. (2013)
Dasatinib	Chronic myeloid leukemia Acute lymphoblastic leukemia	Oxaliplatin (acute) <sup>(a)</sup>	Inhibition of OCT2	Sprowl et al. (2016); Huang et al. (2020)
Diiazem	Angina	Oxaliplatin (acute) <sup>(a)</sup>	Inhibition of calcium channel	Kawashiri et al. (2012)
Dimethyl fumarate	Multiple sclerosis	Oxaliplatin (chronic) <sup>(a)</sup> , but Not oxaliplatin (acute)	Activation of Nrf2 pathway	Miyagi et al. (2019)
Donepezil	Alzheimer's disease	Oxaliplatin (chronic) <sup>(a, b)</sup> , and impairment of social interaction	Attenuation of reduction of SOD activity, and Activation of acetylcholine signaling	Ferrier et al. (2015); Kawashiri et al. (2019)
Ethosuximide	Absence epilepsy	Paclitaxel <sup>(b)</sup>	Inhibition of calcium channel	Flatters and Bennett (2004)
Exenatide	Type 2 diabetes mellitus	Facilitation of recovery from oxaliplatin (chronic)	Unknown	Fujita et al. (2015)
Fingolimod	Multiple sclerosis	Paclitaxel <sup>(a, b)</sup>	Modulation of S1P receptor	Janes et al. (2014)
Fluvestrant	Breast cancer	Oxaliplatin (chronic) <sup>(a)</sup> , but Not oxaliplatin (acute)	Unknown	Yamamoto et al. (2019)
Ifenprodil	Dizzy after cerebral hemorrhage	Oxaliplatin (chronic) <sup>(b)</sup>	Antagonism of NMDAR	Mihara et al. (2011)
Budilast	Asthma cerebrovascular disorders	Oxaliplatin (chronic) <sup>(a, b)</sup> , and impairment of memory paclitaxel-induced motor dysfunction	Inhibition of PDE inhibition of calpain protease activity	Mo et al. (2012); Johnston et al. (2017)
Memantine	Alzheimer's disease	Oxaliplatin (chronic) <sup>(b)</sup>	Antagonism of NMDAR	Mihara et al. (2011)
Mexiletine	Arrhythmia	Oxaliplatin (acute, chronic) <sup>(a, b)</sup>	Inhibition of sodium channel	Egashira et al. (2010); Kawashiri et al. (2012)
Minoxidil	Hypertension	Paclitaxel <sup>(a)</sup> , and improvement of hair quality	Prevention of SOCE dysregulation	Chen et al. (2017)
Nifedipine	Hypertension	Oxaliplatin (acute) <sup>(a)</sup>	Inhibition of calcium channel	Kawashiri et al. (2012)
Nilotinib	Chronic myeloid leukemia	Paclitaxel <sup>(a)</sup>	Inhibition of OATP1B2	Leblanc et al. (2018)
Pirenzepine	Peptic ulcer	Paclitaxel <sup>(a)</sup>	Antagonism of muscarinic M1R	Calcutt et al. (2017)
Polaprezinc	Peptic ulcer	Paclitaxel <sup>(a)</sup>	Unknown	Tsutsumi et al. (2016)
Riluzole	Amyotrophic lateral sclerosis	Oxaliplatin (acute, chronic) <sup>(a, b)</sup>	Maintenance of glutamate homeostasis Activation of TREK-1 channel inhibition of TRPM8 activation	Yamamoto et al. (2017); Poupon et al. (2018); Yamamoto et al. (2018)
Rosiglitazone	Type 2 diabetes mellitus	Oxaliplatin (acute, chronic) <sup>(a)</sup>	Agonism of PPAR $\gamma$	Zanardelli et al. (2014)
Tadalafil	Benign prostatic hyperplasia Erectile dysfunction	Oxaliplatin (acute, chronic) <sup>(a, b)</sup>	Inhibition of PDE5	Ogihara et al. (2019)
Telmisartan	Hypertension	Paclitaxel <sup>(a, b)</sup>	Inhibition of CYP2J	Sisignano et al. (2016a)
Thrombomodulin $\alpha$	Disseminated intravascular coagulation	Oxaliplatin (chronic) and Paclitaxel <sup>(a, b)</sup> , but Not oxaliplatin (acute)	Degradation of HMGB1	Nishida et al. (2016); Tsubota et al. (2019)
Topiramate	Seizures	Oxaliplatin (acute) <sup>(a)</sup>	Inhibition of carbonic anhydrase	Potenzieri et al. (2020)

Tabella 2: Potenziali candidati del “drug repositioning” per la CIPN identificati negli studi preclinici.

Legenda: CYP2J( Cytochrome-P<sub>450</sub>-epoxygenase 2J);HMGB1( High-mobility group box 1); NMDAR( N-methyl-D-aspartate receptor); Nrf2( Nuclear factor-erythroid-2-related factor 2); OATP1B2( Organic anion-transporting polypeptide B2); OCT2( Organic cation transporter 2; PDE( Phosphodiesterase); PPAR $\gamma$ ( Peroxisome proliferator-activated receptor gamma); S1P( Sphingosine 1-phosphate); SOCE( Store-operated calcium entry); SOD( Superoxide dismutase); TREK1( Potassium channel subfamily K member 2); TRPM8( Transient receptor potential channel melastatin 8). (Yamamoto, Egashira, 2021).

## CAPITOLO 7

### NEUROTOSSICITA' DA COMPOSTI DEL PLATINO

Gli agenti chemioterapici a base di platino (ossaliplatino, cisplatino e carboplatino) sono utilizzati nel trattamento della maggior parte dei tumori solidi; i principali distretti anatomici danneggiati da questi farmaci sono i gangli della radice dorsale del midollo spinale (**DRG**) e si manifestano come neuropatia sensitiva caratterizzata da dolore accompagnato da allodinia da freddo e crampi muscolari, a causa dell'ipereccitabilità dei nervi periferici (Figura 6). Vediamo ora i principali meccanismi di patogenesi indotti dai composti del platino; prendiamo come esempio l'ossaliplatino, questo si accumula nei neuroni del DRG a causa della sovra-espressione dei trasportatori OCTN1/2 (*Organic Cation Transporter 1/2*) e MATE1 (*Multidrug and Toxic Extrusion 1*), i quali sono due sistemi implicati nel trasporto di cationi organici tra cui anche i farmaci (Fujita et al, 2019).

L'ossaliplatino interferisce con il meccanismo di cross-linking del DNA non solo nelle cellule tumorali, ma anche in quelle neuronali, determinando neurotossicità diretta (Banach et al, 2017) e attivazione precoce della via di segnale ERK1/p38, riduzione della respirazione mitocondriale, incremento dello stress ossidativo e apoptosi dei neuroni del DRG (Figura 6) (Scuteri et al, 2009). Gli studi effettuati su colture cellulari hanno mostrato un'elevata atrofia dei corpi cellulari dei neuroni dovuti all'apoptosi, quando esposti all'azione dell'ossaliplatino e questa azione era ben distinguibile da quella di altri agenti chemioterapici neurotossici come il paclitaxel, in quanto questi ultimi determinavano principalmente un'assonopatia (disfunzione dovuta a danno assonale), mentre l'ossaliplatino promuoveva quindi un danno maggiore ai corpi cellulari (Figura 6).

La neuropatia periferica indotta da ossaliplatino (OIPN) è anche correlata alla disfunzione mitocondriale, soprattutto nei complessi respiratori I e II, perché gli agenti del platino insieme ai loro metaboliti, formano addotti con il DNA mitocondriale e interferendo con la replicazione e la trascrizione di quest'ultimo, determinano una riduzione dei mitocondri nei corpi cellulari dei neuroni (Ta et al, 2006).

L'ossaliplatino interagisce con i canali ionici voltaggio-dipendenti presenti nei motoneuroni periferici (Na e K), i canali del potassio voltaggio-dipendenti sono implicati nella fase acuta della neuropatia periferica, nella quale i pazienti manifestano ipereccitabilità nervosa determinata da una depolarizzazione prolungata e contrazioni muscolari (Lehky et al, 2004), ad esempio l'eccitabilità delle fibre C e A $\delta$  del ramo mascellare del nervo trigemino, è

controllata dai canali del potassio voltaggio-dipendenti. Nello specifico, la riduzione della velocità di conduzione del potassio attraverso la fibra nervosa, dovuta all'interazione dell'ossaliplatino con i canali del potassio appena menzionati, determina anche una lenta inattivazione dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (Figura 6), riducendo così il potenziale di membrana a riposo nelle fibre nervose, tutto questo avviene nella fase acuta della OIPN (Makker et al, 2020).

I canali del sodio voltaggio-dipendenti sono coinvolti anche nella comparsa di iperalgesia fredda insieme all'attivazione della via di segnale del recettore **TRPA1** (*Transient Potential Receptor Cation A1*) e dell'MAPK/p38 (*Mytogen Activated Protein Kinase*) nei neuroni dei DRG; nello specifico risulta aumentata l'attività dell'isoforme Nav1.6 e Nav1.9, le quali stimolano in maniera significativa la trasmissione del segnale doloroso anche nei neuroni periferici. **TRPA1**, fa parte della famiglia dei recettori a potenziale transiente e non è il solo ad essere coinvolto nel dolore neuropatico, anche TRPM8 (*Transient Receptor Potential Melastatin-8*) esercita un potenziale ruolo nell'allodinia indotta da freddo (Figura 6) (Kono et al, 2012).

L'ipersensibilità al dolore è dovuta soprattutto ad una risposta immunologica caratterizzata da un incremento dei **linfociti CD4+ e CD8+**, tramite una riduzione delle cellule T-regolatorie, ponendo così le basi per l'instaurarsi dello stato infiammatorio (Fumagalli et al, 2021), è presente infatti un aumento dei livelli di produzione delle principali citochine pro-infiammatorie (TNF<sub>alfa</sub> e IL-1 $\beta$ ) (Figura 6) e contemporaneamente una riduzione delle citochine neuroprotettive (IL-10 e IL-4) (Wahiman et al, 2018; Hu et al, 2018).

Le vie di segnale responsabili del rilascio delle citochine pro-infiammatorie sono innescate dall'attivazione di **Toll-like receptors (TLR)**, ovvero i mediatori dell'immunità innata. Questi recettori sono proteine trans membrana e intra-citoplasmatiche normalmente preposte alla rilevazione di agenti patogeni. Una volta attivati, inducono una cascata di attivazione di diverse vie del segnale, come quelle della **protein chinasi attivata dai mitogeni (MAPK)**, **fosfoinositide 3 chinasi (PI3K)**, **fattore nucleare  $\kappa$  di attivazione delle catene leggere delle cellule B (NF- $\kappa$ B)** e il **fattore 3 di attivazione della trascrizione (ATF3)**. In particolare, ATF3 oltre a regolare il segnale intracellulare di attivazione dei TLR, è considerato un marcatore di danno nervoso soprattutto nei neuroni nocicettivi delle cellule primarie della radice dorsale (**DRG**) (Byrd-Leifer et al, 2001).

L'attivazione di queste vie di segnale, spesso comprendenti anche altre proteine co-effettrici, determinano un incremento dell'espressione e del rilascio di citochine e chemochine pro-infiammatorie sia nel sistema nervoso centrale che periferico. Le citochine sono molecole

coinvolte nella risposta immunitaria, rilasciate non solo dalle cellule immunitarie, ma anche dai neuroni e dalle cellule gliali. Esse Possono agire direttamente o indirettamente sulle fibre sensitive afferenti, nei neuroni dei gangli della radice dorsale (**DRG**) e nei neuroni del corno dorsale spinale, determinando sensibilizzazione al dolore (Boyette-Davis et al, 2015). In particolare, un aumento significativo delle interleuchine **IL-1 $\beta$** , **IL-6** e **TNF- $\alpha$**  si è riscontrato nei neuroni DRG dopo la somministrazione di cisplatino o ossaliplatino (Miguel et al, 2019; Basu et al, 1992; Kroigard et al, 2019).

Le chemochine, invece, sono un insieme di citochine che svolgono attività chemio tattica di richiamo delle cellule immunitarie e hanno un ruolo decisivo nell'attivazione e nell'infiltrazione dei macrofagi e delle cellule gliali, responsabili dell'insorgenza del dolore neuropatico. Infatti l'ossaliplatino per esempio induce un aumento dell'espressione delle chemochine **CCL2** e dei loro recettori nei neuroni del DRG, confermando il loro ruolo nel dolore neuropatico (Ilias et al, 2018).

Se i neuroni DRG rappresentano il target principale della neurotossicità da platino, le cellule gliali satelliti e di Schwann nel sistema nervoso periferico, sono state descritte come co-protagoniste nello sviluppo della neuro-infiammazione. In seguito ad una lesione nervosa periferica, le cellule gliali satelliti vengono attivate subendo anche delle alterazioni morfologiche e funzionali, soprattutto dovute al trattamento con ossaliplatino . Esperimenti effettuati su ratti trattati con ossaliplatino, hanno dimostrato che è stato possibile rilevare la presenza di alcuni marcatori di attivazione gliale tramite un aumento dell'espressione della **proteina acida fibrillare gliale** nei neuroni DRG, associata anche ad un incremento delle giunzioni comunicanti intercellulari tra cellule gliali, come parte integrante del processo di attivazione gliale (Warwick et al, 2013).

Per quanto riguarda i nervi periferici, l'analisi istopatologia dei nervi sciatici di ratti trattati con cisplatino, ha rivelato la presenza di un danno tissutale da apoptosi e degenerazione assonale dovuta alla perdita della guaina mielinica, associata a una aumentata produzione di TNF- $\alpha$  (Sharawy et al, 2015). I processi infiammatori sono stati analizzati anche a livello dell'epidermide. In particolare, la riduzione della densità delle fibre nervose intraepidermiche associata a trattamento con ossaliplatino è stata associata alla presenza di ipersensibilità a stimoli meccanici, dovuta a sua volta a rilascio di citochine infiammatorie. Tra queste, un incremento dell'IL-8 nell'epidermide e la conseguente attivazione delle vie di segnale a cascata, potrebbe essere responsabile della denervazione epidermica (Brandolini et al, 2019).

Da studi effettuati su cellule accessorie coinvolte in questi processi, oltre alla microglia, si è riscontrato un ruolo chiave degli astrociti nell'attivazione dei processi neuro-infiammatori. Infatti si è potuto constatare che nel cordone spinale di ratti trattati con ossaliplatino, un incremento del numero di astrociti era associato a dolore neuropatico (Robinson et al, 2014), agendo anch'essi al pari delle cellule gliali, con produzione della proteina acida fibrillare gliale e con una attivazione delle giunzioni comunicanti per l'adesione cellulare (Tonkin et al, 2018). Gli astrociti determinano l'innesco del processo infiammatorio perché aumentano l'espressione di NOD-like receptor leucine-rich repeat and pyrin domain-containing protein 3 (**NLRP3**), un complesso molecolare che viene attivato da segnali di pericolo e che, tramite produzione di IL-1 $\beta$  e del conseguente stato infiammatorio, vanno a costituire un complesso multiproteico citoplasmatico di segnalazione intercellulare noto come inflammasoma (Wahlman et al, 2018).

I composti del platino determinano stati infiammatori anche nelle aree superiori del sistema nervoso centrale. L'attivazione gliale infatti è stata rilevata anche in alcune aree corticali preposte alla segnalazione del dolore, confermato dal fatto che le citochine infiammatorie sono state riscontrate a livelli elevati anche nella corteccia cerebrale (Di Cesare Mannelli et al, 2013; Di Cesare Mannelli et al, 2015; Di Cesare Mannelli et al, 2014).

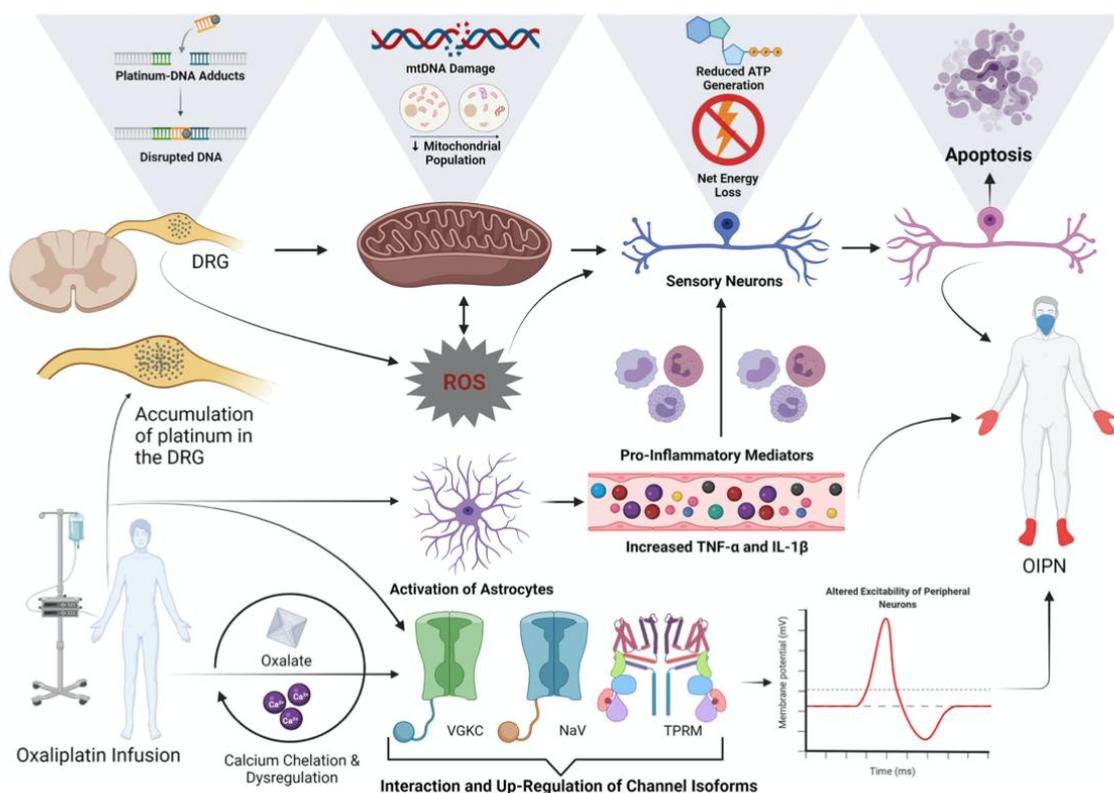


Figura 6: Meccanismi patogenetici della neuropatia periferica indotta da ossaliplatino (Burgess et al, 2021)

### **7.1 Trattamento della neuropatia periferica indotta da composti del platino**

I composti del platino, cisplatino, carboplatino e ossaliplatino, sono comunemente impiegati nel trattamento del carcinoma colon-rettale, del carcinoma gastrico e mammario di solito in combinazione con altri agenti chemioterapici. La neuropatia periferica indotta da platino è generata dall'accumulo di platino nel sistema nervoso periferico, la cui prevenzione e trattamento rappresenta una grande sfida (Rothenberg et al, 2003; Krarup-Hansen et al, 2007).

Il meccanismo antitumorale dei farmaci a base di platino consiste in un danno diretto alla struttura del DNA con incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e l'eccesso di questi prodotti, tra cui anione superossido, ossigeno singoletto, perossido di idrogeno e radicale ossidrilico, induce fenomeni ossidativi che sono dannosi per le cellule neuronali (Figura 7). La neuropatia periferica da platino si suddivide in acuta e cronica, la forma acuta insorge di solito poche ore dopo la somministrazione del composto ed è indotta anche dall'esposizione a basse temperature, mentre la forma cronica compare dopo il raggiungimento di una determinata dose cumulativa ed è caratterizzata da una perdita sensoriale causata dall'accumulo del farmaco nel sistema nervoso periferico (Khasabova et al, 2019).

Il meccanismo di danno che è più imputabile ai composti del platino è dovuto anche al fatto che viene compromessa l'attività degli enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi e la catalasi (Figura 7), le quali svolgono un ruolo importante nella progressione della neuropatia da acuta a cronica (Lim et al, 2010; Stanford et al, 2019). La produzione di ROS indotta dal platino interferisce con la normale funzione di DNA, mitocondri, microtubuli, canali ionici e altre biomolecole, induce neuroinfiammazione, demielinazione e apoptosi neuronale; infatti i composti ROS sono considerate una "lama a doppio taglio" in quanto sono un'arma efficace contro i tumori ma contemporaneamente possono provocare effetti tossici in altri distretti dell'organismo.

L'approccio ideale consiste quindi nell'attenuare la neuropatia periferica indotta da platino, ma simultaneamente mantenere l'efficacia antitumorale, regolando i livelli di ROS nei tessuti normali riservandoli esclusivamente ai tessuti tumorali (Xi Hu et al, 2021). A tal fine sono stati utilizzati alcuni antiossidanti per il trattamento della neuropatia periferica nei trials clinici e negli studi effettuati su animali, utilizzando sistemi di targeting molecolare che permettono di indirizzare l'azione antiossidante specificamente nelle cellule dei tessuti

normali; questi sistemi sono rappresentati dalle nanotecnologie, che hanno un ruolo decisivo nel prevenire e alleviare la neuropatia periferica attraverso due strategie, la prima consiste nel direzionare o indirizzare l'accumulo dei composti di platino nei tessuti tumorali diminuendo gli effetti "off-target", mentre la seconda consiste nel trasportare agenti antiossidanti all'interno del sistema nervoso periferico (Xi Hu et al, 2021).

Prima di parlare di questo però, vedremo in che modo i composti del platino riescono ad accumularsi nelle strutture del sistema nervoso periferico e tra queste, soprattutto i gangli della radice dorsale. I DRG, composti principalmente da cellule sensitive, neuroni e cellule effettrici, giocano un ruolo determinante nel processo di insorgenza della PIPN (Podratz et al, 2017). Il danno mitocondriale e lo stress ossidativo da platino infatti sono stati attribuiti al fatto che i composti sono in grado di accumularsi nei DRG e cioè, è dovuto all'azione di alcuni trasportatori, in particolare i trasportatori OCT che sono le proteine di estrusione delle tossine e i trasportatori del rame (Figura 7). Essi incrementano l'accumulo di platino nei nervi periferici come primo step per l'insorgenza di PIPN. I livelli di accumulo dei composti di platino nei DRG è 10-20 volte più alto che in altre cellule nervose ed è attribuito a un'elevata espressione dei trasportatori specifici per questi farmaci (Sprowl et al, 2013; Fujita et al, 2019).

Tra queste molecole trasportatrici, CTR1 (*High Affinity Copper Uptake Protein*) (Figura 7), composta da tre motivi ricchi in metionina altamente conservati, è coinvolta principalmente nel trasporto dei farmaci agendo come un trasportatore canale. I primi due motivi arricchiti in metionina e il terzo sono localizzati nel dominio N-terminale extracellulare e alla fine del secondo dominio strutturale transmembrana, rispettivamente; quando l'agente a base di platino interagisce con i residui proteici accessibili, forma all'inizio un intermedio che induce un cambiamento conformazionale in CTR1 e permette all'agente di passare lateralmente attraverso il canale trimetrico, muovendosi all'interno per mezzo delle strutture a ponte disolfuro intermolecolari (Yonezawa, Inui, 2011). A sostegno di ciò, l'uptake cellulare degli agenti a base di platino può essere ridotto dell'80% dopo abbassamento dei livelli di espressione di CTR1 nelle cellule di topo (Liang et al, 2009; Kuo et al, 2021).

Per quanto riguarda OCT, è una proteina trasportatrice attiva la quale media l'endocitosi e l'efflusso di cationi organici guidati dai potenziali negativi transmembrana. Inoltre poiché il trasporto cellulare mediato dagli OCT è cumulativo e ben più attivo rispetto a CTR1, gli OCT sono il meccanismo chiave per l'esacerbazione della PIPN insieme a MATE1 (Figura 7) responsabile della secrezione dei farmaci cationici utilizzando il gradiente di ioni  $H^+$  ed è coinvolto nell'efflusso dei composti del platino tanto quanto altri cationi organici, siano essi

esogeni o endogeni (Fujita et al, 2019). Nell'insieme il trasporto cellulare dei farmaci a base di platino è mediato dall'uptake via OCT e dall'efflusso via MATE1, rispettivamente. Di conseguenza, possono essere utilizzate come bersagli terapeutici per prevenire lo sviluppo di PIPN (Yang et al, 2021, Yokoo et al, 2007).

Per quanto riguarda i canali ionici, TRP (*Transient receptor potential*) è determinante nell'aggravare il dolore da sensibilità al freddo e tra questi, TRPA1 (*Transient Receptor Potential Cation Channel A1*) e il TRPM8 (*Transient receptor potential Melastatin-8*) (Figura 7), potrebbero essere attivati dalle ROS, in particolare, ROS attiva TRPA1 ossidando i residui di cisteina e TRPM8, aumentando l'influsso di ioni  $Ca^{2+}$  e i livelli di ADP-ribosio nei mitocondri (Shimizu et al, 2014; Miyake et al, 2016). In condizioni di ossidazione, TRPV1 sovraesprime il recettore per il fattore di necrosi tumorale (TNFR) nelle cellule DRG, attraverso la via di segnale mediata dai prodotti dell'ossidazione, ottenendo il legame tra TNF-alfa e il suo recettore e scatenando così la risposta infiammatoria responsabile della nocicezione (Anderson et al, 2008).

Anche alcuni canali ionici voltaggio-dipendenti, come quelli del sodio, del calcio e del potassio, possono essere ossidati dalle ROS alterando conseguentemente l'eccitabilità e la conduzione neuronale. Ad esempio, quando i canali del potassio voltaggio-dipendente (KVS-1) vengono ossidati (Figura 7), sono in grado di condurre più corrente (impulso nervoso) e così compromettono il segnale in uscita nei DRG (Patel, Sesti, 2016); tra i canali del  $Ca^{2+}$  voltaggio-dipendenti, il recettore della rianodina (RyR), è quello più sensibile allo squilibrio di tipo ossidoriduttivo (Figura 7), si apre e libera  $Ca^{2+}$  dopo ossidazione, ma i composti ROS possono indurre il rilascio di calcio anche attivando i recettori dell'inositolo 1,4,5-trifosfato, variando la permeabilità dei mitocondri. questo evento a sua volta determina un ulteriore rilascio massivo di ROS in una reazione a catena (Oda et al, 2015). I canali dell' $Na^+$  voltaggio-dipendenti invece svolgono il loro ruolo principale nei neuroni DRG come iniziatori e conduttori dei potenziali d'azione; se abbiamo una modificazione in questi recettori, a sua volta verrà alterata l'eccitabilità neuronale normale, responsabile dell'insorgenza del dolore da sensibilità al freddo (Figura 7). Nello specifico, gli agenti del platino prolungano i tempi di apertura del canale NaV1.6 aumentando la corrente degli impulsi elettrici nei neuroni DRG e il tutto aggrava il dolore da sensibilità al freddo (Furgala-Wojas et al, 2020).

Infine, la produzione di ROS indotta da platino promuove la secrezione di citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF-alfa, IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL2 e altri (Figura 7); queste citochine infiammatorie sensibilizzano i recettori periferici del dolore mediante l'infiltrazione dei

macrofagi e la neuroinfiammazione che ne deriva (Ozturk et al, 2005). Tra le specie reattive dell'ossigeno, il perossido di idrogeno è stato confermato come induttore del danno ossidativo soprattutto a livello del DNA dei neuroni sensitivi, mentre l'anione superossido e il radicale ossidrilico agiscono per lo più con meccanismi misti tra quelli visti finora (Celik et al, 2020).

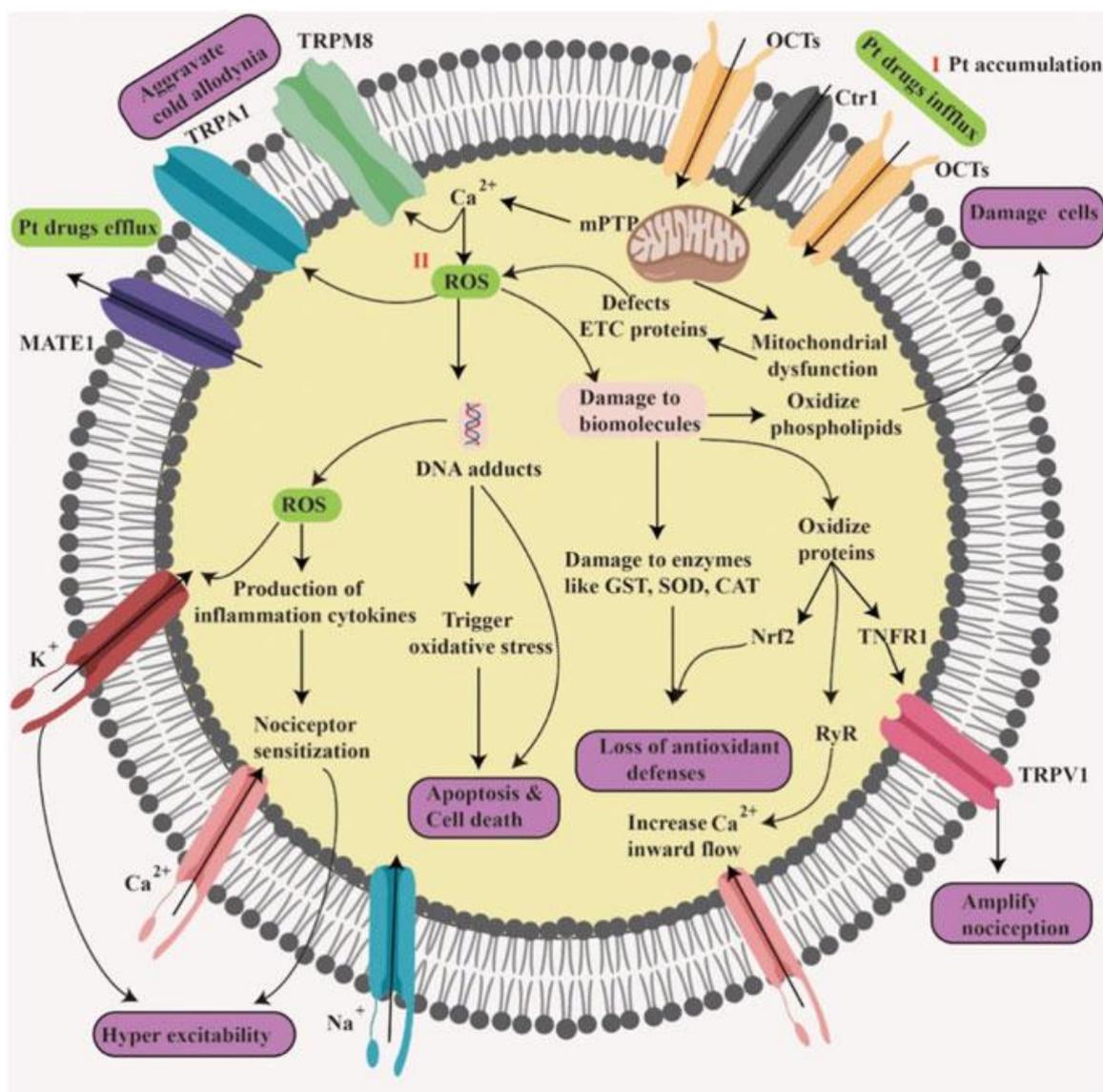


Figura 7: Meccanismi correlati alle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella neuropatia periferica indotta da platino (PIP) (Xi Hu et al, 2021).

Le principali strategie terapeutiche per prevenire o attenuare la neuropatia periferica indotta da agenti del platino, sono in particolare molecole con attività anti-ROS le quali possono alleviare, con entità variabile, i sintomi della PIPN; sono stati valutati tre antiossidanti: N-acetilcisteina, acido alfa lipoico e vitamina E (Agnes et al, 2021).

Questi tre antiossidanti diminuivano la produzione di ROS ed erano in grado di eliminare la neuro-infiammazione nei modelli di topo trattati con ossaliplatino, senza interferire con l'efficacia antitumorale di quest'ultimo. Oltre a questi tre, il composto 7-cloro-4-(fenilselanil) chinolina (4-PSQ) è stata studiata per i suoi effetti antiossidanti, antinocicettivi e neuroprotettivi, ed è risultato che non solo abbassa i livelli di ROS nel cordone spinale, nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, ma è anche in grado di normalizzare l'attività e l'espressione degli enzimi antiossidanti (Agnes et al, 2021).

Per quanto riguarda invece i farmaci, il donepezil, un inibitore dell'acetilcolinesterasi, migliora l'allodinia meccanica indotta da ossaliplatino e la degenerazione assonale del nervo sciatico in un modello di ratto e questo effetto neuroprotettivo è dovuto soprattutto alla sua abilità di disattivare i radicali liberi (Kawashiri et al, 2019). Il dimetil fumarato insieme al suo metabolita, monometil fumarato, un farmaco in uso per il trattamento della sclerosi multipla, mostra un effetto neuroprotettivo dallo stress ossidativo tramite l'attivazione della via di segnale di Nrf2 in alcune linee cellulari; la somministrazione di dimetil fumarato ai pazienti (200 mg/Kg, 5 volte a settimana per un mese), alleviava l'allodinia meccanica e la degenerazione assonale indotta da ossaliplatino (Kawashiri et al, 2019).

Oltre a questi ci sono due farmaci che sono in grado di mimare l'attività dell'enzima superossido dismutasi mitocondriale. Si tratta di composti impiegati come mezzo di contrasto, utilizzati nella risonanza magnetica d'immagine a base di manganese, mangafodipir e calmangafodipir, impiegati anche come protettori cellulari; mangafodipir è un chelato del manganese con fodipir, (composto derivato della vitamina B6), dove il manganese è il mezzo di contrasto nella MRI, mentre fodipir come agente neuroprotettivo nei pazienti oncologici affetti da neuropatia periferica (Coriat et al, 2014).

I risultati dimostrano che la neuropatia si stabilizza o migliora nel 77% dei pazienti a cui viene co-somministrato mangafodipir insieme ad ossaliplatino dopo 4 cicli di trattamento. Inoltre, i pazienti trattati con mangafodipir tollerano meglio una dose di ossaliplatino cumulativa. Calmangafodipir, un derivato di mangafodipir, risulta capace di ridurre lo stress ossidativo riproducendo l'attività della superossido dismutasi e prevenire così l'allodinia meccanica, l'iperalgia termica da freddo e la riduzione della densità delle fibre nervose intraepidermiche in un modello di topo affetto da PIPN, senza compromettere l'attività antitumorale dell'ossaliplatino (Coriat et al, 2014; Glimelius et al, 2018).

Oltre ai farmaci sono stati studiati altri prodotti antiossidanti naturali per i loro effetti protettivi. Tra questi abbiamo la L-carnosina che è un dipeptide endogeno composto da Beta-alanina e L-istidina il quale funge da "scavenger" delle specie reattive dell'ossigeno e

dell'azoto. Nei pazienti con carcinoma colon-rettale che sviluppano la neuropatia periferica; la somministrazione orale giornaliera di L-carnosina (500 mg al giorno per 3 mesi) migliora in maniera significativa la neuropatia periferica, in termini di neuroinfiammazione, stress ossidativo e apoptosi (nei pazienti trattati con FOLFOX (ossaliplatino + 5-fluorouracile+ leucovorina) (Yehia et al, 2019).

Tra le molecole antiossidanti, vanno menzionati i principi attivi di estrazione dalle droghe vegetali, quindi prodotti botanici che rientrano in quella che viene definita medicina tradizionale vegetale, la quale ha dimostrato fornire un approccio terapeutico efficace per migliorare la neuropatia. Ne menzioneremo per ognuno di essi le proprietà e come possono essere d'aiuto per migliorare il quadro clinico dei pazienti affetti da PIPN (Yuan et al, 2006; Wei et al, 2020).

**THE' VERDE:** Ha proprietà antiossidanti in grado di alleviare i sintomi sensoriali della neuropatia periferica da platino, prevenendo pure le alterazioni elettrofisiologiche coinvolte (Lee et al, 2012).

**ASTRAGALO:** La droga vegetale dalla quale vengono estratti tutti i componenti attivi è la radice, i suoi costituenti principali, tra cui polisaccaridi, flavonoidi e saponine, espletano azione antiossidante; sono disponibili un estratto acquoso e due estratti idroalcolici che hanno mostrato effetti protettivi nei confronti della perossidazione lipidica indotta da ossaliplatino e anche contro l'ossidazione del DNA (Augusto et al, 2018).

**FORSYTHIAE SUSPensa:** I principi attivi si trovano nei frutti, riduce significativamente l'allodinia meccanica e la perdita di densità delle fibre nervose intraepidermiche tipica della neuropatia periferica da ossaliplatino. Forsythoside A è il componente specifico che esercita gli effetti neuroprotettivi vantati da questa specie (Yi et al, 2019).

**FORSYTHIAE VIRIDISSIMA:** In questo caso viene utilizzata come estratto in veicolo acquoso, anch'esso dai frutti, attenua la neurotossicità indotta da ossaliplatino e inibisce l'insorgenza di malformazioni nella crescita assonale nelle cellule DRG, inoltre migliora significativamente l'ipersensibilità alla stimolazione meccanica la riduzione della densità delle fibre nervose intraepidermiche nei modelli animali di topo (Cheng et al, 2017).

**CURCUMA LONGA L. :** Rappresenta un ingrediente attivo nella medicina tradizionale, la curcumina, il suo componente attivo principale, è stata studiata per la prevenzione e il trattamento della PIPN, infatti presenta un ampio spettro di attività, tra cui azione antiossidante, anti-infiammatoria e neuroprotettiva e anche una certa attività antitumorale. La curcumina incrementa notevolmente la velocità di conduzione dei nervi motori e sensitivi, riparando anche i neuroni danneggiati del cordone spinale, inoltre non solo

aumenta i livelli di enzimi antiossidanti, ma inibisce l'attivazione dei fattori pro-infiammatori mediati dallo stress ossidativo (citochine infiammatorie) (Zhang et al, 2020).

Acido rosmarinico: Componente attivo che diminuisce lo stress ossidativo ( perossidazione lipidica, livello di nitrati, frammentazione del DNA) migliorando la funzione mitocondriale e la perdita di ATP, riduce l'infiammazione ai cordoni spinali (diminuendo i livelli di citochine) e mantiene i livelli di protein chinasi attivata dall'adenosina-5'-monofosfato (AMPK) nei nervi sciatici, contrastando in questo modo l'allodinia meccanica e l'iperalgia da freddo in ratti con PIPN (Areti et al, 2018).

Quercetina e rutina: Sono state sperimentate come pre-trattamento prima di ciascuna iniezione di ossaliplatino e hanno ridotto i livelli di malondialdeide ( marcatore di perossidazione lipidica) e nitrotirosina, inibiscono la sintesi di ossido nitrico che avviene nel corno dorsale del cordone spinale, nei topi trattati con ossaliplatino; attenuano entrambi la risposta nocicettiva termica e meccanica nell'ambito della neuropatia dolorosa indotta da ossaliplatino, dimostrato dal test di immersione della coda in acqua fredda (10°C) (Azevedo et al, 2013).

I recenti sviluppi della nanotecnologia si sono dimostrati idonei per effettuare quello che viene definito "targeting specifico". Si tratta essenzialmente di due tipi di strategie che si avvalgono dei sistemi nanotecnologici per direzionare in maniera selettiva i composti del platino all'ambiente tumorale e per trasportare molecole antiossidanti direttamente ai tessuti nervosi danneggiati o alterati.

I nanosistemi contenenti il farmaco si prefiggono l'obiettivo di trasportare l'agente del farmaco direttamente al bersaglio tumorale, sono costituiti in genere da micelle polimeriche, liposomi, micro-emulsioni, nanosistemi a DNA e nanosistemi inorganici; sono stati introdotti per promuovere un' azione antitumorale più efficace e selettiva e riduce contemporaneamente l'accumulo del farmaco nei tessuti normali non bersaglio (Zhang et al, 2017; Guo et al, 2020). Vennero progettate per prime delle micelle polimeriche da 30-40 nm di diametro, contenenti il composto a base di platino e queste a loro volta assemblate con il complesso 1,2-diamminocicloesano Pt (II) e le frazioni carbossiliche del copolimero polietilenglicole-poliglutammato; le micelle polimeriche, denominate NC-4016 non solo aumentano l'attività antitumorale e le concentrazioni di farmaco intratumorali, ma prolungano anche la sopravvivenza nel modello tumorale ortotopico in cui il tumore proveniente da un organo umano viene trapiantato nello stesso organo di topi immunodeficienti, in modo che non possano quindi rigettare l'organo . Come per l'allodinia meccanica, i topi sottoposti a terapia con ossaliplatino hanno mostrato una soglia di

attivazione del dolore in seguito a uno stimolo meccanico più bassa rispetto ai topi nel gruppo di controllo ( $p < 0,001$ ) e nel gruppo trattato con NC-4016 ( $p < 0,002$ ), a sostegno della ridotta neurotossicità di NC-4016 (Yamamoto et al, 2014).

Le formulazioni liposomiali che incapsulano ossaliplatino (Lipoxal<sup>TM</sup>), potrebbero incrementare la dose massima tollerata con 30 microgrammi e ridurre la tossicità sistemica; queste nanotecnologie possono anche essere applicate per migliorare una terapia combinata in cui un composto del platino viene incorporato in questi sistemi insieme ad altri farmaci, per esempio l'ossaliplatino e l'acido folico sono stati immagazzinati insieme in micro-emulsioni acqua in olio, prodotte con la tecnica della nanoprecipitazione ( Nano-folox). Se lo confrontiamo con FOLFOX, la combinazione di Nano-Folox e 5-Fluorouracile ha ottenuto una risposta terapeutica significativamente più forte e una bassa tossicità per il trattamento del carcinoma colon-rettale (Guo et al, 2020); tuttavia i composti del platino esistono anche come pro-farmaci e hanno riscontrato attenzione, in quanto manifestano bassa tossicità nei tessuti normali e vengono attivati mediante uno stimolo che rilascia il farmaco citotossico dal pro-farmaco, così, diverse tipologie di pro-farmaci a base di platino, sensibili a stimoli endogeni ed esogeni, sono stati utilizzati e tra questi abbiamo quelli sensibili al:

- 1) pH
- 2) Luce
- 3) Specie reattive dell'ossigeno
- 4) Nitro-reduttasi

E' stato sintetizzato un pro-farmaco appartenente a questa classe, a base di ossaliplatino pegilato (DiPt-TK-PEG<sub>2K</sub>), composto da un linker tioacetale responsabile della generazione di ROS (Figura 8A), il tutto assemblato con un eterodimero fotosensibile, feoforbide A e un inibitore della indoleammina 2,3-diossigenasi 1 (NLG919). A seguito dell'irraggiamento con lunghezze d'onda vicine all'infrarosso (671 nm), feoforbide A genera prodotti reattivi dell'ossigeno per ottenere il taglio del PEG e il 98% del complesso (DiPt-TK-PEG<sub>2K</sub>), viene degradato dopo 30 secondi di irradiazione; questo nanosistema ha eradicato il 67% dei tumori 4T1 sopprimendo pure le metastasi delle cellule tumorali 4T1 ai polmoni, senza indurre variazioni del peso corporeo o danni istopatologici agli organi (Feng et al, 2018; He et al, 2018; Li et al, 2020).

Con questo approccio è stato sviluppato anche un complesso azidico con il platino (IV), un pro-farmaco foto-attivabile, per incorporare un piccolo RNA interferente con c-fos, gene coinvolto nella riparazione del DNA che in seguito viene modificato con un rivestimento

esterno a base di un co-polimero di PEG ramificato con acido ialuronico, il quale funge da polimero che bersaglia il recettore CD44 (Figura 8B); anche in questo caso il nanosistema ha mostrato un'eccellente efficacia antitumorale insieme a un profilo di sicurezza altrettanto buono, è stato sperimentato come xenotrapianto sub-cutaneo nel topo e con l'ausilio di un irraggiamento luminoso, il quale permette di regolare il trasporto del gene con il profarmaco (Zhang et al, 2020).

Altro sistema nanotecnologico è composto da nanoparticelle di silicio mesoporose e nanoparticelle metalliche impiegate come carriers inorganici per immagazzinare platinocomposti, con il fine di incrementare l'uptake specifico nelle cellule tumorali e ridurre di conseguenza gli effetti collaterali. Come primo approccio è stato caricato il carboplatino in un nucleo di particelle di silicio funzionalizzate con catene di acido folico, questo sistema si è rivelato internalizzabile in maniera efficace in cellule tumorali A549 e IGROV-1, salvaguardando le cellule neuronali, rappresentate a livello sperimentale da cellule di neuroblastoma umano differenziate insieme a neuroni sensitivi embrionali dei gangli della radice dorsale di ratto; i risultati hanno evidenziato che il nanosistema in questione può ridurre in maniera sostenuta la neurotossicità indotta da carboplatino (Ceresa et al, 2013). In aggiunta, questi sistemi nanoparticellari inorganici hanno permesso la scoperta anche di meccanismi di riparazione dei danni nervosi, infatti il magnesio biodegradabile insieme alle sue lega metallica, ha mostrato abilità nella riparazione dei neuroni e uno dei nanosistemi che sfrutta questo meccanismo è rappresentato da una lega del magnesio con il nanotubo di carbonio rivestito da fosfato di calcio e chitosano, il quale promuove la crescita assonale dei neuroni DRG attraverso l'attivazione della via di segnale ERK, dimostrando il suo potenziale nel trattamento della PIPN in quanto sono in grado di ridurre l'accumulo dei farmaci a base di platino nel sistema nervoso periferico (Liu et al, 2021).

Un'ulteriore applicazione di questi nanosistemi sfrutta il fatto che i composti del platino possono essere coniugati sulla superficie delle nanoparticelle inorganiche, mediante la reazione chimica tra gruppi funzionali specifici (amminici e carbossilici), per esempio, nanoparticelle di oro vengono prodotte coniugando un profarmaco a base di platino (IV) a un gruppo amminico sulla loro superficie, ottenendo un mezzo terapeutico sicuro in grado di limitare la tossicità da platino e contemporaneamente massimizzando l'efficacia chemioterapica mediante la deplezione del glutathione intracellulare (Figura 8C) (Yang et al, 2019). Esempio: il carboplatino è stato fatto reagire con il gruppo carbossilico dell'acido

poliacrilico contenuto in nanoparticelle ibride di ossido ferrico e ossido di gadolinio (Yang et al, 2020).

Le nanoparticelle inorganiche possono funzionare anche come agenti chemioterapici in grado di liberare ioni platino; si tratta di nanocluster di platino autoassemblanti (2,5 nm) che possono essere costruiti con l'ausilio di un polimero sensibile al pH del peptide SP94 che ha come target il carcinoma epatocellulare, esponendo il nanosistema a un microambiente tumorale acido, le nanoparticelle si dissociano e accelerano il rilascio di ioni platino (Figura 8D). Questo approccio ha esaltato un'efficacia terapeutica superiore e una biocompatibilità comparata a quella fornita dagli xenotrapianti ortotopici di carboplatino e sorafenib nel trattamento del carcinoma epatocellulare resistente all'azione del carboplatino (Xia et al, 2016); in aggiunta, i nanocluster auto-assemblanti possiedono attività catalasica grazie a un ulteriore sviluppo tecnologico, tramite l'incorporazione del fotosensibilizzante verteporfin all'interno della struttura a doppio strato lipidico dei liposomi, i quali a loro volta sono stati ibridizzati con membrane macrofagiche e si ottenne così un nano-complesso in grado di convertire il perossido di idrogeno in ossigeno, inibendo in questo modo la crescita tumorale e le metastasi ai polmoni, ma soprattutto prolungando il tasso di sopravvivenza dell'animale oggetto della sperimentazione senza determinare tossicità significative (Liu et al, 2021).

Per riassumere, abbiamo potuto constatare come la recente evoluzione nello sviluppo di nanosistemi incorporanti farmaci a base di platino, tra cui i nano-sistemi coniugati, i complessi pro-farmaco e i sistemi a nanoparticelle inorganiche forniscano diverse opportunità per migliorare l'efficienza target dei platinocomposti, riuscendo allo stesso tempo a ridurre quella tossicità indiscriminata nei confronti dei tessuti sani, tra cui il sistema nervoso periferico.

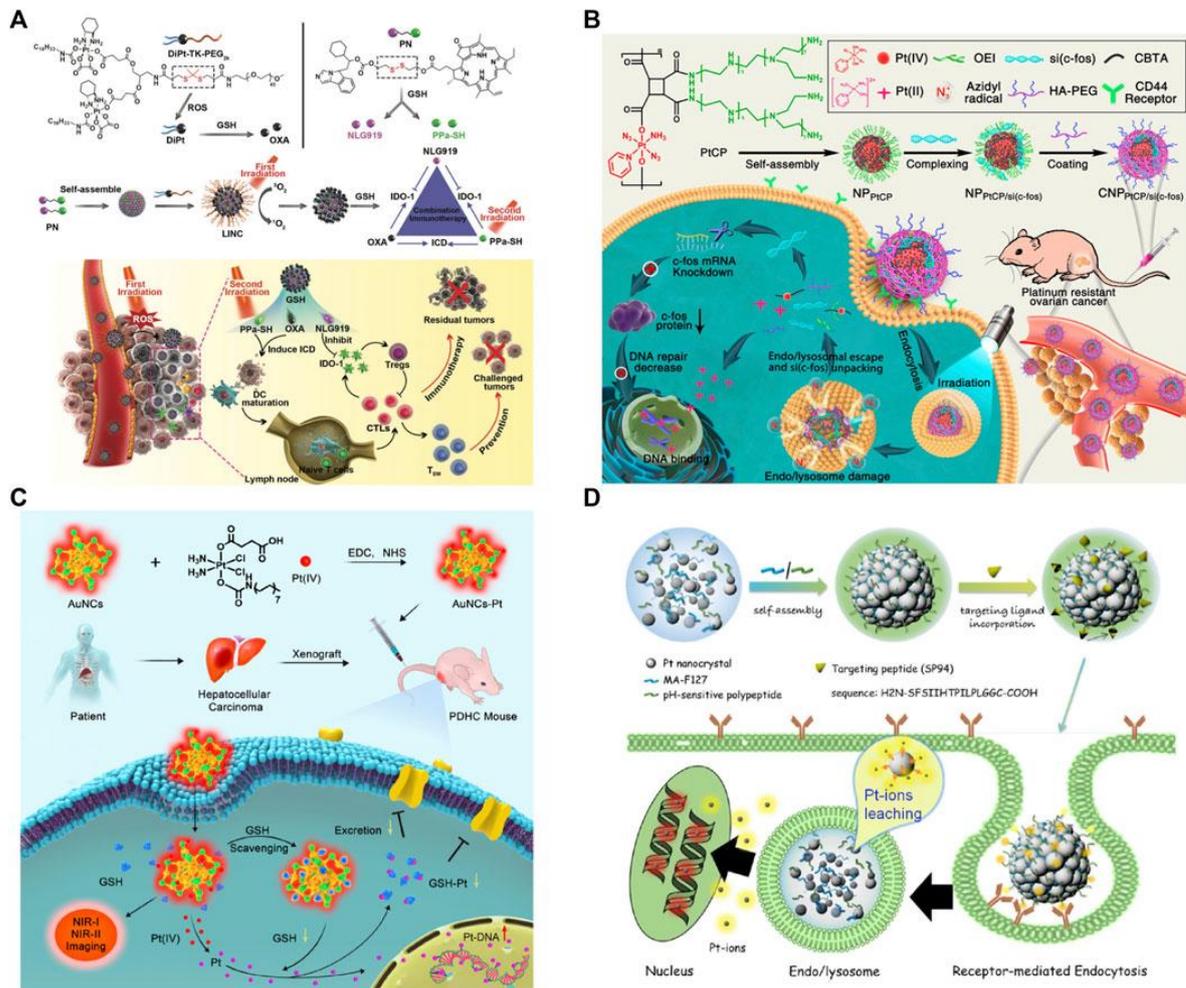


Figura 8: Nano-sistemi targeting con platino (Xi Hu et al, 2021)

Sempre nell'ambito delle nanotecnologie, iniziamo ora a parlare dei nanosistemi a base di composti anti-ROS; questi comprendono farmaci antiossidanti i quali possono essere nano-formulati con l'obiettivo di prevenire e trattare la PIPN, tra i primi sono state progettate nanoparticelle incorporanti curcumina coniugata con code di acido ialuronico, riscontrando che questo sistema poteva migliorare gli effetti neurotossici indotti dal carboplatino, sopprimendo inoltre l'aumento a livello corticale di perossidazione lipidica, TNF-alfa, caspasi-3, acetilcolinesterasi e riduzione dei cambiamenti istopatologici (Khadrawy et al, 2019). L'attenzione è stata focalizzata nei seguenti composti:

- Giallo di zafferano
- Icarina
- Epimedina B
- Acido 3,4-diidrossibenzoico

I quali sono i principali componenti neuroprotettivi identificati dalla medicina tradizionale cinese; considerando la bassa solubilità di questi 4 composti, sono stati sviluppati gel etosomiali (Figura 9A) utilizzando etanolo, cinnamaldehyde, fosfolipone 90G e carbopol 980,

questi gel alleviano in maniera sostenuta l'allodinia meccanica l'iperalgia indotte da ossaliplatino e abbassano il numero di nuclei eccentrici nei neuroni DRG (Figura 9B) (Lin et al, 2020).

Il sistema a nanoparticelle di ossido cerico, dove il cerio è un elemento chimico raro esistente in due stati di valenza (  $Ce^{4+}$  e  $Ce^{3+}$  ), possiede un'eccellente capacità di disattivazione delle ROS, alla pari degli enzimi superossido dismutasi e catalasi, riducendo lo stress ossidativo ovunque esso determini stati patologici; una somministrazione intraperitoneale di 60 mg/Kg al giorno per 4 settimane offre protezione contro la neuropatia periferica da platino, invertendo le variazioni istopatologiche che avvengono nei nervi sciatici nel cordone spinale lombare causate da ossaliplatino (Kim et al, 2019); questo viene riscontrato anche grazie al cambiamento dei livelli di alcuni marcatori tipici, come quelli dello stress ossidativo (nitrotirosina) e dell'attivazione delle cellule gliali astrocitarie (proteina acida fibrillare gliale). Alcuni agenti terapeutici strutturati sulla base dell'ossido cerico, tra i quali:

- 1) Nanoparticelle di silicio mesoporoso rivestite con ossido cerico
- 2) Cerotti con microaghi integrati di ossido cerico
- 3) Agenti diagnostico-terapeutici (Nanoparticelle con un core di ossido ferrico/cerico)
- 4) Nanocomposti a doppio strato idrossilico rivestiti con ossido ferrico/cerico
- 4) Nanococktails di chitosano e ossido ferrico/cerico

sono stati progettati per disattivare i prodotti reattivi dell'ossigeno per la diagnosi o il trattamento di malattie infiammatorie correlate alle ROS (Wu et al, 2018; Yuan et al, 2021; Liu et al, 2019).

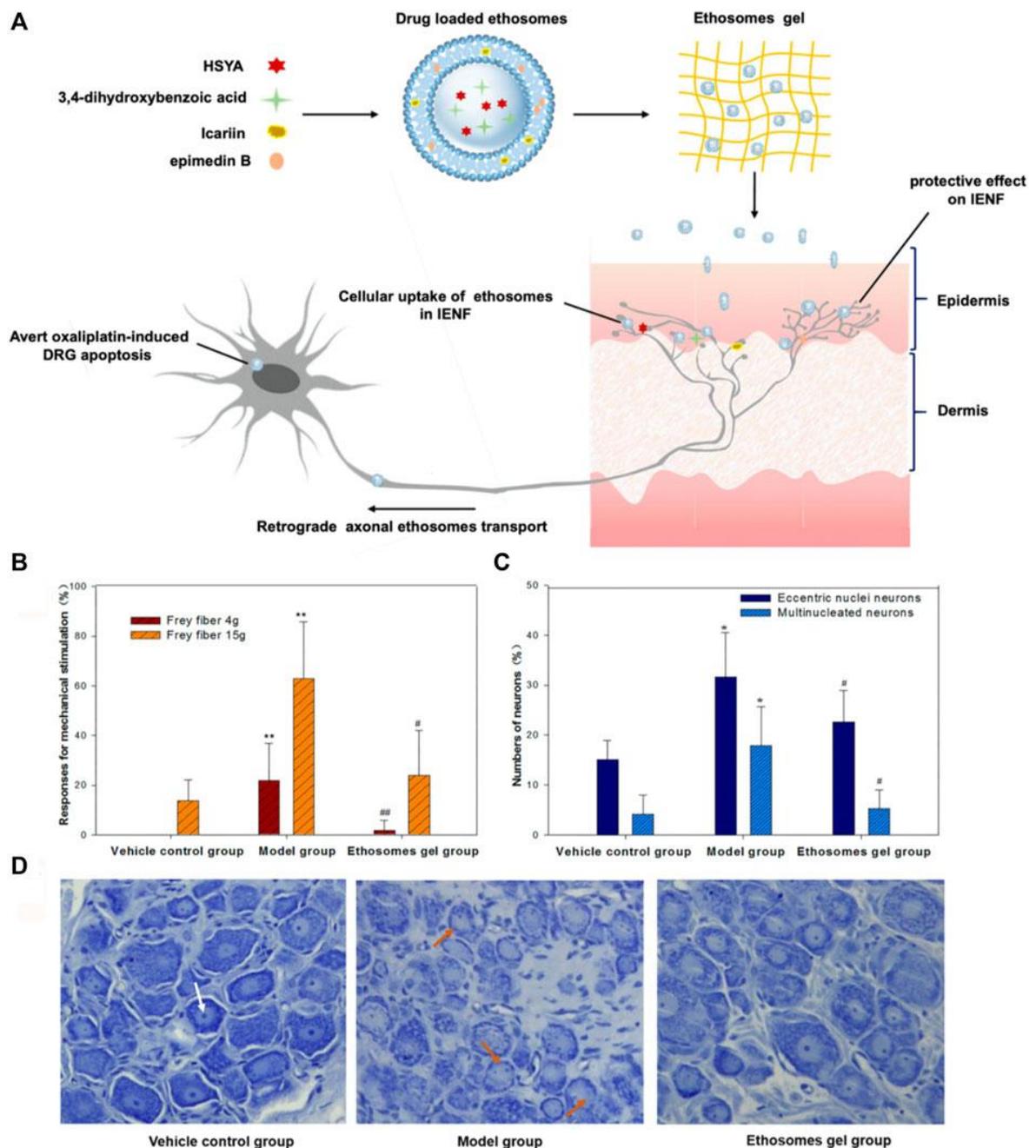


Figura 9: I 4 gel etosomal per il trattamento della PIPN (Xi Hu et al, 2021)

Concludiamo parlando dell'ultimo approccio, ovvero l'utilizzo di cellule staminali aventi proprietà neuroprotettive e neurogenerative che hanno mostrato effetti terapeutici efficaci nei confronti della neuropatia sensitiva associata al danno al nervo sciatico e ai cordoni spinali; alcune cellule mesenchimali e stromali derivate dal midollo osseo (MSC), hanno contrastato l'allodinia meccanica e l'iperalgia termica nei modelli di topo C57BL/6 trattati con ossaliplatino e questo dopo una singola somministrazione, mentre il trattamento orale ripetuto con gabapentina, con lo scopo di ottenere lo stesso risultato, aveva indotto solamente un'azione antidolorifica transiente (Puertas-Neyra et al, 2020). Le cellule

staminali mesenchimali sono responsabili in questo caso dell'aumento dei livelli di citochine anti-infiammatorie (IL-10 e TGF-beta) e dell'attivazione dell'espressione dei geni codificanti per i fattori antiossidanti (SOD e Nrf-2), nel cordone spinale dei modelli di topo neuropatici, riducendo nella stessa misura anche i livelli di nitriti (Dos Santos et al, 2021).

## CAPITOLO 8

### NEUROTOSSICITA' DA TAXANI

La neuropatia periferica indotta da taxani (TIPN) rappresenta l'evento avverso di origine non ematologica più comune in seguito al trattamento con taxani, si verifica anche in seguito a riduzione della dose e cessazione della terapia, come accade per i composti del platino, impattando notevolmente sul tasso di sopravvivenza dei pazienti (Brewer et al, 2016). Paclitaxel e docetaxel sono le due molecole principali appartenenti alla famiglia dei taxani, una classe di terpeni che interferiscono con la funzionalità micro tubulare a livello del citoscheletro neuronale, esercitando il loro effetto tossico attraverso il legame alla  $\beta$ -tubulina e determinando l'arresto del ciclo cellulare (Burgess et al, 2021).

La TIPN determina principalmente una neuropatia acuta delle fibre sensitive distali, lunghezza-dipendente, accompagnata da dolore neuropatico il quale può progredire in casi più severi; le fibre A $\beta$ , le fibre A $\delta$  e quelle di tipo C sono colpite in una distribuzione denominata "*glove and stocking*" (Tamburin et al, 2019; Swain, Arezzo, 2008; Dougherty et al, 2004). I pazienti riportano i seguenti sintomi:

- 1) Formicolio
- 2) Intorpidimento
- 3) Parestesia
- 4) Dolore Neuropatico
- 5) Disestesia indotta da freddo
- 6) Crampi muscolari

Questi in genere peggiorano con il trattamento e migliorano con la cessazione della terapia (Pachman et al, 2016), sebbene il 31-44% dei pazienti trattati con docetaxel o paclitaxel riportino questi sintomi dopo 6 anni di monitoraggio (Mustafa et al, 2017; De la Morena et al, 2015). Iniziamo a introdurre la patogenesi della TIPN affermando che determinati studi hanno identificato un aumento della presenza di mitocondri a livello assonale nelle fibre C, rispetto a un gruppo di controllo dopo 1 mese di trattamento con paclitaxel (Linda et al, 2011). Il paclitaxel inoltre modifica la permeabilità della membrana mitocondriale, determinando disfunzione mitocondriale, riduzione dell'attività di respirazione e interferenza con la sintesi di ATP a livello neuronale (Figura 10) (Kidd et al, 2002; Krukowski et al, 2017). Lo stress ossidativo che deriva dalla disfunzione mitocondriale determina la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), infatti si è osservato che in cellule neuronali del DRG dei ratti, trattate con taxani si sono rilevati livelli alti di ROS, i

quali hanno comportato una diminuzione dell'attività metabolica mitocondriale, del potenziale di membrana mitocondriale e della biodisponibilità di antiossidanti (Figura 10) (Shim et al, 2019; McCornick et al, 2016).

Come abbiamo visto per i composti del platino, i canali ionici voltaggio dipendenti esercitano un ruolo cruciale anche nella TIPN, infatti in modelli sperimentali si evince che il paclitaxel incrementa l'espressione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, nello specifico il sottotipo  $Ca_v3.2$  (Figura 10), diminuendo l'ampiezza dei potenziali creati dalle correnti di calcio e diminuendo la soglia di eccitabilità nei neuroni del DRG (Krukowski et al, 2017; Bennett et al, 2011; Li et al, 2018). Per di più il paclitaxel incrementa l'espressione anche dei canali del sodio  $Na_v1.7$  (Figura 10), da come si è potuto osservare in un mezzo di coltura con neuroni del DRG umano, determinando l'incremento dell'attività spontanea ectopica, ovvero un'alterazione incontrollata nei meccanismi che portano all'evocazione del potenziale d'azione, essenziale per una corretta conduzione dell'impulso nervoso (Li et al, 2018; Chang et al, 2018).

Infine, come per tutti i chemioterapici oggetto di questa discussione, Il paclitaxel partecipa nel generare una potente risposta infiammatoria, può legarsi ai recettori TLR4 sui macrofagi (Figura 10), attivando tutte quelle vie di segnale che determinano un aumento dell'espressione dei geni codificanti per le citochine pro-infiammatorie (Li et al, 2014). Nello specifico si è visto che IL-6, IL-8, IL-10, la proteina chemo-attrattrice dei monociti (MCP-1) e le cellule di Langerhans attivate (Figura 10) si ritrovavano tutte quante a livelli elevati e concorrevano nel propagare insieme il rilascio di citochine infiammatorie (Penson et al, 1999; Krukowski et al, 2016). E' stata anche identificata la migrazione dei macrofagi  $CD68^+$ , dei linfociti T  $CD8^+$  e di altri leucociti, nei neuroni del DRG (Krukowski et al, 2016; Peters et al, 2007). Eseguendo le analisi anche nei modelli animali, le citochine pro-infiammatorie come IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-20, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  insieme alle chemochine CCL2 sono state riscontrate a livelli elevati nel plasma dei ratti trattati con paclitaxel, determinando un ruolo rilevante nei processi di ipersensibilità e dolore neuropatico (Al-Mazidi et al, 2018).

I livelli sierici di IL-20 sono stati correlati a una iperattivazione dei monociti e degli astrociti responsabili della neuro-infiammazione. Questo è stato confermato dal fatto che utilizzando un anticorpo monoclonale contro l'IL-20 prima della terapia con paclitaxel, si attenuava l'allodinia meccanica e il danno ai nervi periferici negli animali in terapia, bloccando anche il reclutamento dei macrofagi nei neuroni del DRG (Chen et al, 2020).

Inoltre, l'espressione di IL-20 era aumentata anche a livello dell'epidermide degli animali e la sua inibizione era in grado di prevenire la perdita di densità delle fibre nervose intraepidermiche causata dal paclitaxel, evidenziandone così un ruolo importante nella risposta infiammatoria (Chen et al, 2020).

Insieme alle vie di segnale dell'infiammazione che possono essere analizzate per correlare i fenomeni infiammatori alla neuropatia indotta da paclitaxel, merita menzione l'attivazione dei recettori **TRPV1** (transient receptor potential vanilloid 1) tramite una isoforma della Protein chinasi C. I recettori TRPV1 fanno parte di una grande superfamiglia di recettori di canali ionici a potenziale transiente che rispondono a una grande varietà di stimoli chimici e fisici, come il freddo, l'acidità e i lipidi bioattivi. Essi sono inoltre sensibili alle molecole vanilloidi come la capsaicina che è in grado di legarsi a questi recettori e sono attivati anche da una specifica isoforma della protein chinasi C che ne aumenta la funzione incrementando la nocicezione (Fumagalli et al, 2021). Livelli elevati di TRPV1 attivati sono stati rilevati nel cordone spinale e nei neuroni DRG degli animali in terapia con paclitaxel (Gao et al, 2016).

Come per i composti del platino, anche nel caso dei taxani abbiamo la stimolazione dell'attività del complesso macromolecolare dell'inflammasoma NLRP3 che viene attivato con la produzione di IL-1 $\beta$  mediata a sua volta dall'attivazione del segnale della via della **sfingosina-1-fosfato** (Syed et al, 2020). Nei modelli sperimentali murini, il recettore per la sfingosina-1-fosfato risulta coinvolto nello sviluppo e nel mantenimento del dolore neuropatico, attraverso l'attivazione di processi neuro-infiammatori attraverso la via degli sfingolipidi nel cordone spinale (Janes et al, 2014).

Altri studi hanno indagato il ruolo dei recettori dei cannabinoidi nella neuro-infiammazione. I recettori dei cannabinoidi **CB1** e **CB2**, appartengono al sistema endocannabinoide ed esercitano una soppressione della neuro infiammazione. CB1 è espresso prevalentemente negli astrociti del sistema nervoso centrale, mentre i livelli di CB2 aumentano a seguito di danno nervoso periferico e sono coinvolti nell'attivazione delle cellule della microglia (Jean-Gilles et al, 2010). Agonisti CB2 non solo diminuiscono la produzione di TNF- $\alpha$  e CCL2 nel cordone spinale in animali trattati con paclitaxel, ma anche dei marcatori di attivazione delle cellule gliali (Deng et al, 2015; Naguib et al, 2012; Wu et al, 2019).

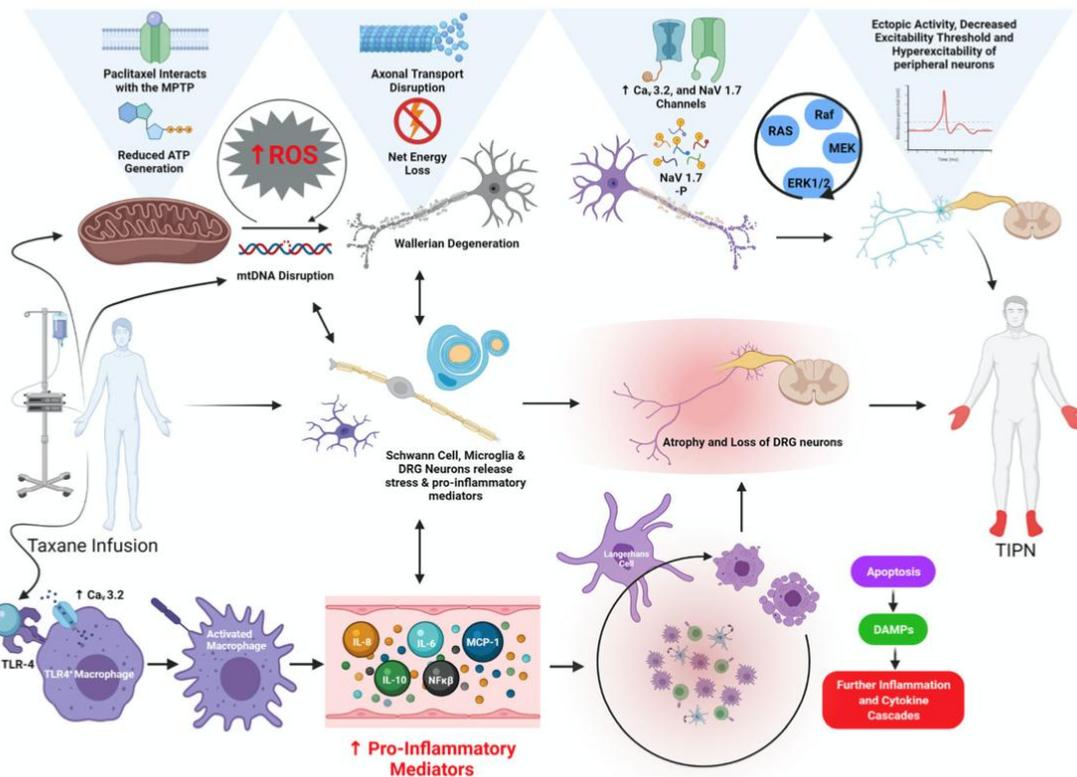


Figura 10: Meccanismi coinvolti nella patogenesi della neuropatia periferica indotta da taxani (Burgess et al, 2021).

### 8.1 Trattamento della neuropatia periferica indotta da Taxani

I taxani sono composti isolati principalmente dalle specie vegetali appartenenti al genere *Taxus* e il paclitaxel è stato il primo farmaco isolato nel 1971 dalla specie *Taxus brevifolia*, mentre il docetaxel è stato ottenuto per semi-sintesi da *Taxus baccata* negli anni 80. Entrambi sono i taxani più comunemente usati per il trattamento di tumori molto diffusi come i carcinomi: polmonare, mammario, prostatico, gastro-esofageo, carcinoma alla vescica, pancreatico, ovarico, carcinoma della testa e del collo e nel trattamento del melanoma e sarcoma di Kaposi. Il meccanismo d'azione di questi composti consiste nell'interruzione della fase G2 del ciclo cellulare, mediante il legame alle tubuline polimerizzate (alfa e beta-tubuline), e conseguente stabilizzazione dei microtubuli. Durante la divisione cellulare, i taxani sono anche in grado di legare la beta-tubulina mitocondriale, causando un incremento della permeabilità di membrana mitocondriale e dell'efflusso di calcio (Weaver, 2014). Questi eventi nel loro insieme causano la morte cellulare delle cellule tumorali per necrosi e apoptosi anche se i taxani. E' qui infatti che sorgono i problemi degli eventi avversi nell'ambito della neurotossicità, ma questa, a differenza di

quella causata dagli altri chemioterapici finora considerati, può interessare anche il sistema nervoso centrale oltre a quello periferico.

La neurotossicità periferica, che si manifesta come neuropatia periferica, è l'effetto avverso dose-limitante dei taxani, colpisce circa il 97% dei pazienti in terapia e si evolve da acuta a cronica in più del 60% dei casi, con un grave impatto sulla qualità della vita dei pazienti, questa, come annunciato in precedenza comprende parestesia e dolori alle estremità degli arti, ma a sua volta può progredire in perdita della propriocezione, deficit motorio e disfunzioni autonome (Tanabe et al, 2013).

Per comprendere al meglio i meccanismi fisiopatologici della neuropatia periferica indotta da taxani e le potenziali strategie terapeutiche sono stati utilizzati diversi modelli animali, ma anche diversi tipi di taxani e dosaggi (Tabella 3) (Duggett et al, 2016).

Animal	Drug	Dose	Protocol	Behavioural effects	Reference
Mouse					
	Paclitaxel	2 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	5 consecutive days	Heat hyperalgesia (plantar test) and mechanical (von Frey test) and cold (acetone test) allodynia	Nieto et al., 2008
	Paclitaxel	4 mg·kg <sup>-1</sup> (i.v.) 4 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.) 60, 70 or 80 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	Single dose Single dose or 4 alternated days 1x week/4 weeks	Mechanical (paw pressure test) and heat (plantar test) hyperalgesia	Matsumoto et al., 2006
	Paclitaxel	2 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	4 alternated days	Mechanical allodynia (von Frey test)	Segat et al., 2017
	Paclitaxel	2, 4 or 8 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	4 alternated days	Mechanical (von Frey test) and cold (acetone test) allodynia; anxiety- and depression-like behaviours	Toma et al., 2017
	Paclitaxel	20 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	12 injections on alternating weekdays for 4 weeks	Spatial learning and memory impairment	Huehnchen et al., 2017
	Paclitaxel	1, 3 or 6 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	Single dose	Dose-dependent spatial learning and memory impairment	Atarod et al., 2015
	Docetaxel	33 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	Single dose	Spatial memory impairment	Seigers et al., 2015
	Docetaxel	8 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	Continuously delivered for a total dose of 32 mg·kg <sup>-1</sup> over 4 weeks or 1x week/4 weeks	Novel object recognition memory impairment; spatial memory impairment	Fardell et al., 2014
Rat					
	Paclitaxel	0.5, 1 or 2 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	4 alternated days	Mechanical (von Frey) and thermal hyperalgesia and allodynia	Polomano et al., 2001
	Paclitaxel	2 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	4 alternated days	Spatial learning and memory impairment; reversal learning impairment	Li, Zhao, et al., 2018; Panoz-Brown et al., 2017
	Docetaxel	1 mg·kg <sup>-1</sup> (i.v.)	1x week/4 weeks	Spatial memory impairment; depression-like behaviour	Callaghan & O'Mara, 2015
	Docetaxel	10 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.) 6 or 10 mg·kg <sup>-1</sup> (i.p.)	Single dose Once a week for 3 weeks	Novel object recognition memory impairment	Fardell, Vardy, & Johnston, 2013

Tabella 3: Modelli sperimentali animali di neurotossicità indotta da taxani (Tanabe et al, 2013).

I topi trattati con paclitaxel presentano livelli alti di ATF-3 (Activating transcription factor-3), un marcatore di danno neuronale nei neuroni DRG, inoltre determinano degenerazione assonale e perdita delle fibre nervose intra-epidermiche. Attraverso il loro meccanismo di stabilizzazione microtubulare prevengono la mitosi e uccidono in questa maniera le cellule tumorali, però se questo meccanismo si verifica nei neuroni, come conseguenze abbiamo una perdita della funzionalità del trasporto assonale, dipendente dai microtubuli che è essenziale per il trasporto vitale di organelli, nutrienti e neurotrasmettitori attraverso gli assoni, in più il danno microtubulare risulta anche in degenerazione assonale e assonopatia (Fukuda et al, 2017).

Descrivendo il danno a livello mitocondriale, le alterazioni mitocondriali a livello della morfologia, del bilancio elettrolitico e della generazione di ROS, sono state descritte come elemento chiave della TIN. Deficit nella catena di respirazione mitocondriale sono stati osservati nei modelli di roditore affetti dalla neuropatia, soprattutto dopo cessazione del trattamento e in assenza di alcuna concentrazione di farmaco rilevabile nei DRG, confermando che le disfunzioni mitocondriali sono meccanismi preponderanti di PIN (Xiao, Bennett, 2012); oltre a questo abbiamo anche alterazioni nella catena di respirazione e la riduzione di ATP che ne risulta sono eventi che si sviluppano a priori dalla comparsa degli effetti dolorosi tipici, inoltre la deplezione di ATP persiste ed è accompagnata anche da un incremento dell'attivazione della via glicolitica, comportando cambiamenti nell'equilibrio bioenergetico dei neuroni DRG (Flatters, Bennett, 2006). Lo stress ossidativo è il fattore comune degli eventi avversi neuropatici conseguenti alle chemioterapie, infatti l'alterazione che si verifica nei mitocondri genera a sua volta intermedi mitotossici che aumentano la produzione di ROS, con i danni che ne derivano.

Parliamo ora di quelle che sono le potenziali strategie terapeutiche; l'efficacia delle molecole antiossidanti come neuroprotettori per prevenire lo sviluppo della neuropatia periferica è stata analizzata negli studi pre-clinici e clinici, per primi la vitamina E e il GSH si sono mostrati terapie adjuvanti utili nel prevenire gli effetti avversi, insieme a questi, troviamo l'amifostina, la glutamina e l'acetil-L-carnitina, anche se per quanto riguarda quest'ultimo, un recente studio multicentrico randomizzato e in doppio-cieco ha evidenziato che l'acetil-L-carnitina può aggravare la neuropatia periferica. Nonostante ciò, nuove terapie aventi come bersaglio lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale continuano ad essere studiate e sperimentate nei modelli animali.

L'Nrf2 è un fattore di trascrizione attivato dallo stress ossidativo che promuove l'espressione di enzimi citoprotettivi, Nrf2 viene attivato dalla berberina, una

benzoisochinolina quaternaria utilizzata nella medicina tradizionale cinese e ayurvedica e si è dimostrata attenuare l'ipersensibilità termica e lo stress ossidativo nei modelli di ratto trattati con paclitaxel, per mezzo della riduzione della perossidazione lipidica e dei livelli di GSH, più un aumento dell'attività superossido-dismutasi nel nervo sciatico (Zhao et al, 2019). Oltre alla berberina, un'altra molecola che ha a che fare con questo fattore di trascrizione è l'acido alfa-lipoico, attenua la risposta nocicettiva indotta dal paclitaxel attraverso l'aumento dei livelli di Nrf2 e dei geni Nrf2-responsivi, così insieme questi due attivatori di Nrf2 rappresentano un metodo efficiente per trattare la TIN tramite la loro azione sullo stress ossidativo (Singh et al, 2019; Sun et al, 2019).

I danni responsabili di tutti gli eventi avversi implicati nell'insorgenza della neuropatia indotta da taxani, sono dovuti alla perdita di neuroni e fibre nervose, i quali avrebbero bisogno di essere rigenerati, o quanto meno ridurre la perdita di altre fibre nervose in modo da evitare il peggioramento della condizione; a questo scopo, entra in gioco la grelina, un ligando endogeno del recettore dell'ormone della crescita secretagogo (GHS-R), recentemente sperimentato in modelli diabetici e di CIPN, migliora la condizione neuropatica riducendo la perdita di fibre nervose intra-epidermiche nel topo e riduce pure la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo da ROS e prodotti dell'azoto nei DRG dei topi; a confermarlo, i topi resi knockout sia per la grelina che per il GHS-R sviluppavano una neuropatia più severa rispetto ai fenotipi wild-type, suggerendo così che la grelina è neuroprotettiva (Ishii et al, 2018). Nello stesso ambito, la melatonina, ormone noto come regolatore del ciclo sonno-veglia, previene l'ipersensibilità meccanica indotta dalla riduzione dell'attività delle fibre C nei ratti trattati con paclitaxel, questo attraverso l'inibizione dello stress ossidativo nei nervi periferici (Galley et al, 2017).

La neuro-infiammazione è uno dei fenomeni protagonisti, insieme agli altri meccanismi, di danno nervoso periferico, perché tra le cellule nervose, ne esistono alcune deputate all'infiammazione qualora si manifestasse la presenza di un fattore estraneo che reca danno al sistema, quindi queste cellule, in particolare le cellule gliali interagiscono con i neuroni, scatenando una risposta infiammatoria responsabile tra l'altro del dolore neuropatico cronico, esso infatti viene generato dal continuo rilascio delle citochine infiammatorie di cui abbiamo sempre discusso in questo elaborato; si è pensato dunque di combinare nella terapia con taxani anche agenti anti-infiammatori con l'obiettivo di prevenire o diminuire i sintomi dolorosi tipici della neuropatia. La maggior parte dei dati che correlano l'infiammazione alla TIN provengono dagli studi pre-clinici, tra quali uno di questi che ha analizzato il pattern di citochine e chemochine rilevate nel siero di ratti che erano in terapia con paclitaxel; a tal

riguardo, il trattamento con un agente anti-TNF<sub>alfa</sub>, etanercept, l'antagonista del recettore dell'IL-1 o l'antagonista del recettore chemochinico CCR2 ( S504393), prevenivano in maniera completa le complicazioni legate al dolore e nello specifico, un antagonista selettivo del CCR2 inibiva anche l'ipersensibilità al freddo; un'alternativa a questi due antagonisti potevano essere le immunoglobuline anti-CCL2, ovvero il ligando principale del dominio C-C del recettore CCR2 e si sono dimostrate in grado di ridurre oltre all'ipersensibilità al freddo anche l'attivazione della microglia, secondaria alla somministrazione di paclitaxel (Al-Mazidi et al, 2018).

Tra i farmaci che sono in grado di ridurre la risposta neuro-infiammatoria si posiziona il clodronato, grazie alla sua azione di riduzione dei macrofagi infiltranti nei neuroni DRG, contribuendo a non aumentare i livelli di TNF<sub>alfa</sub> e CCL2 e risolvendo i sintomi dolorosi nei ratti. Per confermare questo meccanismo, la somministrazione intravenosa di paclitaxel nei ratti induceva l'accumulo macrofagico nei DRG e nei nervi periferici, risposta accompagnata dall'attivazione degli astrociti e delle cellule satelliti, dimostrando inoltre che tutti questi eventi erano secondari alla somministrazione del chemioterapico perché si è osservata una sovra-espressione di ATF3 e cellule di Schwann (Zhang et al, 2016; Peters et al, 2007).

Oltre a CCL2 si è visto che un altro ligando chemochinico è coinvolto, il CX3CL1 e l'inibizione del suo recettore corrispondente potrebbe portare effetti benefici nel trattamento della neuropatia, bloccando le interazioni tra neuroni e macrofagi periferici. Nei modelli in vitro il paclitaxel incrementava gli impulsi elettrici eccitatori post-sinaptici nei neuroni del corno dorsale spinale, un evento che è parallelo all'attivazione della via di segnale di CXCL12, mediante acetilazione istonica, di conseguenza l'inibizione in vivo della suddetta via di segnale alleviava l'allodinia meccanica (Montague, Malcangio, 2017); in questo modo, utilizzando agenti anti-citochine e chemochine riusciamo ad avere a disposizione opportunità terapeutiche contro il dolore neuropatico da taxani e le sue complicazioni.

Componente fondamentale nel trattamento della PIN sono i recettori cannabinoidi CB-1 e CB-2, infatti, l'utilizzo di un agonista di entrambi questi due recettori, WIN 55,212-2 ha portato a inibizione dell'infiammazione spinale nei ratti e se somministrato ripetutamente, questo agonista previene l'attivazione gliale, inibendo la sovra-regolazione delle citochine. La stessa azione agonista nei confronti del recettore cannabinoidi è stata evidenziata per la minociclina, quindi co-somministrando al paclitaxel i farmaci antinfiammatori minociclina e indometacina, questi attraverso un'attività sinergica riducono l'iperalgia termica nei topi di entrambi i sessi (Burgos et al, 2012); il Δ(9)-tetraidrocannabinolo, agonista CB-1 e il

composto AM1710, agonista CB-2, sono in grado di prevenire l'allodinia meccanica, per quanto riguarda AM1710 esso inibisce l'espressione degli mRNA codificanti per TNF<sub>alfa</sub> e CCL2 nel cordone spinale di topo senza creare problemi di tolleranza; continuando la ricerca sugli agonisti dei recettori cannabinoidi, si è visto che un altro di questi, il  $\beta$ -carofillene ha manifestato un marcato effetto analgesico, per lo più attraverso la modulazione della via del segnale di p38, una MAPK (Mytogen-activated protein kinase) e attivazione di NF-kB; i topi riceventi questo trattamento hanno sperimentato una riduzione dell'attivazione microgliale e ridotti livelli di IL-1 $\beta$  e CCL2 (Deng et al, 2015; Segat et al, 2017).

Non solo gli studi pre-clinici, ma anche quelli clinici indicano una correlazione tra l'infiammazione e la neuropatia indotta da taxani, infatti uno studio retrospettivo ha reclutato 67 pazienti affetti da carcinoma mammario e sono stati posti in terapia con docetaxel, al termine risultò che la neuropatia periferica era presente in 51 soggetti ed essa era proporzionale al numero di cicli di chemioterapia e correlata direttamente ai rapporti neutrofili/linfociti e monociti/linfociti, in seguito si è indagato sulla differenza nell'espressione genica nei sopravvissuti al tumore al seno, con o senza sintomi neuropatici. Diverse vie infiammatorie sono state trovate alterate significativamente nei pazienti con il dolore neuropatico, contemporaneamente in uno studio di proteomica per identificare i biomarcatori dagli esosomi sierici, gli individui aventi una bassa risposta infiammatoria a priori della chemioterapia con taxani, presentavano un'elevata suscettibilità allo sviluppo della neuropatia periferica (Yamanouchi et al, 2017); questi dati sono contrastanti con l'ipotesi che la neuropatia periferica sia correlata a un'elevata risposta infiammatoria, è possibile però che i vari gradi di infiammazione dipendano dal periodo di valutazione, svolto in precedenza o in seguito l'avvio della chemioterapia (Chen et al, 2015).

Nell'ambito della neuro-infiammazione e del dolore, avevamo introdotto in precedenza, il fenomeno dell'attivazione dei recettori appartenenti alla famiglia dei TRPV, nello specifico la sottospecie 1 il quale è tra l'altro quello più studiato, infatti il suo ruolo nell'insorgenza del dolore è stato ampiamente caratterizzato in modelli animali di malattia, traslando successivamente le ricerche anche negli umani, è stato anche correlato alle neuropatie associate al diabete, quindi non solo in quelle derivate dalla chemioterapia. Un report ha dimostrato un incremento nei livelli nel tempo degli mRNA e l'espressione delle relative proteine recettoriali TRPV1 nei neuroni di ratti con TIPN (Hara et al, 2013).

Il trattamento con l'antagonista non selettivo del TRPV1, la **capsazepina** (Tabella 3) attenuava il dolore neuropatico indotto dal paclitaxel, anche se per quest'ultima non è stata rilevata alcuna attività di riduzione dell'iperalgia termica e meccanica, al contrario ha

mostrato un'esacerbazione della risposta dolorosa al calore causata dalla chemioterapia (Salat & Filipek, 2015).

Le vie di segnale regolate da TRPV1, sono implicate in un incremento dell'eccitabilità neuronale che si osserva dopo trattamento con il paclitaxel e sono associate a un'alterazione della clearance del glutammato, il neurotrasmettitore eccitatorio noto per essere in grado di indurre l'espressione di TRPV1 nei neuroni DRG tramite attivazione di mGluR1 (Masuoka et al, 2016), recettore metabotropico del glutammato, fa parte di una famiglia di proteine di membrana che interagiscono con il glutammato e sono responsabili nella trasmissione dei segnali eccitatori tra le cellule nervose; il funzionamento di questi recettori è fondamentale nell'insorgenza dei disturbi nervosi tra cui anche quelli indotti dalla chemioterapia, perché sono responsabili dei meccanismi definiti di "plasticità sinaptica", ovvero le capacità che le connessioni tra neuroni hanno di adattarsi all'ambiente.

L'attivazione delle vie del segnale del TRPV1, anche da parte di ligandi naturali come la capsaicina (uno dei principi attivi del peperoncino piccante), determina un aumento dei livelli di espressione di CGRP, il peptide correlato al gene della calcitonina; è composto da 37 amminoacidi ed è prodotto mediante lo *splicing* alternativo del gene della calcitonina, è un potente peptide vasodilatatore che interviene nella trasmissione del dolore ed è responsabile solitamente dei dolori avvertiti nell'emicrania. Le incubazioni ripetute *in vitro* di neuroni sensitivi DRG a diametro ridotto derivanti da ratti adulti, insieme al paclitaxel non hanno evidenziato un rilascio sostenuto del suddetto peptide ora menzionato, tuttavia lo studio ha mostrato che anche basse concentrazioni di paclitaxel possono incrementare il rilascio di CGRP se stimolato anche dalla capsaicina, mentre concentrazioni elevate del taxano in questione hanno l'effetto opposto (Pittman et al, 2014). Queste risposte non erano associate con la morte cellulare neuronale ma erano correlate agli effetti che basse concentrazioni di paclitaxel hanno sul rilascio di CGRP, il quale a sua volta stimolava l'espressione di TRPV1 e questa evidenza era supportata dai dati in vivo che dimostravano come la somministrazione di alte dosi di paclitaxel riducesse la risposta nocicettiva nei ratti (Authier et al, 2000). Per il trattamento del dolore, è stato dimostrato che la nocicezione in vivo stimolata da basse dosi di paclitaxel è attenuata mediante la somministrazione intratecale dell'antagonista selettivo di TRPV1, AMG9810, risposta che è associata all'effetto stimolatorio diretto del paclitaxel sul TRPV1.

Nonostante queste azioni antagoniste, i bloccanti del TRPV1 hanno fallito nell'obiettivo di attenuare il dolore, in più hanno causato diversi effetti avversi come la comparsa di ipertermia e perdita della percezione del calore, infatti un bloccante TRPV1 recentemente

sviluppato, NEO6860 non causa questi effetti avversi ma promuove altre reazioni come mal di testa, nausea, vertigini e ipoestesia, mentre esercita una lieve azione analgesica in pazienti con dolore al ginocchio (Arsenault et al, 2018); in questo contesto invece, i modulatori della sensibilizzazione dei TRPV1 come gli antagonisti dei GPCR e gli inibitori delle protein chinasi A o C, possono essere considerati approcci clinici interessanti per la gestione della TIPN.

Parlando sempre della famiglia recettoriale dei TRP, un altro sottotipo importante coinvolto nella trasduzione del segnale che porta alla manifestazione del dolore è TRPA1, è principalmente un mecano-sensore, la sua espressione a livello delle cellule neuronali e non neuronali responsabili della trasduzione del dolore ha svelato il suo meccanismo dannoso in condizioni dolorose come l'artrite reumatoide e la neuropatia, anche se il contributo di TRPA1 alla TIPN non è stato abbastanza compreso e caratterizzato come quello invece fornito dal sottotipo V1, è noto però che le azioni antineoplastiche del paclitaxel, ovvero la sua capacità di induzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno, sono sinergiche con l'attivazione dei recettori A1, anch'essi in grado di indurre stress ossidativo (Barriere et al, 2012); studi effettuati su roditori hanno evidenziato che TRPA1 è importante per entrambe le risposte nocicettive termiche e meccaniche al paclitaxel e in dimostrazione di ciò, la somministrazione al topo di una singola dose dell'antagonista TRPA1 selettivo HC030031 riduce l'ipersensibilità termica e meccanica indotta dal paclitaxel (Chen et al, 2015). Sorprendentemente, TRPA1 sembra partecipare solo negli effetti dovuti a somministrazioni ripetute di paclitaxel, anche se tuttavia non sono state rilevate differenze nelle soglie di attivazione del dolore alla stimolazione meccanica e termica, a seguito di una singola somministrazione di paclitaxel (Zhao et al, 2012). Come osservato per i sottotipi V1, il ruolo di TRPA1 nella neuropatia periferica indotta da paclitaxel può anche dipendere dalla quantità di taxano usata per stimolare i neuroni sensitivi a diametro ristretto, infatti colture di neuroni incubate con l'agonista del TRPA1, l'allil isotiocianato, rilasciano un quantitativo minore di del peptide CGRP che segue solitamente alla presenza di elevate concentrazioni di paclitaxel (Pittman et al, 2014).

Infine, l'ultimo sottotipo recettoriale appartenente alla famiglia dei recettori a potenziale transiente che è coinvolto nell'insorgenza della neuropatia da taxani, è il TRPV4 il quale è stato descritto per la prima volta come un sensore dell'osmosi, o osmosensore, attivato dallo stress ipo-osmotico e implicato nella trasduzione sensoriale alla stimolazione meccanica; è espresso nei neuroni DRG e nei neuroni sensitivi del ganglio del trigemino (Alessandri-Haber et al, 2003), infatti i mediatori chimici dell'infiammazione sono anche in grado di

sensibilizzare i neuroni DRG all'ipotonicità, determinando un incremento delle concentrazioni di calcio intracellulare. L'infiammazione sensibilizza i roditori agli effetti nocicettivi dell'ipotonicità, determinando nocicezione e iperalgesia meccanica, ma anche questi però sono assenti se impieghiamo antagonisti selettivi del TRPV4 o in topi deficitari per il gene che codifica per il suddetto recettore (Alessandri-Haber et al, 2006; Alessandri-Haber et al, 2003; Costa et al, 2018). Un altro ruolo è stato proposto per il recettore, evidenziato dal fatto che la neuropatia periferica da paclitaxel, a seguito di un'iniezione intra-plantare di una soluzione ipotonica era impedita dalla delezione genica di TRPV4 (Alessandri-haber et al, 2004); alla stessa maniera, l'ipersensibilità meccanica indotta dal paclitaxel veniva ridotta in ratti e topi deficitari per il gene TRPV4 e nei ratti trattati con oligonucleotidi antisenso contro TRPV4 ( Alessandri-Haber et al, 2008; Alessandri-Haber et al, 2004), ovvero oligodesossinucleotidi aventi sequenza complementare(antisenso) alla sequenza del DNA che codifica per la proteina bersaglio(senso), in questo caso quella specifica per TRPV4; questa classe di farmaci biotecnologici in genere agisce attraverso due meccanismi:

- 1) **Meccanismi degradativi:** L'oligonucleotide antisenso si lega alla molecola di RNA trascritta dal gene che codifica per la proteina bersaglio, una volta formato il complesso DNA-RNA abbiamo l'attivazione delle RNasi H, enzimi che degradano l'RNA in questione e impediscono la traduzione e quindi la sintesi della proteina.
  
- 2) **Meccanismi non degradativi:** In questo caso l'oligonucleotide antisenso si lega direttamente al DNA bersaglio, ed è il caso degli oligonucleotidi contro il gene TRPV4 appena citati, dal punto di vista chimico sono creati con delle modificazioni specifiche nella struttura che consentono la complessazione alla molecola di DNA senso che codifica per la proteina bersaglio, una volta formato il complesso DNA antisenso-DNA senso, il DNA senso non può essere trascritto dalla RNA polimerasi ne tradotto, con conseguente compromissione della sintesi della proteina.

Oltre a questi sono stati proposti altri diversi meccanismi deputati all'incremento dell'attività dei recettori TRPV4 nella neuropatia periferica da paclitaxel, tra questi abbiamo la sensibilizzazione dei suddetti recettori con le vie di segnale integrina/Src tirosin chinasi, le protein chinasi C e A; la prima menzionata consiste di un sistema per mezzo del quale si ha l'arresto e il successivo reclutamento di diverse popolazioni di leucociti nel sito infiammatorio, portando quindi a un incremento della risposta infiammatoria in quel sito; le

integrine sono proteine transmembrana composte di due subunità extracellulari alfa e beta, due porzioni transmembrana ad alfa-elica e altre due subunità citoplasmatiche, le subunità alfa e beta consentono il legame con proteine della matrice extra-cellulare (fibronectina, collagene), mentre le subunità all'interno del citoplasma sono deputate all'interazione con le strutture del citoscheletro e molecole di segnale tra cui le tirosin chinasi, nello specifico quelle coinvolte nella suddetta via di segnale, le Src che sono tirosin chinasi non recettore, venendosi a formare dei complessi proteici con il coinvolgimento anche di altre proteine di segnale intracellulari e la formazione di queste strutture multiproteiche permette tutta una serie di meccanismi diretti a reclutare le cellule infiammatorie nel sito d'azione, consentirne l'adesione intercellulare e alla matrice extracellulare del sito, stimolarne la proliferazione e la sopravvivenza; per quanto riguarda le protein chinasi A e C, esse rappresentano due proteine di trasduzione del segnale nel meccanismo d'azione dei recettori accoppiati alle proteine G, tra questi ne abbiamo 2 come il recettore 2 attivato dalle proteasi e le bradichinine B1 e B2, i quali stimolano i TRPV4 (Chen et al, 2011; Costa et al, 2018)

Tutti quei farmaci che agiscono sui TRPV4 hanno applicazioni terapeutiche nella gestione e risoluzione della neuropatia periferica da taxani, però per quanto riguarda l'effetto preventivo degli antagonisti TRPV4 sulla neuropatia periferica indotta da taxani, questo deve ancora essere valutato.

Un'altra tipologia di canali ionici implicati nell'insorgenza della TIPN è rappresentata dalla famiglia dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e anche per questi esistono agenti terapeutici i quali possono modularne la funzione; per prime abbiamo la **gabapentina** e la **pregabalina** (Tabella 3), due farmaci ampiamente utilizzati nel trattamento della neuralgia post-erpetica e della neuropatia diabetica periferica, in quanto essi riducono l'eccitabilità delle cellule nervose tramite il legame a una subunità specifica( alfa-2-delta-1), entrambi i farmaci hanno mostrato efficacia nella TIPN nei roditori, attraverso la sovra-regolazione di quella subunità specifica nei neuroni DRG (Mangaiarkkarasi et al, 2015; Matsumoto et al, 2006). Sebbene pochi studi clinici abbiano provato la loro efficacia nella TIPN, gabapentina e pregabalina sono state utilizzate per trattare il dolore neuropatico causato dai taxani; la somministrazione di una o dell'altra ha migliorato i sintomi del dolore neuropatico nei pazienti in terapia con paclitaxel e carboplatino, anche se a causa degli effetti collaterali di entrambe queste due molecole, si è preferito indagare su altri agenti modulatori dei canali del calcio.

I risultati sperimentali suggeriscono che i bloccanti di un'isoforma di questi canali, la  $Ca_v3.2$  tipo-T, possono essere efficaci nel trattamento della TIPN, in quanto l'aumento

dell'espressione e dell'attività dei  $Ca_v3.2$  sono state rilevate in campioni di neuroni DRG del ratto e due diversi meccanismi sono stati attribuiti all'iperattività di questo canale. Una diretta attivazione mediante il solfuro di idrogeno e una indiretta attivazione attraverso TLR4 (Toll-like receptor 4), recettore implicato nel riconoscimento di molecole estranee all'organismo per l'innescamento della risposta infiammatoria (Li et al, 2017; Okubo et al, 2011). E' rilevante il fatto che se viene silenziata l'espressione dei geni per i  $Ca_v3.2$  tramite l'iniezione intratecale di oligonucleotidi antisenso, abbiamo la soppressione della neuropatia periferica.

Parliamo ora invece dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, la cui alterata espressione ed attività nei neuroni sensitivi contribuisce al dolore neuropatico e infiammatorio, d'altronde gli studi precedenti hanno suggerito il ruolo anche di questi canali nella TIPN, in quanto i loro bloccanti attenuano l'ipersensibilità termica e meccanica indotta dal paclitaxel nei ratti (Nieto et al, 2008; Xiao et al, 2008). I principali sottotipi appartenenti a questa famiglia sono  $Na_v1.1-1.4$  e  $Na_v1.6-1.7$  e tra questi il sottotipo 1.7 è stato rilevato a livelli alti di espressione soprattutto nella corteccia cingolata anteriore del topo dopo iniezione di paclitaxel, sottolineando un ruolo specifico per questo sottotipo 1.7 localizzato nella suddetta area cerebrale; più recentemente,  $Na_v1.7$  è stato trovato sovra-espresso anche nei neuroni DRG a diametro ristretto dopo il trattamento con paclitaxel nei ratti.

Il blocco dei canali del sodio, nello specifico quello selettivo per i sottotipi 1.7, può avere un impatto positivo nel trattamento della neuropatia, infatti l'iniezione intratecale o intraganglionica di **immunoglobuline** anti- $Na_v1.7$  contrasta gli effetti della TIPN nei modelli roditori (Bang et al, 2018; Xia et al, 2016).

Abbiamo parlato dei canali voltaggio-dipendenti, l'ultimo gruppo di questi coinvolti, tra i vari target identificati finora, nello sviluppo di effetti correlati alla neuropatia periferica da taxani è rappresentato dai canali del potassio voltaggio-dipendenti e sensibili all'ATP, i quali sono stati imputati nella mediazione degli effetti antinocicettivi esercitati da vari composti. Nello specifico, ligandi di questi canali come donatori di gruppi sulfidrilici manifestavano attività anti-allodinia nell'ipersensibilità al freddo nel topo indotta dal paclitaxel, una risposta che risultava attenuata dal bloccante del sottotipo  $K_v7$ , **XE991** (Di Cesare Mannelli et al, 2017). Oltre a questo composto, la **glibenclamide** (Tabella 3), farmaco ipoglicemizzante appartenente alla classe chimica delle solfaniluree, in virtù della sua azione a livello dei recettori dell'insulina che hanno un sistema di trasduzione del segnale che utilizza ATP, ha mostrato un'azione inibitoria anche su questi canali del

potassio sensibili all'ATP, esercitando così effetti antinocicettivi instaurati dalla TIPN nei topi (Braga et al, 2019; Brito et al, 2018).

Dopo tutte queste evidenze sperimentali in ambito pre-clinico, si è passati alle strategie cliniche per minimizzare la neurotossicità da taxani, ma tuttavia queste risultano limitate. In accordo con la “ **American Society of Cancer**” e la “ **American Society of Clinical Oncology recommendations**”, l'unico farmaco approvato dalla FDA per il trattamento della CIPN è la **duloxetina** (Tabella 3), mentre i farmaci che solitamente sono efficaci nel trattamento del dolore neuropatico di origine eziologica diversa da quello causato dalla chemioterapia, tra cui gabapentina, pregabalina e amitriptilina (Tabella 3), hanno fallito nel ridurre la neuropatia da chemioterapici in generale e quella da taxani (Quintao et al, 2019).

I trial clinici in corso hanno fatto ricerca su nuove strategie farmacologiche, tra queste sono presenti nutraceutici e agenti chemoprotettivi i quali hanno attività antiossidanti (Tab ), poi abbiamo anche:

- 1)Modulatori dei canali TRP
- 2)Agonisti cannabinoidi
- 3)Gangliosidi

Inoltre tossine e nuove formulazioni di taxani si stanno valutando nell'intento di incrementare il numero di terapie efficaci per trattare la neurotossicità da taxani (Tabella 3 ), anche se sfortunatamente, molti di questi trials clinici non hanno ancora pubblicato i loro risultati limitando in questa maniera la predisposizione di protocolli terapeutici.

Study	Taxane	Trial # or reference	Country	Subjects	Start (year)	Status	Remarks
<b>Antidepressants</b>							
Duloxetine	PTX/DTX	NCT00489411	USA	231	2008	Completed	Phase III—pain reduction
	PTX/DTX	NCT00489411	USA	106	2008	Completed	Phase III—pain reduction
Amitriptyline	PTX/DTX	Kautio et al., 2009	Finland	114	2003	Completed	Preventive protocol; use not supported
Topical amitriptyline/ketamine	Taxanes	NCT00471445	USA	462	2007	Completed	Use not supported
<b>Anticonvulsant</b>							
Gabapentin	PTX/DTX	NCT00027963	USA	100	2002	Completed	Phase III—use not supported
Pregabalin	PTX/DTX	NCT02394951	USA	26	2015	Completed	Results not mentioned
Lamotrigine	PTX/DTX	Rao et al., 2008	USA	131	2004	Completed	Use not supported
<b>Chemoprotective agent</b>							
Dimesna (BNP7787)	PTX	NCT00003569	USA	2	2003	Completed	Phase I—results not mentioned
	PTX	NCT00039780	USA	764	2001	Completed	Phase III—results not mentioned
Amifostine trihydrate	PTX	NCT00003072	USA	80	2004	Completed	Phase II—results not mentioned
Amifostine	PTX	NCT00078845	USA	24	2004	Completed	Phase II—results not mentioned
Olesoxime (TRO19622)	PTX/DTX	NCT00876538	France	17	2009	Completed	Phase II—results not mentioned
<b>Antioxidant agent</b>							
GSH	PTX	NCT02311907	USA	195	2014	Completed	Phase III—results not mentioned
<b>Antibiotic</b>							
Minocycline hydrochloride	PTX	NCT02297412	USA	47	2014	Completed	Phase II—results not mentioned
<b>Nutraceutical</b>							
Nicotinamide riboside	PTX	NCT03642990	USA	39	2018	Recruiting	Phase II
Vitamins B6 and B12	PTX/DTX	NCT00659269	USA	319	2008	Completed	Phase III—results not mentioned
Calcium gluconate and magnesium sulfate	PTX	NCT01682499	USA	50	2012	Completed	Phase I—results not mentioned
L-Carnitine L-Tartrate	PTX/DTX	NCT00754767	USA	2	2007	Terminated	Phase IV—insufficient participants
Acetyl-L-carnitine hydrochloride	PTX/DTX	NCT00775645	USA	437	2008	Completed	Phase III—unsupported use
	PTX/DTX	NCT01526564	China	239	2012	Completed	Phase III—results not mentioned
Omega-3/Vitamin D3	PTX/DTX	NCT02294149	Canada	600	2014	Unknown	Phase III
Vitamin E	PTX/DTX	NCT00363129	USA	207	2006	Completed	Phase III—use not supported
<b>TRP agonist</b>							
Menthol	PTX/DTX	NCT01855607	USA	60	2013	Unknown	Phase II
<b>Cannabinoid agonist</b>							
Cannabinoids	PTX/DTX	NCT03782402	USA	100	2019	Recruiting	Phase II
Nabiximol	PTX	NCT00872144	Canada	16	2009	Completed	Phase III—reduced pain
<b>Toxin</b>							

Study	Taxane	Trial # or reference	Country	Subjects	Start (year)	Status	Remarks
IncobotulinumtoxinA (Xeomin®, Merz)	PTX/DTX	NCT03571334	USA	40	2018	Not yet recruiting	Phase II
Tetrodotoxin	PTX/DTX	NCT01655823	USA	125	2012	Terminated	Phase II—preceded to phase III trial
Association							
Memantine XR–pregabalin combination	PTX/DTX	NCT03272919	USA	20	2017	Recruiting	Observational study
Baclofen–amitriptyline hydrochloride–ketamine gel (BAK)	PTX/DTX	NCT00516503	USA	208	2007	Completed	Phase III—reduced pain
Other							
Monosialoganglioside	PTX	NCT02500810	China	106	2015	Recruiting	Phase II
Ganglioside–monosialic acid	PTX/DTX	NCT02468739	China	206	2015	Completed	Phase III—results not mentioned
Nano formulation							
Nab-PTX	PTX	NCT01763710	Spain	60	2012	Completed	Phase II—results not mentioned

Tabella 3: Trials clinici per la neurotossicità da taxani (Da Costa et al, 2020). Abbreviazioni: DTX, docetaxel; PTX, paclitaxel.

## CAPITOLO 9

### NEUROTOSSICITA' DA ALCALOIDI DELLA VINCA

Gli alcaloidi della vinca sono dei composti naturali (vincristina e vinblastina) e semi-sintetici (vindestina e vinorelbina) utilizzati come agenti chemioterapici da soli o in combinazione con altri farmaci per trattare tumori ematologici, cancro ai testicoli, mieloma, sarcomi, carcinoma polmonare a cellule non piccole e carcinoma renale, epatico, polmonare, tumore al cervello e al seno (Islam et al, 2019). La **vincristina** è tra i farmaci con più ampio impiego tra questi alcaloidi ed esercita il suo effetto citotossico legando la subunità-beta dell'etero-dimero di tubulina, interferendo sia nel processo di formazione dei microtubuli, sia inibendo i meccanismi di formazione del fuso mitotico nelle cellule che si stanno dividendo durante la metafase, portando come conseguenza alla morte cellulare per apoptosi (Burgess et al, 2022). La più comune forma di neuropatia periferica indotta da vincristina (VIPN) è una neuropatia sensoriale lunghezza-dipendente la quale va a lesionare le fibre sensitive, determinando un'alterazione delle funzioni autonome le quali sono responsabili della costipazione, ritenzione urinaria e ipotensione ortostatica, con una compromissione significativa anche delle fibre motorie che coinvolge occasionalmente anche il nervo cranico (Ness et al, 2013). Come nel caso dei composti di platino e dei taxani, non è sufficiente ridurre la dose o interrompere la terapia con vincristina per una remissione della neuropatia periferica.

L'eziologia della VIPN comprende diversi meccanismi, nello specifico gli alcaloidi della vinca interferiscono con l'assemblamento dei microtubuli e la formazione del fuso mitotico (Topp et al, 2000, Stanton et al, 2011), i quali si rivelano due attività fondamentali per le operazioni di trasporto anti-retrogrado degli organelli e delle proteine di membrana e per il trasporto retrogrado di molecole di segnale lungo l'assone (Figura 11), tutto questo dipende dal sistema strutturale messo in atto dai microtubuli (Widebank et al, 2008; Cioroiu et al, 2017); la vincristina è inoltre mitotossica e può interferire con la catena di trasporto degli elettroni, risultando in un'insufficiente produzione di energia che è essenziale per l'attuazione della mitosi (Joseph et al, 2006). La degenerazione assonale indotta da vincristina, responsabile della neuropatia assonale lunghezza-dipendente, richiede invece l'attivazione di SARM1 ( *Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1* ) e l'attivazione della via di segnale MAPK; SARM1 è un enzima membro della famiglia dei recettori TIR (*Toll/interleukin receptor-1*), possiede un'intrinseca attività NADasica altamente conservata nella specie umana e nei mammiferi è altamente espresso soprattutto nei neuroni, dove

risiede sia nei corpi cellulari che negli assoni; rappresenta principalmente un sensore dello stress metabolico ed è coinvolto nell'attuazione dei meccanismi di morte neuronale, infatti si è osservato che la delezione del gene *SARM1* protegge il topo dall'insorgenza della VIPN (Gerdtts et al, 2016).

La neuropatia da vincristina comprende inoltre un'alterazione dei livelli di citochine nel sangue (Figura 11), nel tessuto nervoso centrale e periferico tramite un incremento delle citochine plasmatiche come  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-2, IL-1 $\beta$  e IL-6 nei nervi periferici, nel midollo spinale e nel cervello (164,169,171, Singh et al, 2019; Qin et al, 2020; Greeshma et al, 2015). Anche in questo caso, come per i composti del platino, il contributo delle citochine nella VIPN è stato segnalato assieme all'infiltrazione dei macrofagi nei neuroni del DRG e nel nervo sciatico (173,175, Kiguchi et al, 2008; Old et al, 2014). L'infiltrazione monocito-macrofagica è causata da un'attivazione delle cellule endoteliali che insieme alla compromissione dell'integrità delle giunzioni strette (barriere dell'endotelio che ostacolando il passaggio dei componenti vascolari negli spazi extravascolari), richiama i monociti a rientrare nel cordone spinale. il rilascio delle citochine infiammatorie è stato associato a differenti vie di segnalazione e tra queste, l'attivazione della chemochina **CX3CL1** e il suo successivo legame al recettore **CX3CR1** nella microglia, determina l'attivazione di una via del segnale (MAPK) che promuove la secrezione e il rilascio delle citochine. La localizzazione contemporanea dei marcatori gliali insieme al  $\text{TNF-}\alpha$ , dimostra che questa citochina viene rilasciata dalle cellule gliali ed è responsabile dell'allodinia meccanica indotta da vincristina.

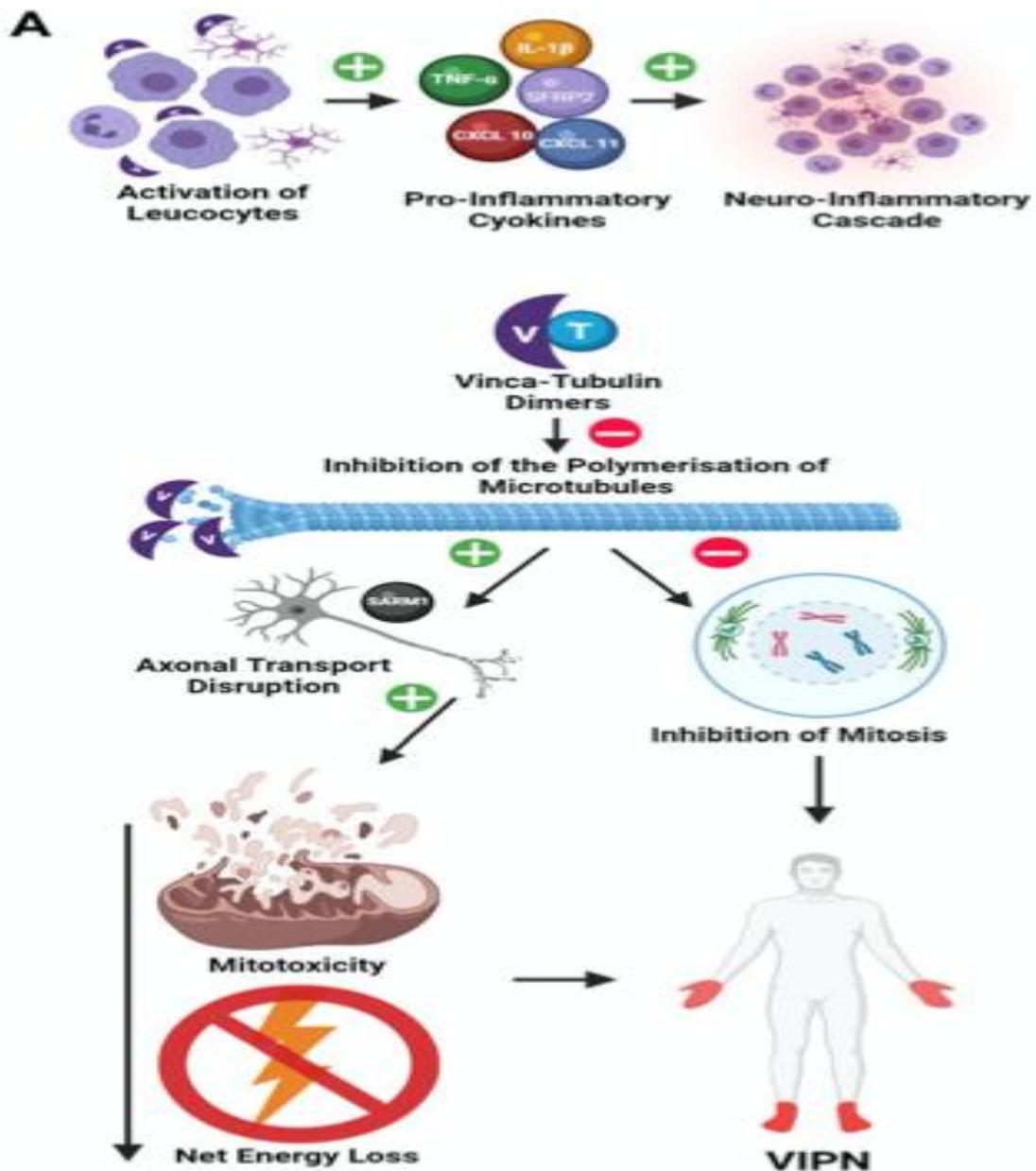


Figura 11: Principali meccanismi coinvolti nella patogenesi della neuropatia periferica da alcaloidi della vinca (Burgess et al, 2021).

### 9.1 Trattamento della neuropatia periferica da alcaloidi della vinca

La neuropatia causata da alcaloidi della vinca, nello specifico la vincristina è, come per le altre classi di chemioterapici, uno degli principali effetti dose-limitanti il quale determina un'interruzione precoce della terapia antineoplastica, impattando enormemente sulla sopravvivenza dei pazienti; al giorno d'oggi le strategie terapeutiche impiegate contro il dolore neuropatico indotto da vincristina sono limitate ad alcuni farmaci come anticonvulsivanti, oppioidi e antidepressivi triciclici, tutti quanti associati ad un ampio spettro di effetti avversi che limitano quindi il loro utilizzo clinico (Gong et al, 2016). Nell'obbiettivo di migliorare i disturbi generati dalla neuropatia periferica ed in particolare

abbiamo necessità di farmaci innovativi in grado di rimediare ai danni neurologici indotti dalla vincristina, ma senza però attenuare i suoi effetti anticancerogeni in quanto sono molto richiesti. Nella discussione sui meccanismi responsabili dell'insorgenza del dolore neuropatico e della neuro-infiammazione abbiamo menzionato la via del segnale della MAPK, la quale include la protein chinasi attivata dalla proteina p38, il dominio chinamico N-terminale c-jun (JNK) e la chinasi ERK, i cui livelli risultano incrementati nel corno dorsale del midollo spinale dopo una lesione nervosa, esercitano un ruolo cruciale nella fisiopatologia della VIPN, di conseguenza, gli inibitori della via di segnale MAPK miglioravano i sintomi del dolore neuropatico (Popiolek-Barczyk, Mika J., 2016); inoltre, evidenze note indicano che l'attivazione di JNK porta all'apoptosi, accelerando, insieme alla risposta infiammatoria il danno nervoso periferico associato alla vincristina. Per di più, come abbiamo visto per i taxani, anche nel caso della vincristina abbiamo l'attivazione dei nocicettori TRP, in particolare TRPV2 e TRPM8, la cui attivazione porta allo sviluppo di ipersensibilità termica e meccanica nei modelli roditori; TRPV1 si trova in diverse aree del sistema nervoso centrale, come il corno dorsale spinale, dove regola la trasmissione sinaptica dei segnali nocicettivi che giungono dalle aree periferiche, di conseguenza, anche in questo caso, l'inibizione farmacologica di TRPV1 allevia l'ipersensibilità al dolore nei modelli roditori del dolore neuropatico (Cao et al, 2013; Julius, 2013). Alla stessa maniera i livelli di espressione di TRPM8 aumentano nel cordone spinale e nei DRG nei modelli animali e pure questo è pensato come target per il trattamento del dolore neuropatico. Infine bisogna ricordare che esistono anche i fenomeni di stress ossidativo indotti da vincristina nella patogenesi del dolore neuropatico, essa promuove infatti la sintesi di marcatori di stress ossidativo come la malondialdeide (MDA), mieloperossidasi (MPO) e ossido nitrico, con successiva deplezione di antiossidanti, il glutatione, la catalasi glutatione-S-transferasi e superossido dismutasi nel cordone spinale e nel nervo sciatico del topo (Gong et al, 2016; Vashistha, Sharma, 2017).

Iniziamo a introdurre le potenziali strategie terapeutiche; i withanolidi sono una classe di lattoni steroidei che possiedono proprietà immunomodulatorie, antimicrobiche, antiossidanti e antinfiammatorie (Chen, He, 2011), tra questi **withametelin** è un derivato ottenuto dalle foglie di *Datura Innoxia* e cercheremo di esplorare ora gli effetti di questo composto nel dolore neuropatico indotto dalla vincristina attraverso il coinvolgimento dei nocicettori TRP, la via del segnale MAPK, l'apoptosi e lo stress ossidativo utilizzando tecniche immunoistochimiche e istopatologiche.

Ora segue una rassegna di tutte le sperimentazioni aventi l'obiettivo di dimostrare l'efficacia del **withamethelin** nella sua azione di riduzione del dolore neuropatico indotto da vincristina; ogni sperimentazione impiega metodologie di analisi diverse e si focalizza sulle principali strutture del sistema nervoso centrale e nel nervo sciatico, analizzando come variano i livelli delle diverse biomolecole coinvolte nella generazione del dolore neuropatico a seguito della somministrazione di vincristina.

Per sperimentare l'effetto neuroprotettivo del **withamethelin** contro la citotossicità indotta da perossido di idrogeno è stato messo a punto un saggio che prevedeva l'utilizzo del bromuro di dimetiltiazolil-difeniltetrazolo (MTT); una coltura di cellule, denominate PC12 vennero dapprima pre-trattate con WMT a diverse concentrazioni (1, 10, 50, 100 microM), curcumina (50 microM) per circa 2 ore prima dell'introduzione di acqua ossigenata a 200 microM, WMT ha dimostrato attenuare marcatamente la perdita cellulare indotta da quest'ultima, in un mezzo dose-dipendente, a confronto con quello delle cellule nelle quali è stato introdotto il perossido di idrogeno da solo e furono misurati anche i livelli di ossido nitrico e GSH. I risultati hanno rivelato che il WMT sopprimeva in maniera significativa lo stress ossidativo, incrementando i livelli di GSH e riducendo quelli di ossido nitrico (Figura 12) (Khan et al, 2021).

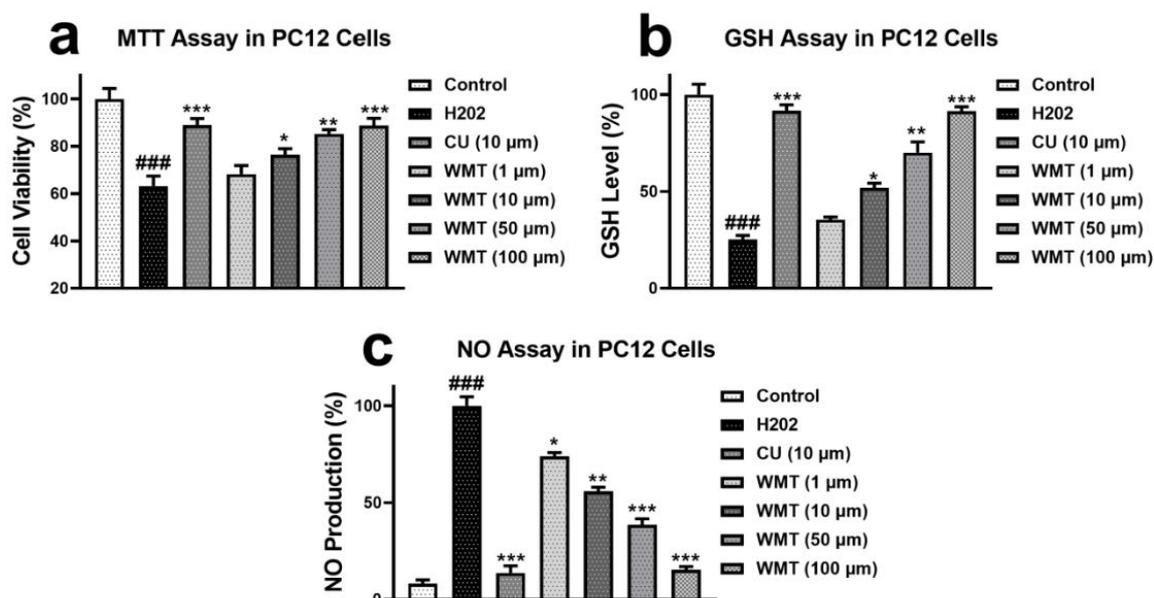


Figura 12: Effetto del WMT (1, 10, 50 & 100 microM) sulla vitalità cellulare (a), livelli di GSH (b), produzione di NO (c) in cellule PC12 in presenza di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Khan et al, 2021).

La somministrazione consecutiva di vincristina per 10 giorni consecutivi è risultata in un notevole incremento dell'ipersensibilità al dolore, come dimostrato dalla diminuzione della soglia di attivazione nell'allodinia meccanica, allodinia fredda e iperalgesia termica; il trattamento con **withmethelin** contrasta l'allodinia meccanica, quella fredda e l'iperalgesia termica (Figura 13) (Khan et al, 2021).

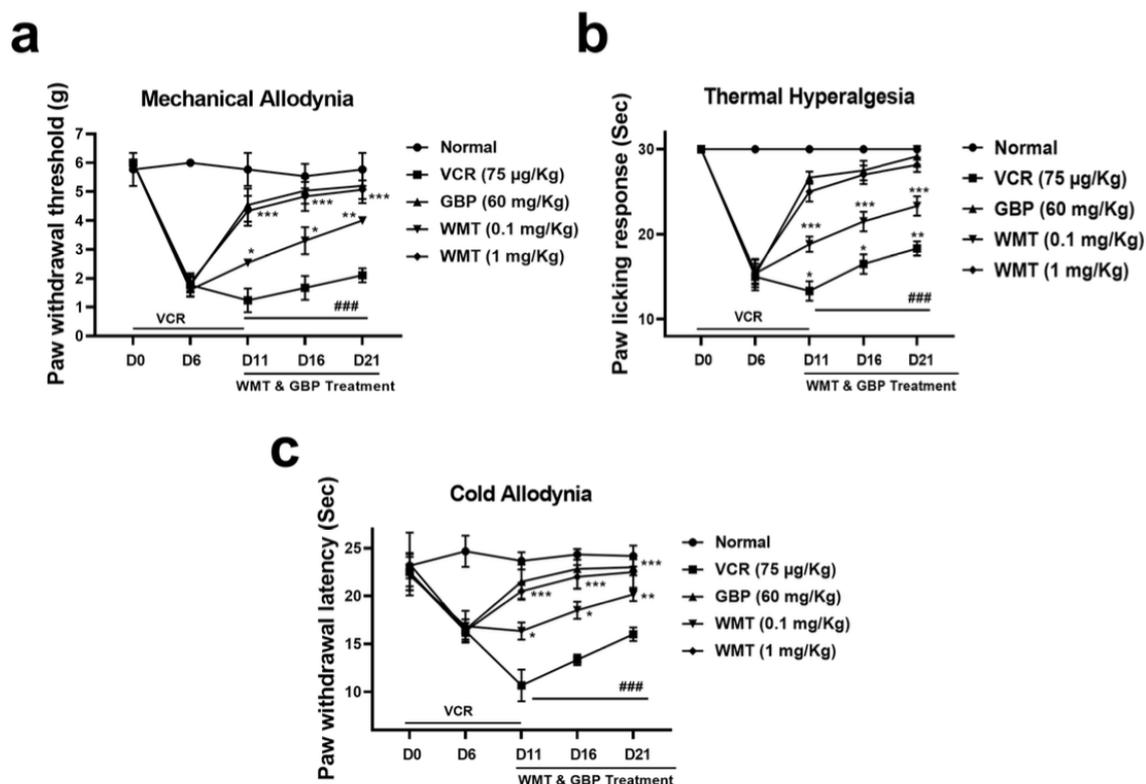


Figura 13: Effetti del withamethelin (0.1, 1 mg/kg) e GBP (60 mg/kg) sull'allodinia meccanica prodotta da VCR, (a) iperalgesia termica, (b) allodinia fredda (c). (Khan et al, 2021).

Per dimostrare il potere antiossidante di WMT contro lo stress ossidativo indotto dalla vincristina, i livelli degli antiossidanti elencati in precedenza sono stati determinati nel cordone spinale (L4-L6) nel nervo sciatico e nelle regioni cerebrali ( Corteccia cingolata anteriore, amigdala, ippocampo, corteccia insulare e grigio periacqueduttale); sappiamo che la vincristina riduce in maniera significativa i livelli di antiossidanti, ma il trattamento con **withamethelin** migliora considerevolmente i livelli di questi ultimi nelle zone analizzate, in particolare aumenta l'attività della malondialdeide e della mieloperossidasi (Figura 14) (Khan et al, 2021).

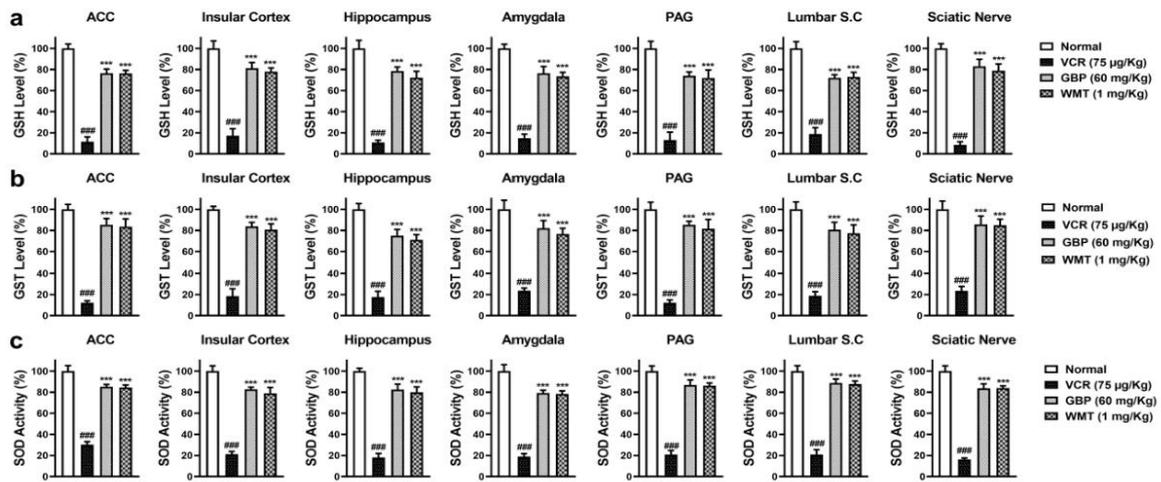


Figura 14: Effetto del withamethelin sui livelli degli antiossidanti in diverse regioni del cervello, cordone spinale e nervo sciatico in un modello trattato con vincristina. GSH (a), GST (b), SOD (c). ### p<0,001 comparato al gruppo di controllo, \*\* p<0,001 comparato al gruppo VCR (vincristina) (Khan et al, 2021).

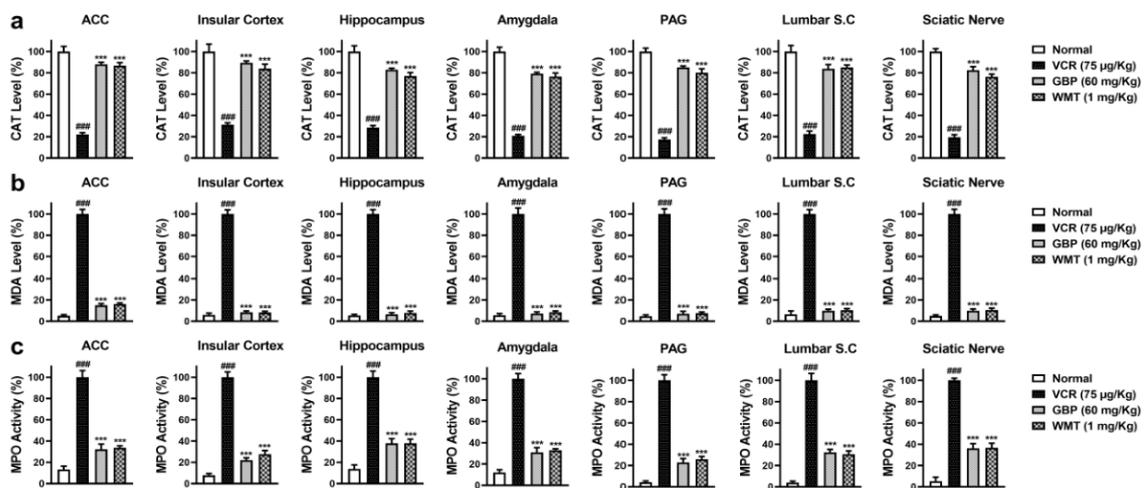


Figura 14: Effetto del withamethelin sui livelli dei marcatori del danno ossidativo in diverse regioni cerebrali, nel cordone spinale e nel nervo sciatico in un modello trattato con vincristina; CAT (a), MDA (b), MPO (c). (Khan et al, 2021).

Per quanto riguarda invece il potenziale anti-neuroinfiammatorio del WMT contro l'infiammazione indotta da vincristina, sono stati rilevati i livelli di citochine infiammatorie e ossido nitrico nelle regioni cerebrali di analizzate anche prima e sempre nel cordone spinale e nel nervo sciatico; la vincristina incrementa i livelli di citochine, mentre il WMT li sopprime, allo stesso modo l'ossido nitrico aumenta e WMT lo diminuisce drasticamente (Figura 15) (Khan et al, 2021).

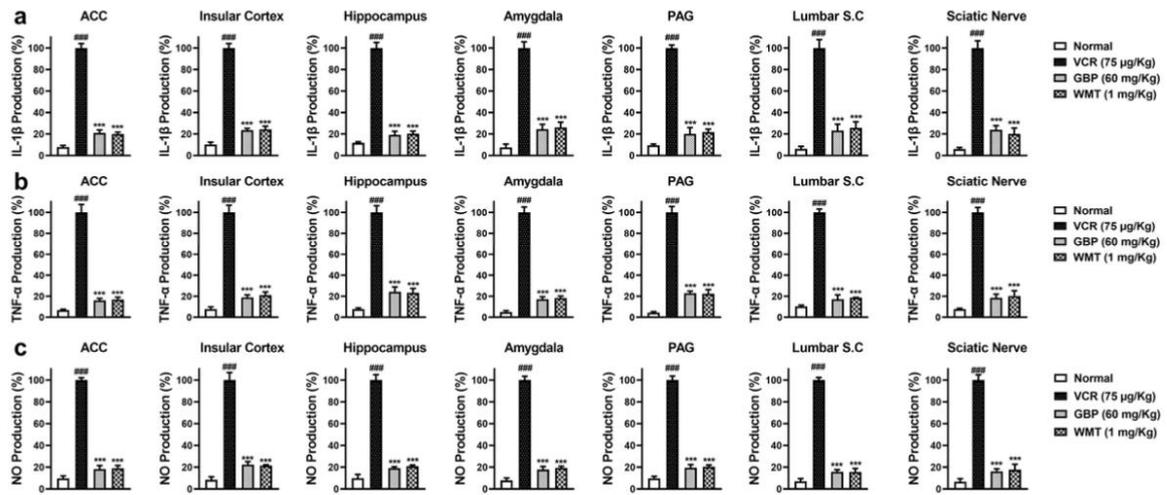


Figura 15: Effetto del withamethelin sui livelli di citochine e ossido nitrico in differenti regioni del cervello, cordone spinale e nervo sciaico in un modello trattato con VCR; IL-1 $\beta$  (a), TNF $_{\alpha}$  (b), NO (c) (Khan et al, 2021).

Analizziamo ora i cambiamenti istopatologici indotti da vincristina nel nervo sciaico; In questa analisi sono stati utilizzati i metodi di colorazione H&E (ematossilina ed eosina) e il metodo tricromico. La vincristina determina una sostanziale degenerazione, demielinazione e rigonfiamento assonale nel nervo sciaico in confronto al gruppo normale; **withamethelin** attenua in maniera marcata i cambiamenti istopatologici indotti dalla vincristina.

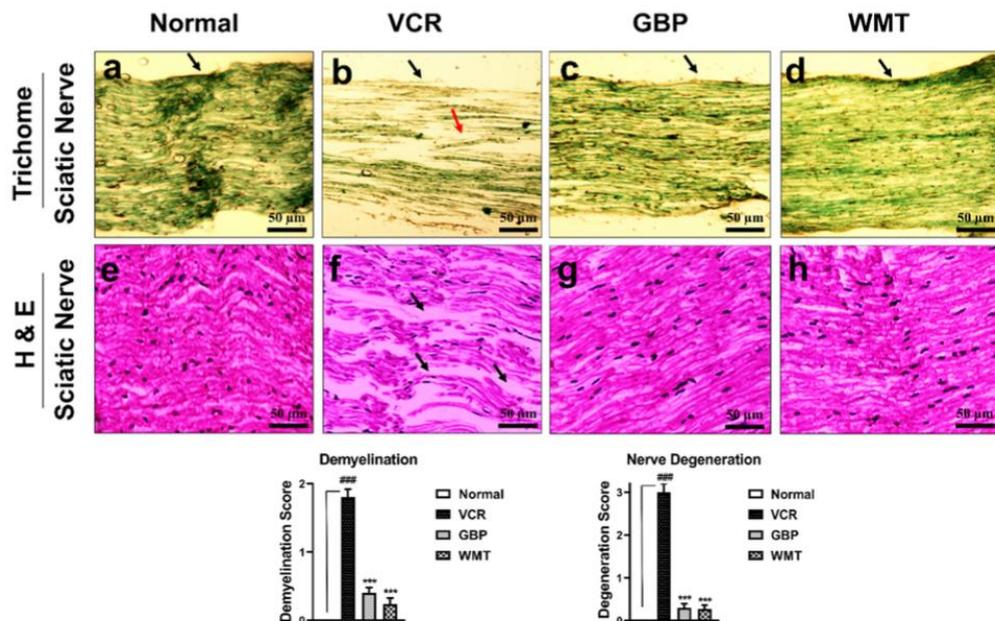
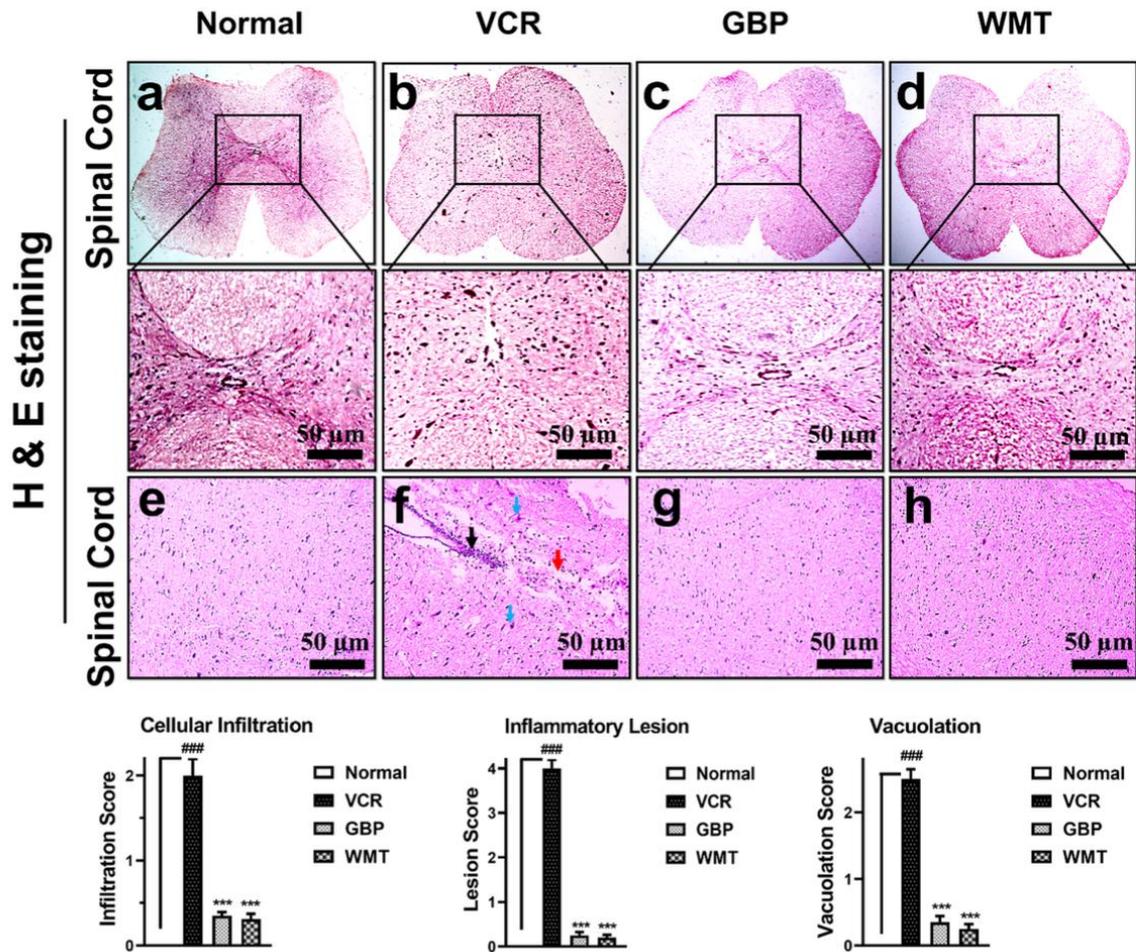


Figura 16: Effetto del withamethelin sui cambiamenti istopatologici nel nervo sciaico (colorazione H&E e tricromica). Rappresentazione fotomicrografica del nervo sciaico. Normal (a, e), VCR (b,f), GBP, gabapentina (c,g) e WMT (d,h). (Khan et al, 2021).

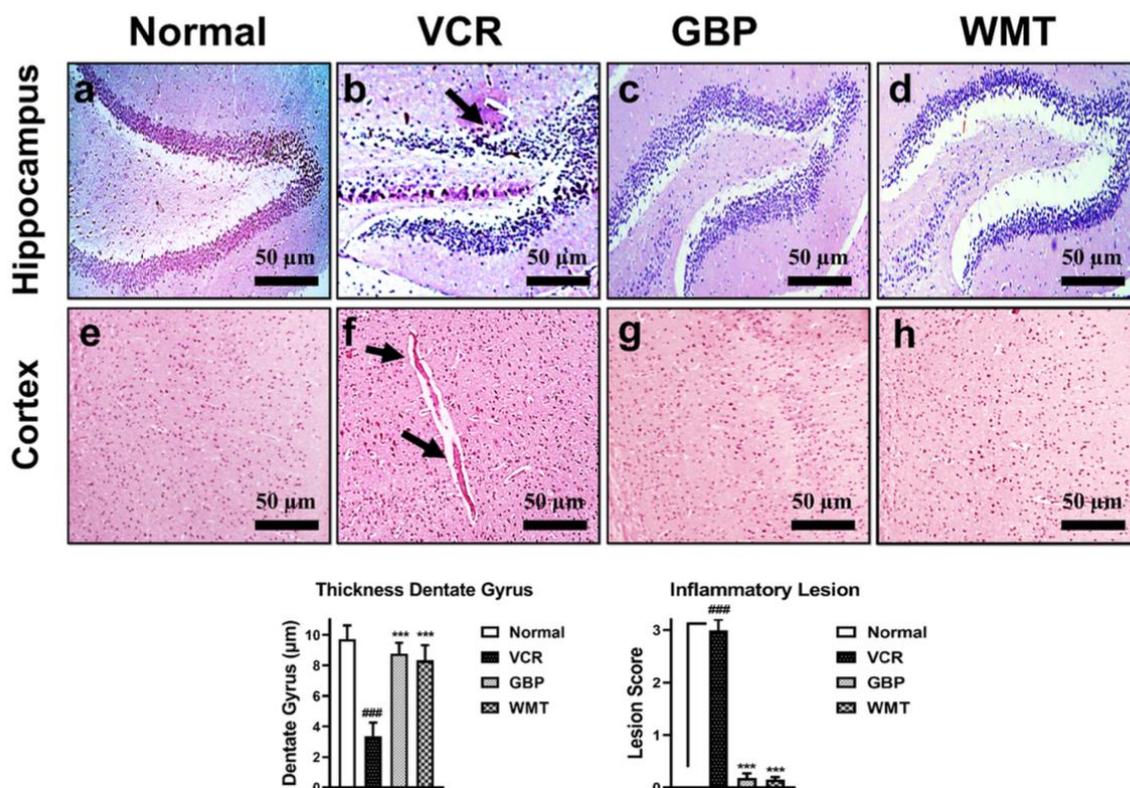
Withmethelin e la gabapentina inibiscono le alterazioni istopatologiche nel nervo sciatico; In (a) la freccia nera mostra una normale guaina mielinica e una normale disposizione delle fibre; in (b), la freccia nera mostra una demielinazione mentre la freccia rossa una disorganizzazione delle fibre, (c,d) mostrano una riparazione delle fibre demielinizzate e disorganizzate; similmente in (f), la freccia nera mostra disorganizzazione/ degenerazione del nervo e rigonfiamento assonale; (g,h) mostrano la riparazione della disorganizzazione/degenerazione del nervo e rigonfiamento assonale, comparato al gruppo trattato con vincristina (Khan et al, 2021).

Se invece vogliamo osservare le variazioni istopatologiche indotte dalla vincristina, nello specifico a livello del midollo spinale, analizziamo una sezione trasversale di questo tessuto (colorazione H&E); un incremento significativo dell'infiltrazione delle cellule infiammatorie e cambiamenti vacuolari sono stati osservati nella sezione trasversale del cordone spinale nel gruppo trattato con vincristina; nel gruppo trattato con WMT osserviamo invece una riduzione significativa delle infiltrazioni cellulari e delle lesioni infiammatorie (Figura 17). Per indagare ulteriormente le alterazioni istopatologiche nel cordone spinale, sono state aggiunte anche sezioni longitudinali del tessuto del cordone spinale e osserviamo che anche in questo caso nel gruppo VCR si rileva un incremento elevato dell'infiammazione e della vacuolazione, mentre nel gruppo WMT, tutte queste alterazioni vengono ridotte (Figura 17) (Khan et al, 2021).



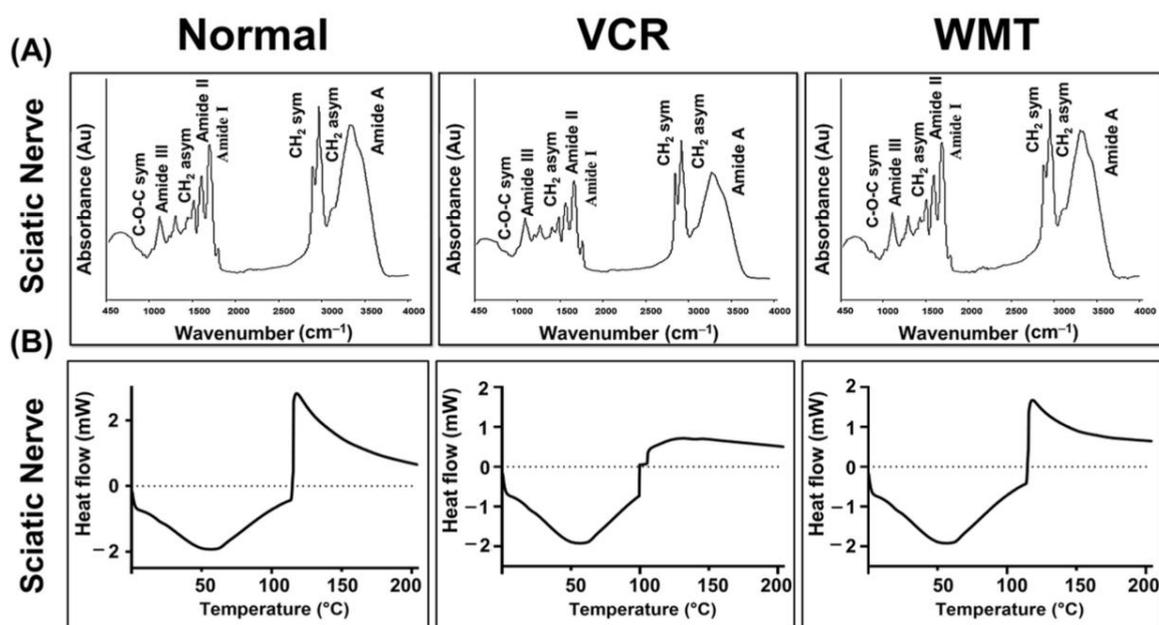
**Figura 17:** Effetto del withamethelin sui cambiamenti istopatologici nel cordone spinale. Frammenti micrografici rappresentativi della sezione trasversale del cordone spinale (H&E). Normale (a), VCR (b), GBP (c), WMT (d). Frammenti micrografici rappresentativi della sezione longitudinale del cordone spinale (H&E). Normale (e), VCR (f), GBP (g), WMT (h). Freccia nera: lesioni infiammatorie; Freccia rossa: cambiamenti vacuolari. (Khan et al, 2021).

La vincristina induce variazioni istopatologiche anche a livello cerebrale, a dimostrazione di ciò analizziamo ora dei frammenti micrografici relativi al cervello; a confronto con il gruppo normale, la vincristina diminuisce lo strato granulare della zona denominata “giro dentato ippocampale”, mentre **withamethelin** in associazione con la **gabapentina** contrasta quest’azione. Allo stesso modo, la formazione di placche infiammatorie nella corteccia cerebrale è stata osservata nel gruppo VCR e il trattamento con WMT in associazione con la riduce significativamente la formazione di queste placche nella corteccia cerebrale (Figura 18) (Khan et al, 2021).



**Figura 18:** Effetto del withamethelin sui cambiamenti istopatologici nel cervello (ippocampo e corteccia cerebrale) (H&E). Frammenti micrografici rappresentativi del giro dentato ippocampale. Normal (a), VCR (b), GBP (c) e WMT (d). Frammenti micrografici rappresentativi della corteccia cerebrale. Normale (e), VCR (f), GBP (g) e WMT (h). Freccia nera: placche infiammatorie nella corteccia (Khan et al, 2021).

Andando ad approfondire con le analisi, la spettroscopia FTIR è stata performata per caratterizzare il contenuto in termini di lipidi, proteine, acidi nucleici e zuccheri della guaina mielinica del nervo sciatico; lo spettro di assorbimento IR rappresentativo è stato ottenuto all'interno del range  $450-4000\text{ cm}^{-1}$ . I risultati indicano marcate variazioni nella composizione biochimica, tra cui danno ossidativo alle proteine, perossidazione lipidica, aumento nel contenuto di acidi nucleici e diminuzione nella composizione lipidica della guaina mielinica, in seguito a trattamento con vincristina; **withamethelin** però abbassa tutti queste variazioni indotte dalla vincristina nella composizione biochimica della guaina mielinica del nervo sciatico. La lunghezza d'onda della banda di assorbimento è stata spostata a un valore più elevato rispetto al gruppo VCR (figura 19); l'assegnazione dei picchi di assorbimento osservati nello spettro sono elencati nella tabella sottostante (Khan et al, 2021).



**Figura 19:** spettro FTIR rappresentativo del nervo sciatico nei gruppi normale, VCR e withamethelin (A). (B) Termogramma DSC conferma che il trattamento con withamethelin sopprime ogni alterazione nella struttura delle proteine indotta da vincristina (Khan et al, 2021).

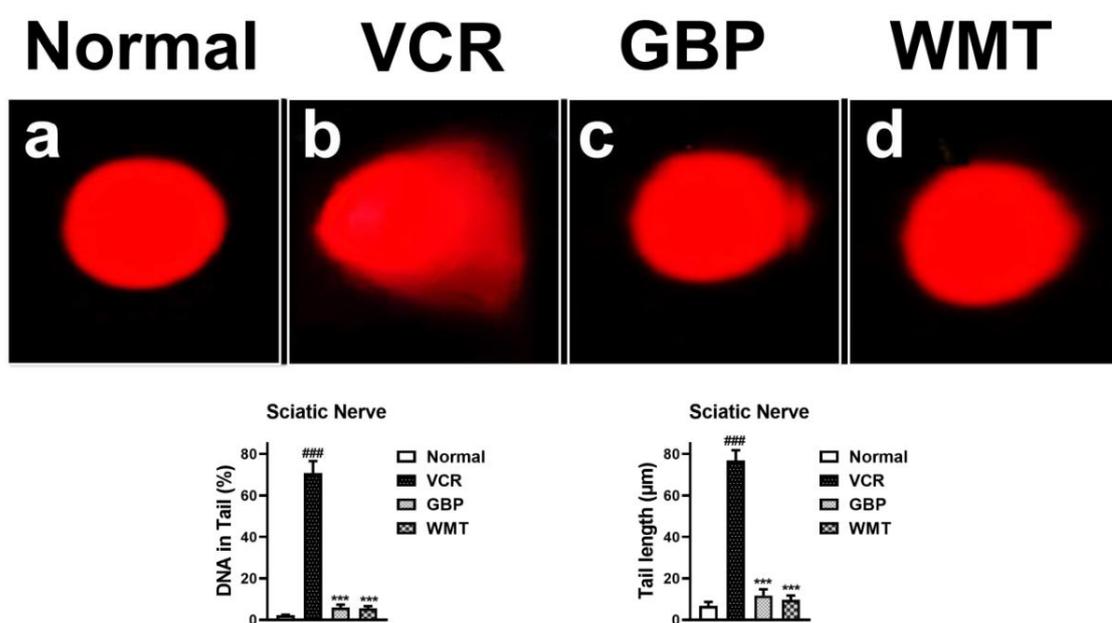
Wavenumber ( $\text{cm}^{-1}$ )	Spectral Assignment
3285	N-H str of amide A: Protein
2926	$\text{CH}_2$ asym str: Lipids (fatty acid)
2850	$\text{CH}_2$ sym str: Membrane lipids (membrane fatty acid)
1650	C=O sym str band of $\alpha$ -helical structure (amide I): Protein
1545	N-H bend, vib; C-N str of the amino acid (amide II): Protein
1460	$\text{CH}_2$ sciss, vib; $\text{CH}_2$ asym bend and vib of phospholipid: Membrane lipids
1300	C-N str, N-H bending; C=O str; O=C-N bend and vib (amide III): Protein
1062	Ester C-O-C sym str (phospholipids); ribose C-O str (Nucleic acids)

str, stretching; asym, asymmetric; sym, symmetric; bend, bending; vib, vibration; sciss, scissoring.

**Tabella 4:** Assegnazione delle bande di assorbimento con un range spettrale di 450-4000  $\text{cm}^{-1}$  (Khan A. et al, 2021).

La DSC, calorimetria a scansione differenziale, è un metodo altamente sensibile per registrare in maniera precisa le transizioni nella denaturazione termica di una proteina; è stata osservata una transizione nella denaturazione termica nel gruppo trattato con vincristina durante il primo ciclo di calore. I risultati indicano che è avvenuto un danno rilevante nelle proteine nel nervo sciatico del gruppo VCR, ma il trattamento con **withemethelin** ha inibito il danno alle proteine.

Analizziamo ora come il trattamento con WMT può contrastare l'effetto genotossico mediato dalla vincristina, con conseguente lesione al nervo sciatico. Per questa analisi è stato usato il “Comet Assay”, detto anche elettroforesi su gel a singola cellula, una tecnica che ha lo scopo di quantificare il danno al DNA e i possibili meccanismi di riparazione che avvengono nelle cellule eucariotiche e consiste nell'immissione di cellule in un mezzo con agarosio, poste in una piastra e in seguito immerse in una soluzione litica, successivamente alla lisi il DNA viene denaturato ed è libero di correre attraverso l'elettroforesi; l'immagine che ne risulta assomiglia ad una cometa con una testa e una coda caratteristiche; la testa della cometa è composta da DNA intatto, mentre la coda indica DNA danneggiato. Un significativo incremento nella lunghezza della coda e nella % di DNA in essa presente è stato rilevato nel gruppo trattato con vincristina, evidenziando in questo modo il danno al DNA nel nervo sciatico, ma il trattamento con WMT riduce l'azione genotossica, da come si può osservare dalla diminuzione della lunghezza della coda della cometa (Figura 20).

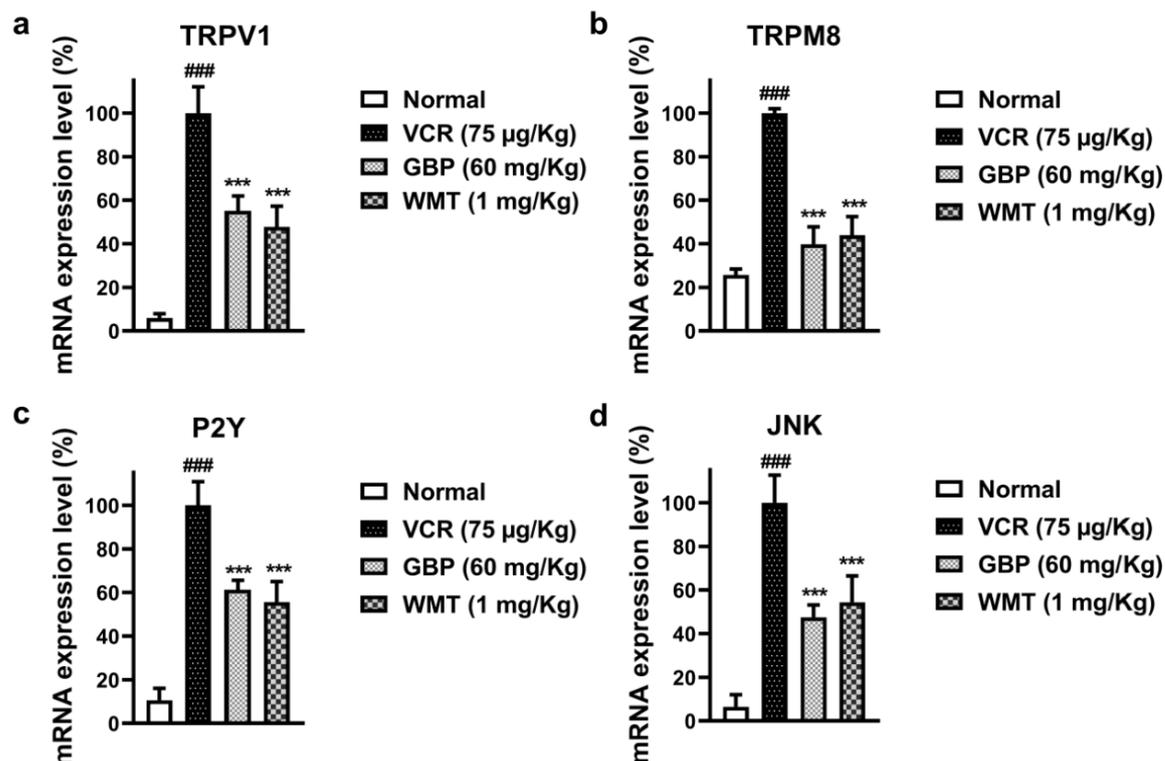


**Figura 20:** Effetto del withemethelin contro il danno al DNA indotto dalla vincristina nel nervo sciatico. Normale (a), VCR (b), GBP (c) e WMT (d). (Khan et al, 2021).

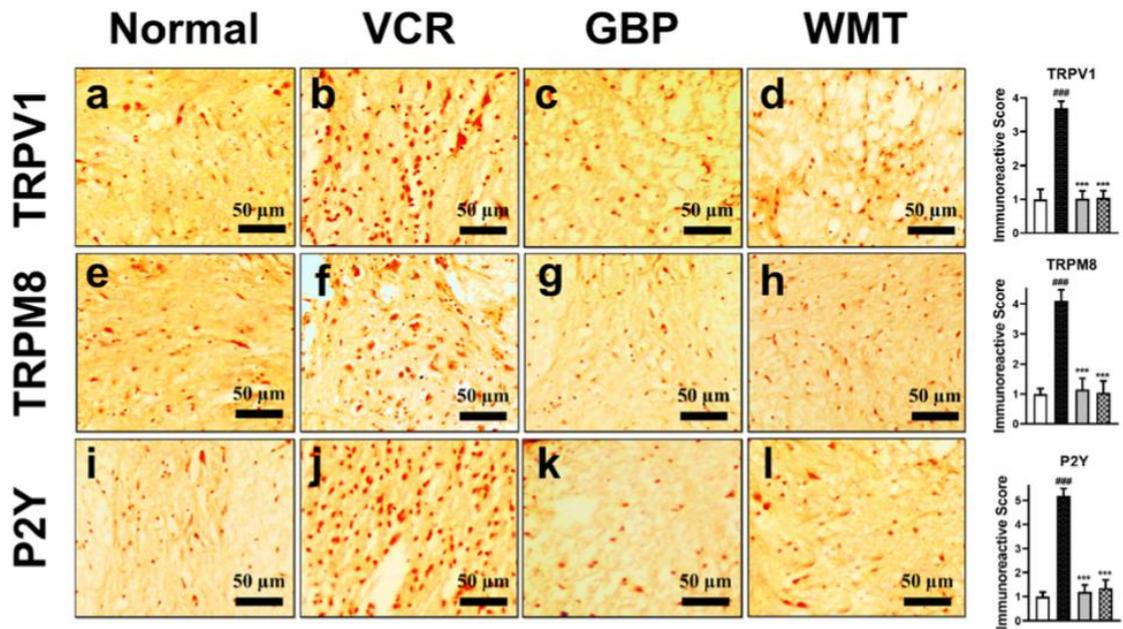
Anche in quest'analisi è stata utilizzata la gabapentina per comparare la sua azione rispetto al withamethelin e quest'ultimo manifesta un effetto più potente da come si può osservare nella figura (d), la coda della cometa è ridotta quasi del tutto (Khan et al, 2021).

Analisi dei livelli di espressione dei nocicettori TRPV1/TRPM8/P2Y e JNK nel midollo spinale dopo somministrazione di VCR: tutti questi giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo e mantenimento del dolore neuropatico; per indagare sul possibile ruolo di questi nocicettori è stata messa a punto un'analisi real time-PCR, dove viene mostrato che i livelli

di espressione dei nocicettori aumentano in maniera elevata nel cordone spinale dopo trattamento con VCR, tuttavia il trattamento con WMT riduce i livelli dei nocicettori (Figura 21).

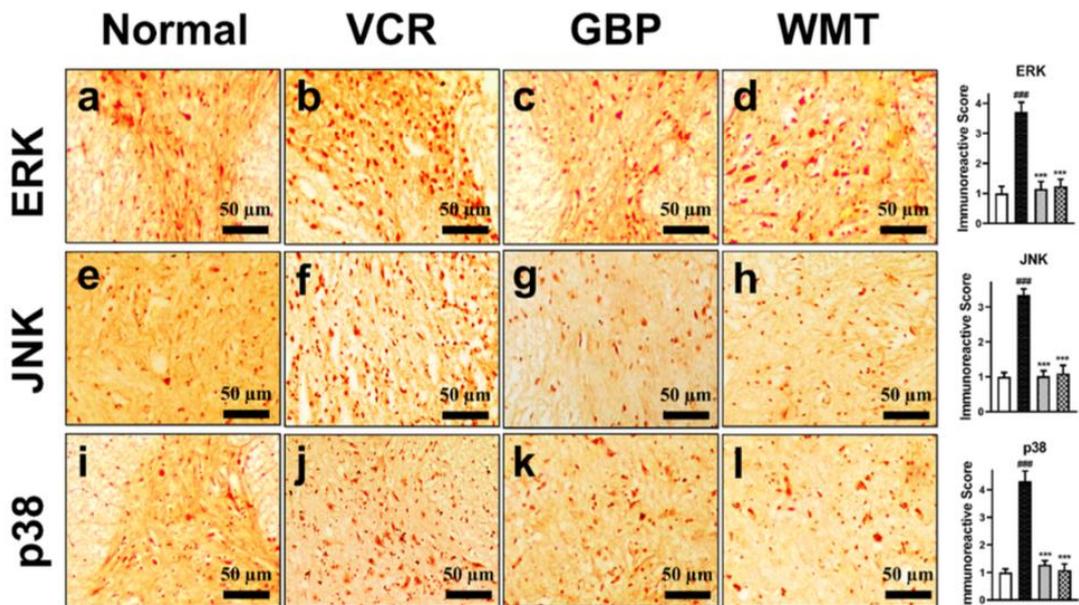


**Figura 21:** Effetto del withamethelin sui livelli di espressione delle proteine TRPV1, TRPM8, P2Y e JNK a seguito della somministrazione di vincristina. TRPV1 (a), TRPM8 (b), P2Y (c) e JNK (d) (Khan A. et al, 2021).



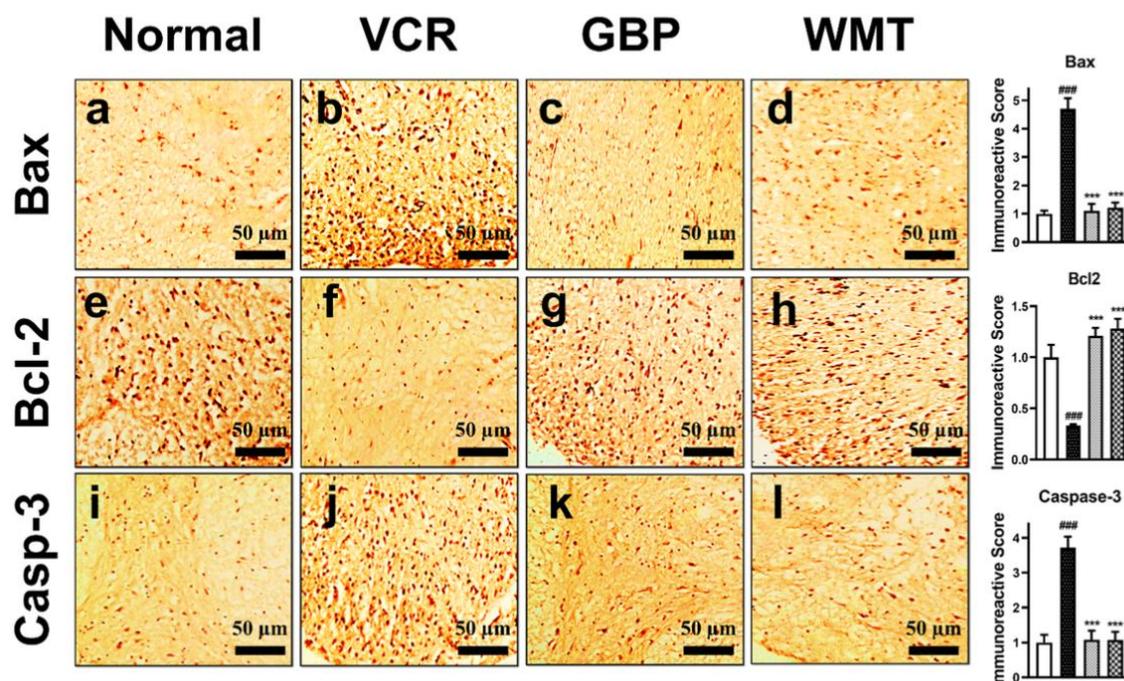
**Figura 21:** Effetto del withamethelin sui livelli di espressione delle proteine TRPV1/TRPM8/P2Y nel cordone spinale del topo. TRPV1 (a-d), TRPM8 (e-h) e P2Y (i-l) (Khan A. et al, 2021).

Anche in questo caso l'azione della gabapentina viene comparata a quella del withamethelin. Analisi dei livelli di espressione delle proteine ERK/JNK/p38 nel cordone spinale dopo terapia con vincristina: confrontando con il gruppo di controllo, l'iniezione di vincristina induce un aumento dell'immunoreattività contro ERK/JNK/p38 nel cordone spinale, mentre WMT esercita l'effetto contrario, come si può notare dalla figura 22 (Khan et al, 2021).



**Figura 22:** Effetto del withamethelin sui livelli di espressione delle proteine ERK/JNK/p38. ERK (a-d), JNK (e-h) e p38 (i-l) (Khan A. et al, 2021).

Analisi dell'azione di soppressione dell'apoptosi da parte di WMT: Per valutare il potenziale anti-apoptotico del **withamethelin**, sono stati misurati i livelli di espressione di Bax, Bcl-2 e caspasi-3 nel cordone spinale. I risultati mostrano che WMT diminuisce significativamente l'espressione delle proteine pro-apoptotiche ( Bax/caspasi-3), mentre aumenta l'espressione delle proteine anti-apoptotiche (Bcl-2) nel cordone spinale del topo (Figura 23) (Khan et al, 2021).



**Figura 23:** Effetto del withamethelin sui livelli di espressione di Bax, Bcl-2 e caspasi-3 nel cordone spinale del topo. Bax (a-d), Bcl-2 (e-h) e caspasi-3 (i-l) (Khan A. et al, 2021).

## CAPITOLO 10

### NEUROTOSSICITA' DA INIBITORI DEL PROTEASOMA

Gli inibitori del proteasoma Bortezomib, ixazomib e carfilzomib sono farmaci antitumorali approvati dall'FDA per il trattamento del mieloma multiplo (Herndon et al, 2013; Kane et al, 2003). La neuropatia periferica indotta da bortezomib (BIPN) consiste in una neuropatia sensitiva e motoria lunghezza-dipendente, distale e simmetrica che va a danneggiare gli assoni delle fibre nervose (Figura 24), determinando una perdita sensitiva da lieve a moderata, dolore neuropatico anch'esso da lieve a moderato e debolezza muscolare motoria a livello delle estremità distali degli arti inferiori (Argyriou et al, 2008).

Bortezomib dà inizio a fenomeni apoptotici attraverso il rilascio di  $Ca^{2+}$  nel reticolo endoplasmatico (Figura 24), con conseguente attivazione delle caspasi, proteasi essenziali per la morte cellulare programmata (Landowski et al, 2005), inoltre il trattamento con bortezomib aumenta notevolmente il numero di mitocondri che vanno incontro a rigonfiamento e vacuolazione, nelle fibre A e C rispetto a un gruppo di controllo, di conseguenza la respirazione mitocondriale e la produzione di ATP risultano ridotte, indicando un mancato accumulo di energia nella cellula come meccanismo di insorgenza della BIPN (Zheng et al, 2012). In uno studio recente il bortezomib ha mostrato un'azione neurotossica in cellule di neuroblastoma PC12 mediante l'induzione di apoptosi, ma l'utilizzo di antiossidanti, i quali miglioravano la sopravvivenza cellulare, ha dimostrato che anche lo stress ossidativo era coinvolto nella patogenesi della BIPN (Iijima et al, 2020).

Come per gli altri chemioterapici, la neuro-infiammazione occupa una posizione centrale nella neuropatia da chemioterapici l'inibizione del fattore NF- $\kappa$ B e del TNF<sub>alfa</sub> attenuava la gravità della BIPN nei modelli pre-clinici (Alé et al, 2016; Zhao et al, 2019), infatti si è visto che il trattamento con bortezomib aumentava l'espressione della *GATA-binding protein* (GATA3) (Figura 24), un fattore di trascrizione implicato nella regolazione della cascata infiammatoria e stimolava la produzione di CCL21, il ligando 21 del motivo C-C della chemichina chemoattrattrice verso i linfociti T, a livello dei neuroni del corno dorsale del midollo spinale, infatti se questo viene inibito abbiamo l'attenuazione dell'allodinia meccanica nei ratti Sprague Dawley (Zheng et al, 2019). I meccanismi fisiopatologici della BIPN sono riassunti in figura 24.

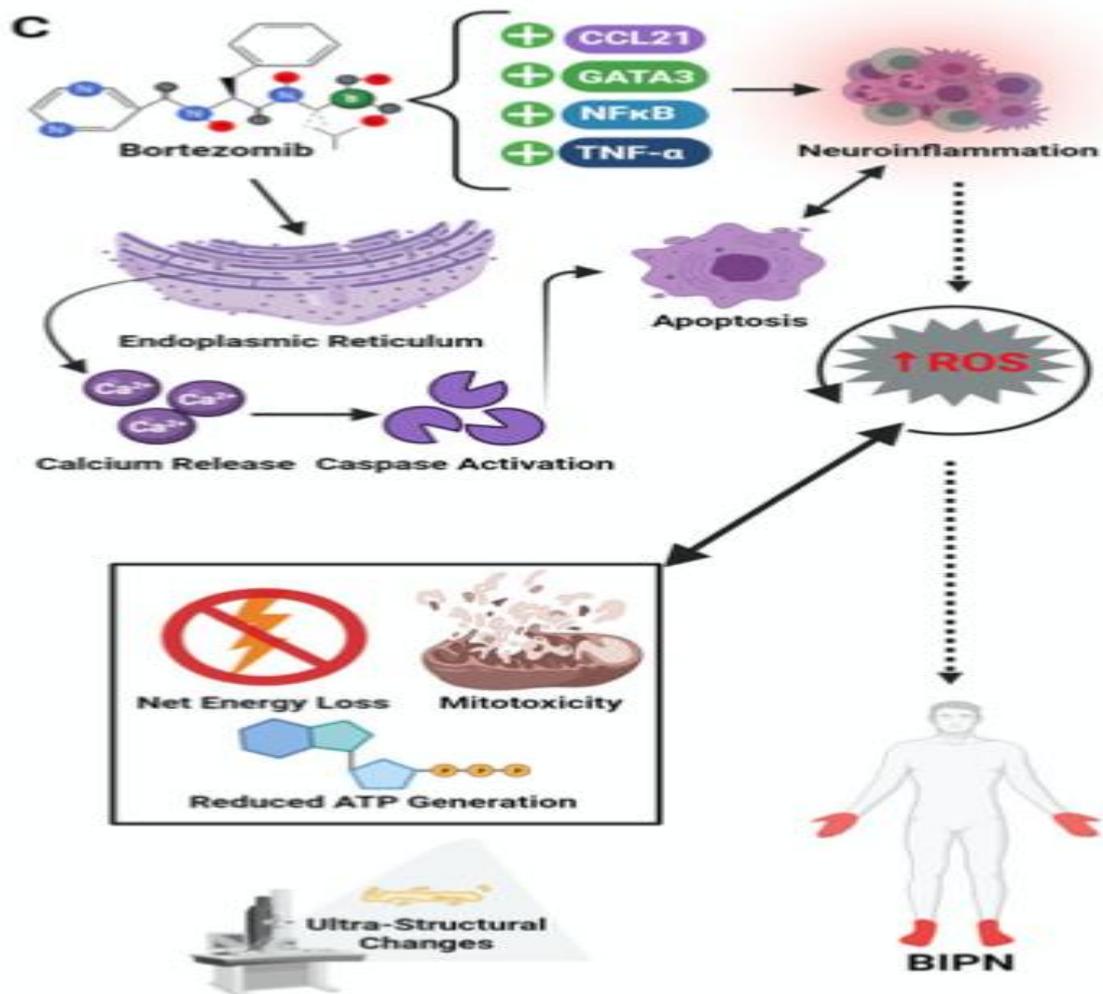


Figura 24: Meccanismi coinvolti nella patogenesi della neuropatia periferica indotta da bortezomib (Burgess et al, 2021)

Andando ad approfondire l'aspetto dell'infiammazione, i dati momentaneamente disponibili indicano che il bortezomib è coinvolto nello sviluppo di danni periferici mediati da processi immunitari (Ravaglia et al, 2008; Schmitt et al, 2011). Non è tanto l'alterazione dei livelli circolanti delle cellule immunitarie a determinare la neuroinfiammazione, ma piuttosto un'azione diretta del bortezomib sul sistema nervoso periferico (Fumagalli et al, 2021). Per quanto riguarda le citochine circolanti, il farmaco induce un incremento dei livelli plasmatici di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Singh, Spiegel, 2019). Come osservato in modelli animali, una delle iniziali risposte immunitarie è mediata da una sostenuta infiltrazione dei macrofagi che promuovono prima il danno e in seguito la progressione della neuropatia (Montague, Malcangio, 2017). In particolare, i monociti M1 nei nervi periferici esercitano un ruolo importante nella patogenesi della neuropatia (197, Meregalli et al, 2018). In corso di trattamento con bortezomib, su cellule gliali di ratto si è osservato oltre al danno

mitocondriale, anche in questo caso, come per gli altri farmaci, anche l'attivazione delle cellule gliali che determinano ipertrofia cellulare e lo sviluppo di vacuoli citoplasmatici (Cavalletti et al, 2007).

L'aumento di citochine, nello specifico dei livelli di TNF- $\alpha$ , dovuto al trattamento con bortezomib, causava un aumento dell'espressione delle **eparinasi** e delle **endoglicosidasi** implicate nella produzione di citochine infiammatorie, ma questo era secondario allo sviluppo della neuropatia (Zhao et al, 2019). In aggiunta, è stato scoperto che un'interazione tra i recettori a potenziale transiente dell'anchirina 1 (**TRPA1**), il TNF- $\alpha$  e il suo recettore TNFR1 era correlata con lo sviluppo di dolore neuropatico (Li et al, 2018). TRPA1 è un membro della sottofamiglia contraddistinta da sequenze anchiriniche e rappresenta una vasta famiglia di canali ionici spesso coinvolti nella modulazione delle vie sensoriali che comportandosi da chemosensore di stress ossidativo nei tessuti infiammati, riveste un ruolo fondamentale nella segnalazione del dolore poiché la sua stimolazione induce il rilascio di neuro peptidi infiammatori.

Allo stesso modo, l'inibizione della via di segnale **TNFR1-TRPA1** nel corno dorsale, ha mostrato una significativa riduzione dell'allodinia meccanica da freddo, che associata a una ridotta espressione dei due mediatori, ne conferma in questo modo il loro ruolo (Duan et al, 2020). In un altro studio, i livelli aumentati dell'IL-6 e di TRPA1 sono stati rilevati anche nei neuroni DRG dopo l'utilizzo del bortezomib, suggerendo che l'IL-6 potrebbe fungere da segnale nell'attivare TRPA1, con consecutivo potenziamento del danno neuropatico (Liu et al, 2019).

Come in tutti i processi infiammatori, un ruolo importante viene svolto non solo dalle citochine, ma anche delle chemochine che sono responsabili del reclutamento e dell'infiltrazione dei macrofagi. La sovraespressione della chemochina CCL2 nei neuroni del DRG nei ratti trattati con bortezomib, è stata associata con un'enorme infiltrazione di macrofagi (Liu et al, 2016).

Un'attenzione crescente è stata posta nuovamente nel ruolo del complesso macromolecolare **NLRP3**, come mediatore chiave dei meccanismi infiammatori responsabili del dolore neuropatico. Un incremento dell'espressione dell'inflammasoma NLRP3 nei neuroni DRG determina la comparsa di dolore neuropatico (Liu et al, 2010). Questo evento è stato correlato con la sovra-espressione della via del segnale **STAT3**, un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia STAT (proteine trasduttrici di segnale e attivatori trascrizionali) che hanno un ruolo importante nella regolazione del segnale e delle funzioni delle citochine, interferoni e fattori di crescita. A conferma di ciò, l'inibizione specifica di STAT3 risultò

nella soppressione dell'espressione di NLRP3 nel ganglio della radice dorsale, risolvendo l'allodinia meccanica indotta dal bortezomib (Liu et al, 2018).

Gli astrociti esercitano un ruolo preponderante negli effetti mediati dal bortezomib e rappresentano la popolazione più numerosa del sistema nervoso (Robinson et al, 2014). La loro attivazione a livello spinale si verifica in tempi diversi dopo la chemioterapia in parallelo con l'induzione della sensibilità meccanica. Uno studio immunocistochimico ha evidenziato l'attivazione degli astrociti nel corno dorsale del midollo spinale, dimostrando che solo un incremento degli astrociti **GFAP** positivi, proteina acida fibrillare gliale, era correlata all'induzione di allodinia nei modelli animali, determinando anche cambiamenti morfologici a livello spinale, come arborizzazione e ipertrofia degli astrociti, senza attivazione della microglia (Boyette-Davis, Dougherty, 2011; Yoon et al, 2013; Liu et al, 2010).

In ultima analisi, le ricerche hanno trovato una correlazione tra l'alterazione del metabolismo degli sfingolipidi e la neuroinfiammazione scatenata da bortezomib (Singh, Spiegel, 2020), esercitata da una sovra stimolazione della via della sfingosina-1-fosfato che culmina con ipersensibilità meccanica indotta da un incremento dei livelli di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a livello del corno dorsale spinale (Stockstill et al, 2018). La sfingosina-1-fosfato agisce tramite i recettori specifici e l'attivazione degli astrociti per mezzo di questa via è coinvolta nell'allodinia meccanica conseguente, regolata dall'attivazione dell'inflammasoma NLRP3 (Doyle et al, 2019).

### **10.1 Trattamento della neuropatia periferica indotta da inibitori del proteasoma (Bortezomib)**

Nella discussione precedente sui meccanismi di danno neurotossico indotti da bortezomib, è stato evidenziato come il chemioterapico, interferendo con la funzione mitocondriale, sia direttamente coinvolto nel promuovere lo stress ossidativo, ma soprattutto esercitando un ruolo importante nella neuro-infiammazione. L'azione dei chemioterapici si esplica tramite l'accumulo nel DRG e nei nervi periferici, determina un'infiltrazione costante di macrofagi e altre cellule immuni che promuovono la progressione della neuropatia. Recentemente è stata scoperta una nuova famiglia di chemochine, le *procinetine* (*Prokineticins*), molecole con funzione modulatoria nella risposta immunitaria (Franchi et al, 2008; Martucci et al, 2006). La famiglia delle procinetine include due proteine:

- 1) **La procinetina 1** presente nei mammiferi, nota come *Fattore di crescita Endoteliale Vascolare* derivato dalla ghiandola endocrina (**EG-VEGF**)

## 2) **PK2**, detta anche *Bv8*

Inoltre, sono presenti anche due recettori accoppiati alle proteine G, **PK-R1** e **PK-R2**, ampiamente distribuiti sia in regioni del sistema nervoso dove sono correlati alla trasmissione del dolore, e presenti anche nelle cellule immunitarie (Franchi et al, 2017).

E' stato dimostrato che le procinetine riescono ad indurre i macrofagi pro-infiammatori, stimolando la chemiotassi con conseguente rilascio di citochine (Martucci et al, 2006). I neuroni sensitivi primari co-esprimono il recettore per le procinetine (PKR) e TRPV1, e cooperano nella nocicezione (Franchi et al, 2017). In aggiunta, l'attivazione del sistema PK nei nervi periferici, nel DRG e nel midollo spinale è correlata con la presenza di neuro-infiammazione e lo sviluppo di dolore neuropatico indotto nel modello murino (Maftei et al, 2014; Guida et al, 2015; Lattanzi et al, 2015). In questi studi sperimentali, il trattamento con antagonisti del sistema PK si è dimostrato abile nel contrastare o prevenire la sintomatologia neuropatica, rappresentando così un bersaglio strategico per contrastare la BIPN.

In modelli sperimentali murini, il bortezomib è stato somministrato tre volte a settimana per un totale di 4 settimane consecutive. Dopo aver verificato la presenza di ipersensibilità termica e meccanica nei murini, l'antagonista dei recettori PKR, PC1 è stato somministrato a livello subcutaneo. PC1 è un derivato triazino-guanidinico che *in vitro* blocca l'incremento intracellulare di  $Ca^{2+}$  PK2-indotto, in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary), sulle quali è stata eseguita una trasfezione del recettore PKR2, mentre *in vivo* induce un'azione antagonizzante nei confronti di PK2, riducendo in questo modo l'iperalgia (Balboni et al, 2008).

Come mostrato in figura 25, bortezomib induce nel murino un'ipersensibilità dose-dipendente termica e meccanica evidenziata dalla presenza di **allodinia** (a,b) e **iperalgia** (c). 14 giorni dopo la prima somministrazione di bortezomib, la soglia di attivazione termica e meccanica, se comparata a quelle del gruppo di controllo, non solo era più bassa, ma evidenziava anche alla fine del trattamento (28esimo giorno) un'ulteriore diminuzione. Per quanto riguarda il trattamento con l'antagonista PC1, effettuato con le stesse modalità come precedentemente descritto, anche in questo caso, dopo il giorno 14 di somministrazione nei murini, si evidenziava la presenza di allodinia e iperalgia. PC1 è stato iniettato due volte al giorno dal giorno 14 fino al 28, simultaneamente al trattamento con bortezomib; dopo 7 giorni di trattamento cronico (giorno 21), l'antagonista contrastava efficacemente entrambe l'allodinia meccanica (a), termica (b) e l'iperalgia termica (c). Questo effetto si è mantenuto per l'intera durata del trattamento. Inoltre è stato valutato l'effetto di una singola iniezione di PC1 sull'allodinia meccanica al termine del protocollo di trattamento con

bortezomib, quando l'ipersensibilità era massima (d). PC1 contrastava rapidamente l'allodinia meccanica e questo effetto era massimo tra i 60 e i 120 minuti, diminuendo progressivamente, sebbene fosse presente lo stesso una diminuzione della soglia di attivazione del dolore a partire dai 240 minuti.

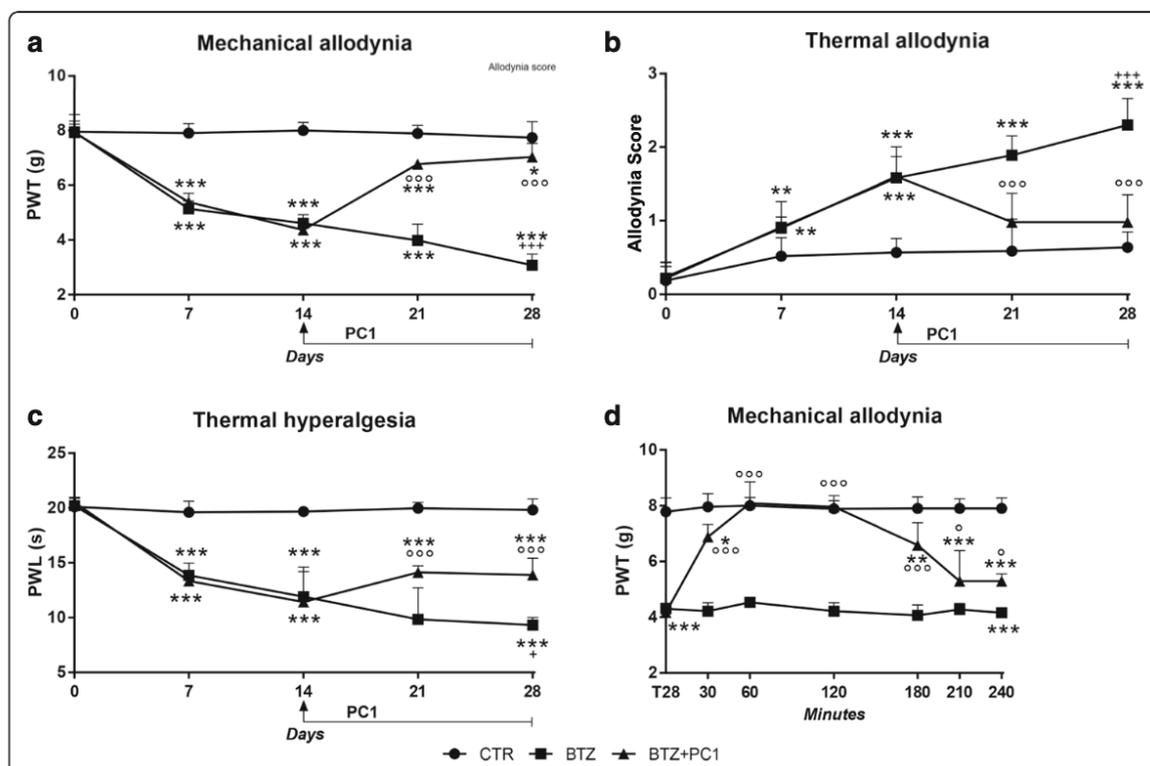


Figura 25: Effetti anti-allodinico e anti-iperalgico dell'antagonista PC1 dei recettori PKR. (Moschetti et al,2019).

In seguito (Figura 26), l'attivazione del sistema PK (PK2 e i suoi recettori) e la presenza di neuro-infiammazione sono state valutate nelle principali "stazioni" della trasmissione del dolore (nervo sciatico, DRG e midollo spinale), 14 giorni dopo la prima iniezione di bortezomib e alla fine del protocollo di trattamento. I livelli di PK2 sono stati valutati tramite colorazione con immunofluorescenza. Come riportato in figura, dopo 14 giorni di trattamento con bortezomib non è stato osservato alcun cambiamento di PK2, come dimostrato dalla quantificazione della percentuale di area positiva al PK2 (b). Alla fine del protocollo chemioterapico (giorno 28), i livelli di PK2 erano incrementati, come mostrato dalle immagini rappresentative dell'immunofluorescenza (a) e dalla quantificazione dell'area PK2-positiva. Successivamente il trattamento con PC1 ha mostrato una riduzione significativa del segnale di PK2 (b, giorno 28).

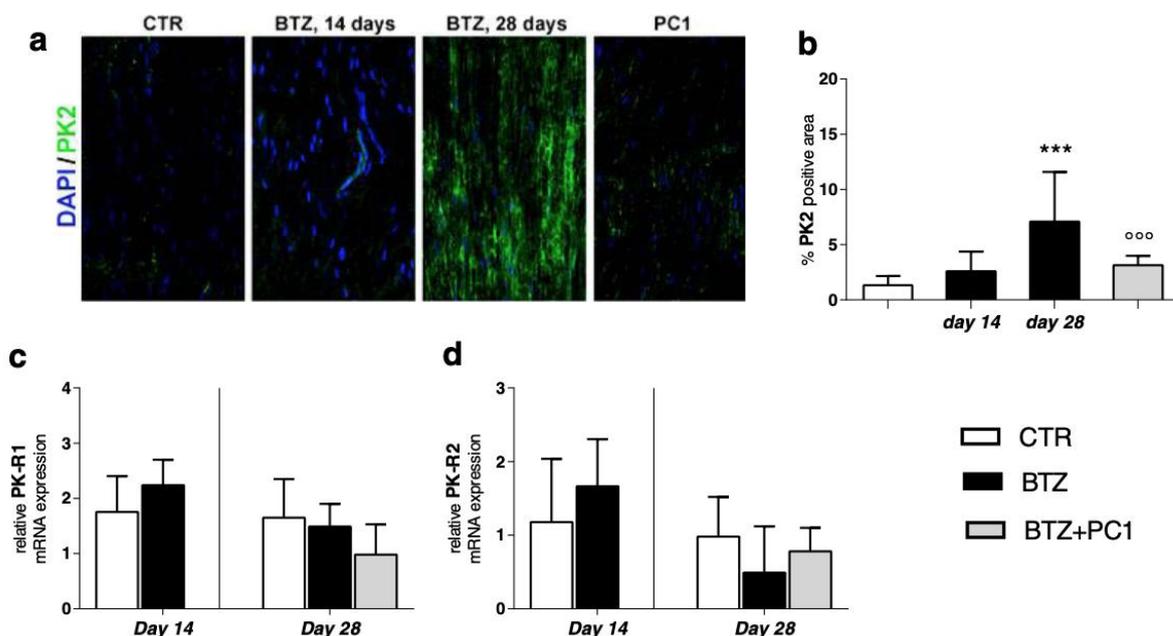


Figura 26: Attivazione del sistema PK nel nervo sciatico. (a), Immagini rappresentative dell'immunofluorescenza di PK2 nel nervo sciatico. (b), percentuale dell'area PK-positiva. (c,d), livelli di mRNA di PK1 e PK2 rispettivamente. (Moschetti et al, 2019).

Per quanto riguarda l'effetto dell'antagonismo al recettore PKR sulla neuro-infiammazione nel nervo sciatico, come illustrato in figura 27, al giorno 14 prima di iniziare il trattamento con PC1, è stato rilevato un incremento sia dell'mRNA che delle proteine caratteristiche dei linfociti CD68, come riportato nelle immagini di immunofluorescenza (c) e nella quantificazione dell'area percentuale CD68-positiva (b). Allo stesso tempo (giorno 14), è stato osservato un incremento dei livelli di mRNA del TLR4 (e) e delle citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$  (g) e IL-6 (h), senza cambiamenti nei livelli di TNF $\alpha$  (f) e nei livelli dell'IL-10 antinfiammatoria (i). Aumentando la dose cumulativa del bortezomib al giorno 28, i livelli di CD68 (a,b,c) e di TLR4 (e) rimanevano sovra-espressi. Per di più, allo stesso tempo, è stato osservato un incremento nei livelli di tutte le citochine pro-infiammatorie e una riduzione dell'espressione di IL-10; le immagini di immuno-fluorescenza a doppia colorazione (d) illustrano che l'immunoreattività di PK2 si localizza parzialmente insieme al segnale di CD68 (d). Il trattamento con PC1 è in grado di contrastare il reclutamento dei macrofagi e la loro attivazione, come dimostrato dai ridotti livelli dei CD68 (a,b,c al giorno 28) e dai livelli di TLR4 (e, giorno 28), per prevenire l'aumento di TNF $\alpha$  (f) e il decremento di IL-10 (i) e per ridurre i livelli di IL-6 e IL-1 $\beta$  (g, h, giorno 28).

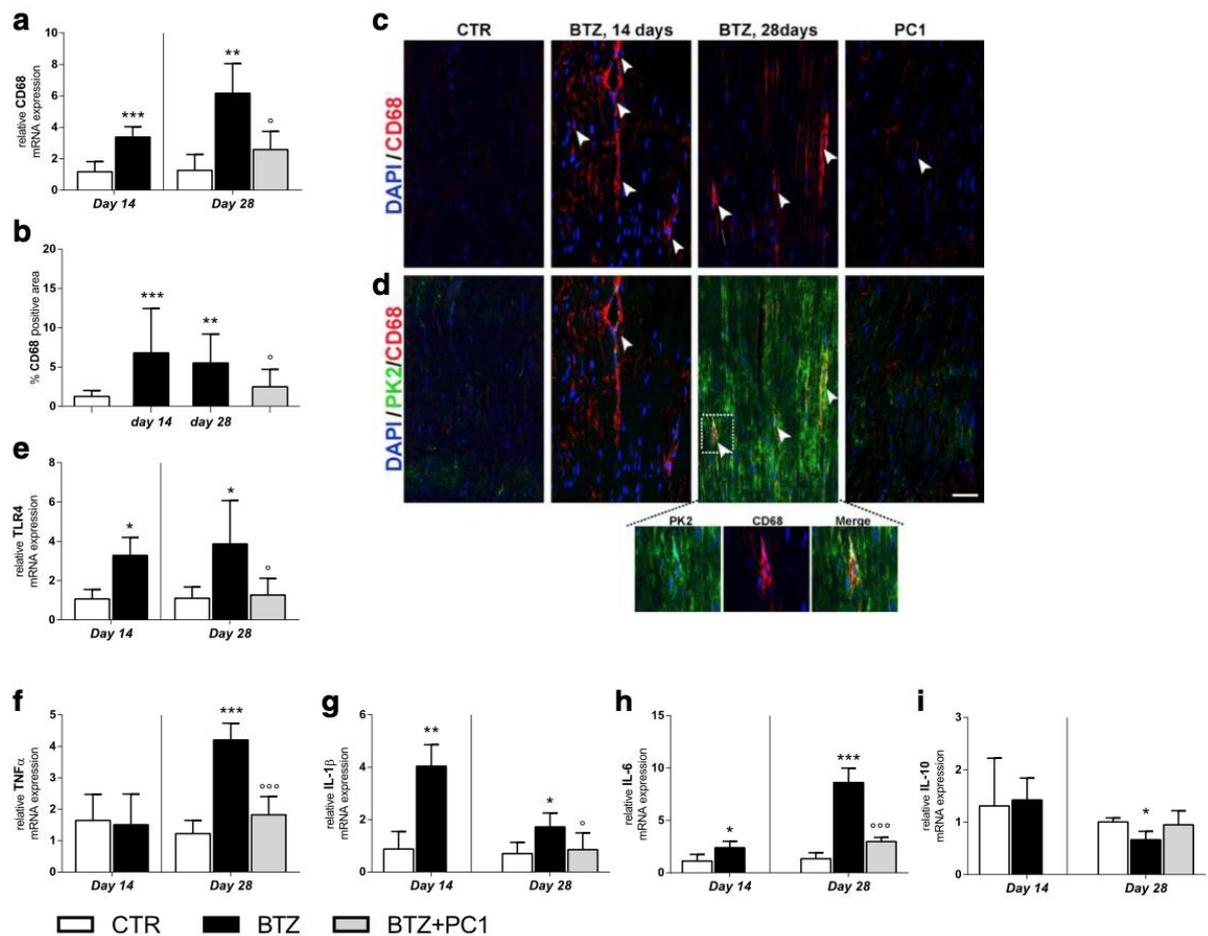


Figura 27: Effetto del trattamento con PC1 sull'attivazione dei macrofagi e i livelli di citochine nel nervo sciatico dei CD68 nelle sezioni del nervo sciatico (Moschetti et al, 2019).

L'espressione del sistema PK nel DRG come illustrato in figura 28, al giorno 14, non si osserva alcun cambiamento significativo, l'immuno-reattività di PK2 è riportata in (a) e quantificata in (b), mentre per PKR1 e PKR2 sono riportati i livelli di mRNA in (c) e (d) rispettivamente. Tuttavia, alla dose cumulativa più elevata di bortezomib, è stato rilevato un incremento consistente del segnale dato da PK2, come si può vedere dalle immagini dell'immunofluorescenza (a) e dall'incremento della percentuale dell'area PK2-positiva (b) e dalla sovra-espressione dei livelli di mRNA di entrambi i recettori PKR1 e PKR2 rispettivamente (c,d). In questo caso, il trattamento con PC1 è in grado di contrastare l'aumento di entrambi i livelli di PK2 (a,b, giorno 28) e PKR1 (c, giorno 28).

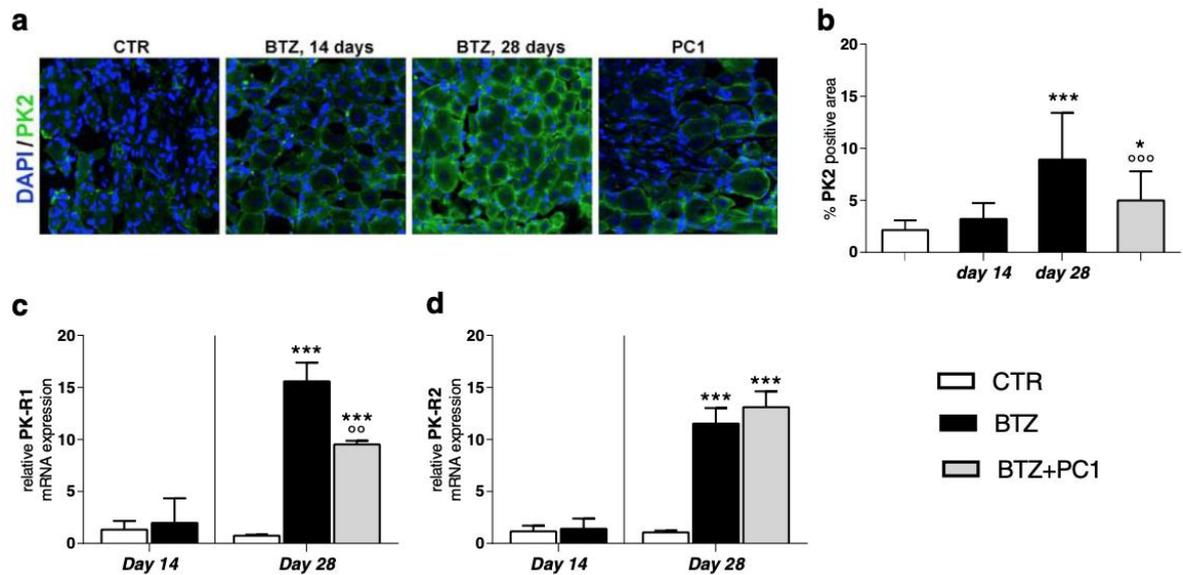


Figura 28: Attivazione del sistema PK nel DRG (Moschetti et al, 2019).

Bortezomib promuove un rapido incremento del reclutamento e attivazione dei macrofagi anche nel DRG; come mostrato in figura 29, si è osservato un aumento dei livelli dell'mRNA dei CD68 nei neuroni del DRG (a) e delle proteine tipiche dei CD68, come riportato dalle immagini di immunofluorescenza (c) e nella quantificazione della percentuale dell'area CD68-positiva (b). Allo stesso tempo si osserva un incremento dell'mRNA relativo ai TLR4 (e), delle citochine pro-infiammatorie, conseguente all'aumento dell'mRNA di TNF<sub>alfa</sub> (f) e IL-6 (h) e una diminuzione di IL-10 antinfiammatoria (i). Questo profilo era evidente al ventottesimo giorno quando anche l'IL-1 $\beta$  (g) è sovra-espressa, mentre non sono state notate variazioni significative per l'IL-10 (i). Le immagini di immunofluorescenza a doppia colorazione illustrano che il segnale relativo ai CD68 si co-localizza in parte al segnale PK2 (d). Il trattamento con PC1 era in grado di normalizzare i livelli dei CD68 (a,b,c, giorno 28), di TLR4 (e, giorno 28) e di tutte le citochine infiammatorie analizzate.

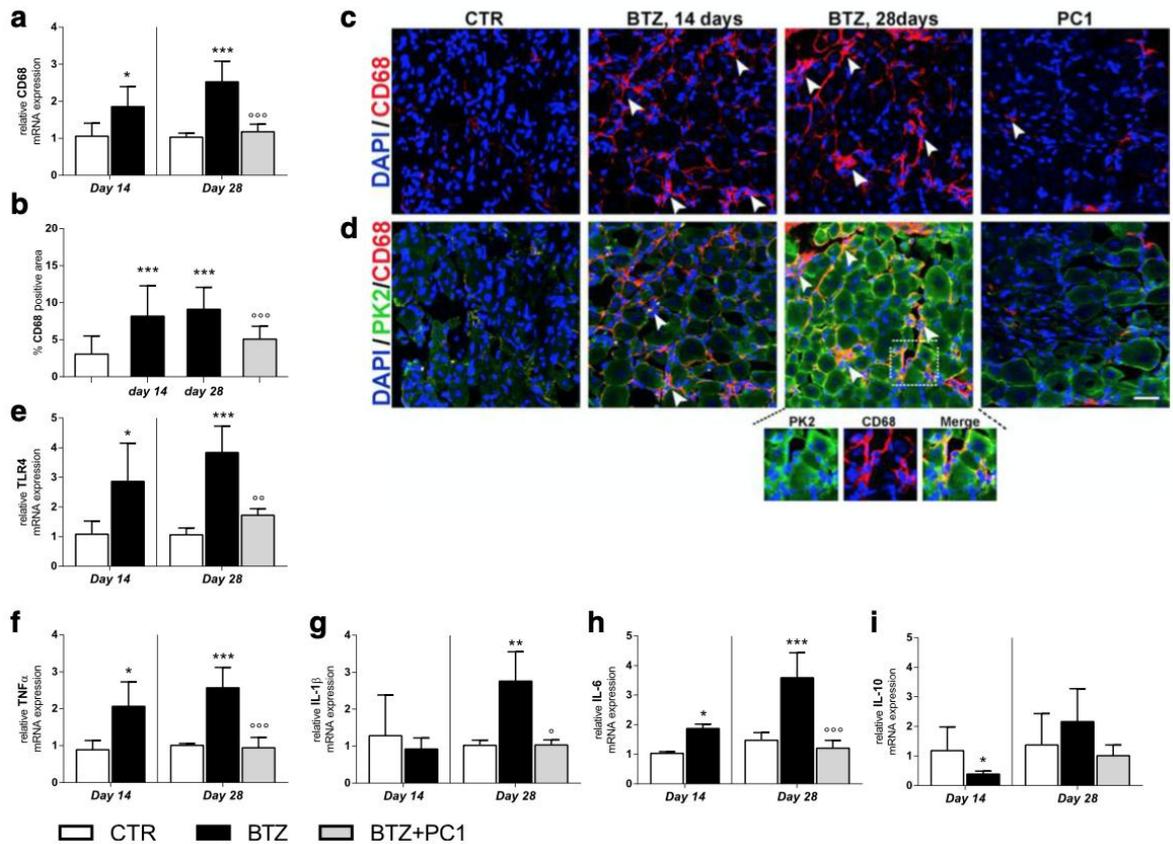


Figura 29: Effetto del trattamento cronico con PC1 sull'attivazione dei macrofagi e sui livelli di citochine nel DRG (Moschetti et al, 2019).

Come descritto prima per il sistema nervoso periferico, anche nel midollo spinale, sia i livelli di PK2 (figura 30 a,b) che dei relativi recettori (c,d), dopo 14 giorni di trattamento con bortezomib, sembrano comparabili a quelli del gruppo di controllo. Alla fine del protocollo chemioterapico (giorno 28), il bortezomib incrementa il segnale di PK2 nel corno dorsale del midollo spinale, come mostrato nelle immagini di immunofluorescenza (a) e dalla quantificazione della percentuale dell'area PK2-positiva (b). Un incremento dei recettori PKR1 e PKR2 (c,d) era presente allo stesso tempo; il trattamento terapeutico con PC1 si è dimostrato abile nel contrastare l'aumento del sistema PK nel cordone spinale (a,b,c,d, giorno 28).

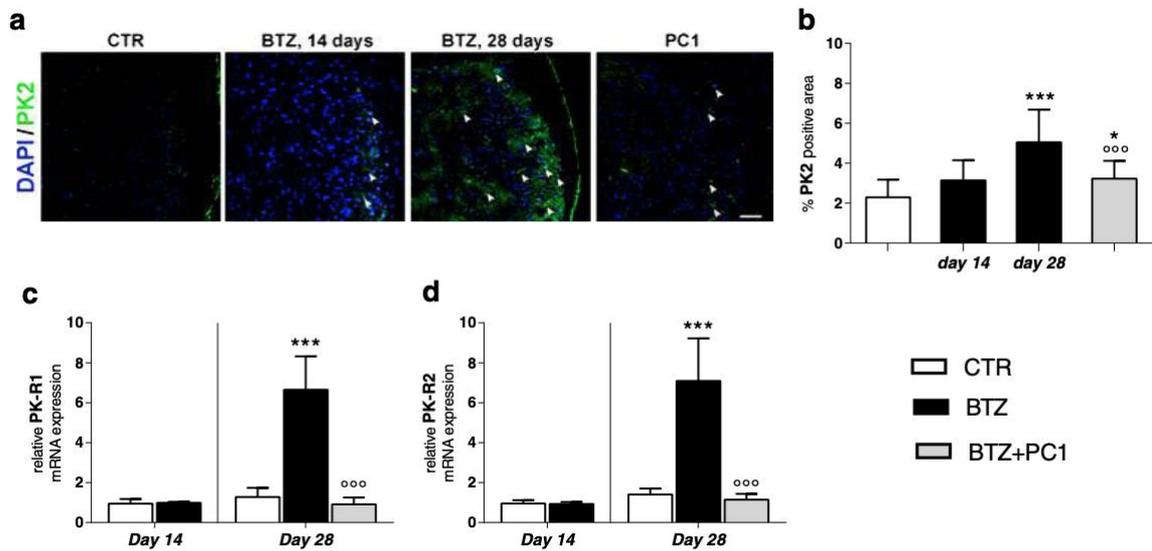


Figura 30: Attivazione del sistema PK nel midollo spinale (Moschetti et al, 2019).

Effetto dell'antagonismo al PK sulla neuro-infiammazione nel midollo spinale; Come illustrato in figura 31, il midollo spinale era colpito marginalmente dalla bassa dose cumulativa di bortezomib, infatti al giorno 14 abbiamo osservato l'incremento solamente del segnale di immunofluorescenza relativo alla proteina acida fibrillare gliale (GFAP): (c) riporta una immagine rappresentativa mentre la quantificazione della percentuale dell'area GFAP-positiva è riportata in (b); aumentando la dose cumulativa di bortezomib, al giorno 28, si è potuto osservare una sovra-espressione di CD68 (a) e dei livelli di mRNA relativi ai CD68 (d). Queste alterazioni avvenivano insieme all'aumento dei livelli di IL-1 $\beta$  (f) e alla diminuzione dell'IL-10 antinfiammatoria (h). Non sono state rilevate alterazioni negli mRNA relativi a TNF $_{\alpha}$  (e) e IL-6 (g). PC1 era in grado di contrastare l'attivazione immunitaria gliale nel midollo spinale lombare mantenendo bassi livelli di CD68 e TLR4 (a,d, giorno 28), preservando un corretto bilancio di citochine pro e antinfiammatorie (f,h,giorno 28) e invertendo l'aumento di GFAP (b,c).

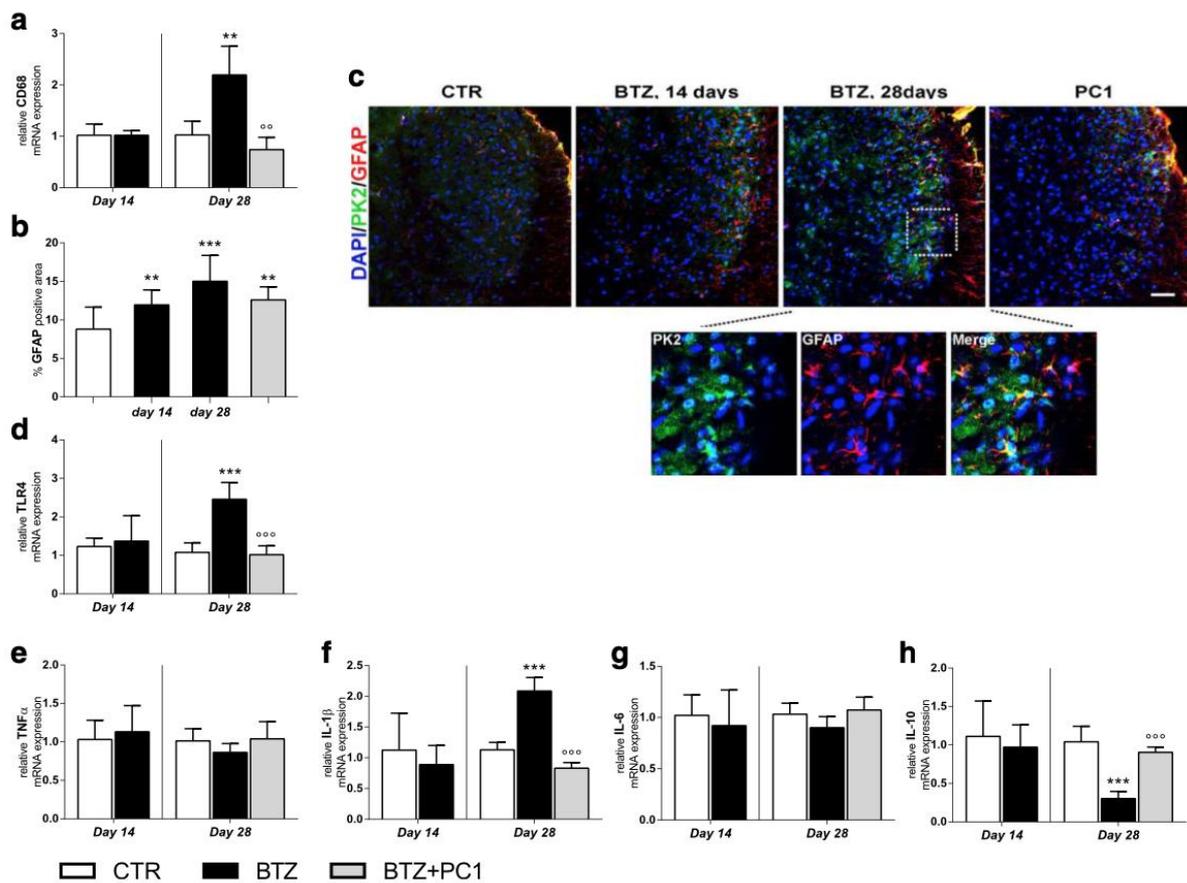


Figura 31: Effetto del trattamento cronico con PC1 nell'attivazione neuro-immunitaria nel midollo spinale lombare (Moschetti et al, 2019).

Esaminiamo ora gli studi morfologici mediante l'utilizzo della microscopia elettronica: l'esaminazione ultrastrutturale del DRG è stata effettuata per valutare il ruolo protettivo dell'antagonismo al sistema PK nel contrastare il progressivo danno neuronale successivo alla somministrazione di una dose cumulativa di bortezomib. Considerando il DRG, in condizioni fisiologiche ogni corpo cellulare neuronale è solitamente sviluppato dalle cellule gliali satelliti; come illustrato dalle immagini di microscopia elettronica, l'esame ultrastrutturale del ganglio di controllo (Figura 32a) ha confermato l'organizzazione descritta in precedenza e in tutte le cellule del DRG non c'è evidenza di alterazioni morfologiche. Gli animali soggetti alla somministrazione di bortezomib, già al quattordicesimo giorno mostravano alcune alterazioni ultrastrutturali, nello specifico, alcune cellule gliali satelliti erano parzialmente distaccate dai loro corpi cellulari neuronali. Per di più, un numero elevato di neuroni e cellule gliali presentavano i mitocondri rigonfiati insieme a quelli normali sotto il profilo morfologico (b). Aumentando la dose cumulativa, 28 giorni dopo la prima somministrazione di bortezomib, l'analisi ultrastrutturale del DRG (c) ha evidenziato che in alcuni casi, le cellule gliali satelliti erano distaccate dai corpi cellulari

dei neuroni ed entrambi i due tipi cellulari hanno mostrato la formazione di una vacuolizzazione localizzata all'interno del citoplasma; alcuni di questi vacuoli erano causata dal rigonfiamento mitocondriale. Dopo la somministrazione di PC1, la maggior parte dei neuroni e delle cellule gliali satelliti apparivano ben preservate, anche se è rimasta l'evidenza che alcuni corpi cellulari e cellule satelliti presentavano ancora dei vacuoli nel citoplasma (d).

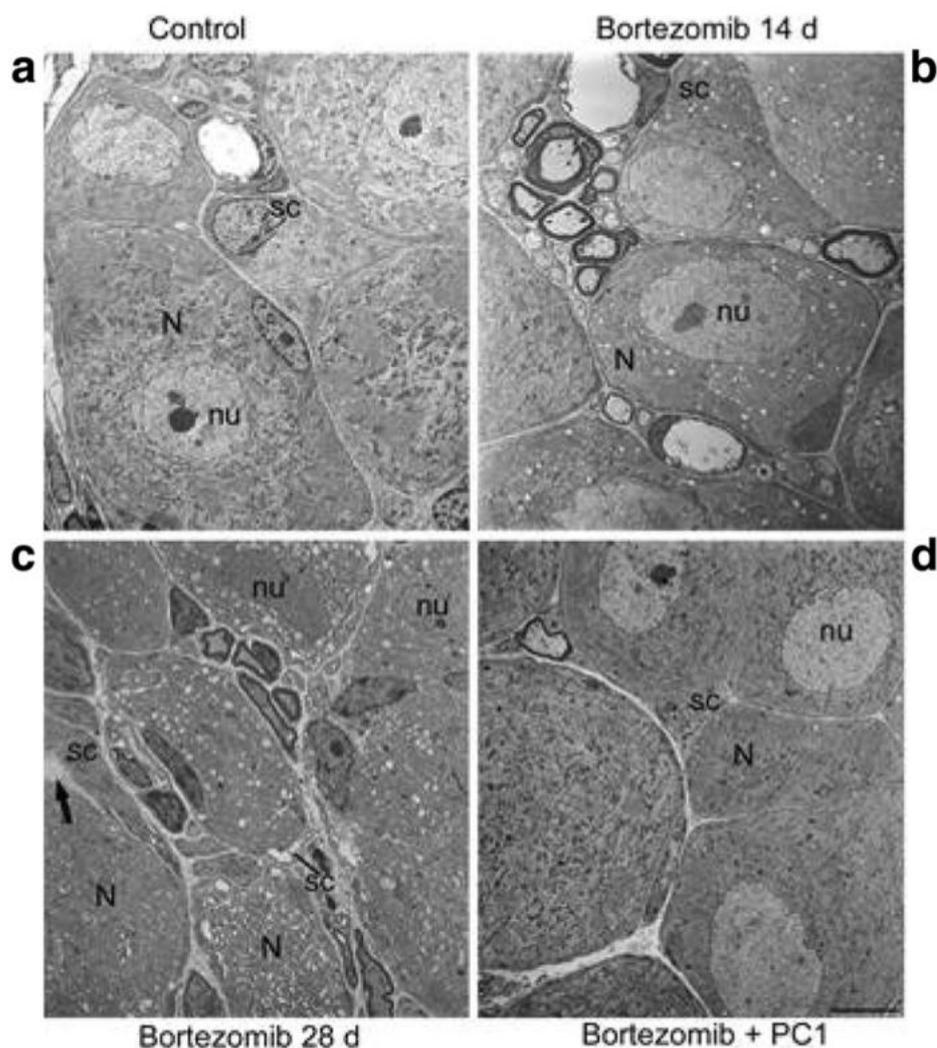


Figura 32: Esaminazione morfologica del DRG (Moschetti et al, 2019).

Misurazione della concentrazione sierica: La figura 33 mostra i livelli di PK2 misurati nel siero al giorno 14 (prima di iniziare il trattamento con PC1) e alla fine del ciclo chemioterapico/PC1 (giorno 28). Nei modelli murini trattati con bortezomib, è osservabile un incremento dei livelli sierici di PK2 già 14 giorni dopo la prima iniezione e i livelli di PK2 rimanevano alti fino al ventottesimo giorno; il trattamento con PC1 si è dimostrato in grado di normalizzare completamente le concentrazioni sieriche di PK2 (giorno 28).

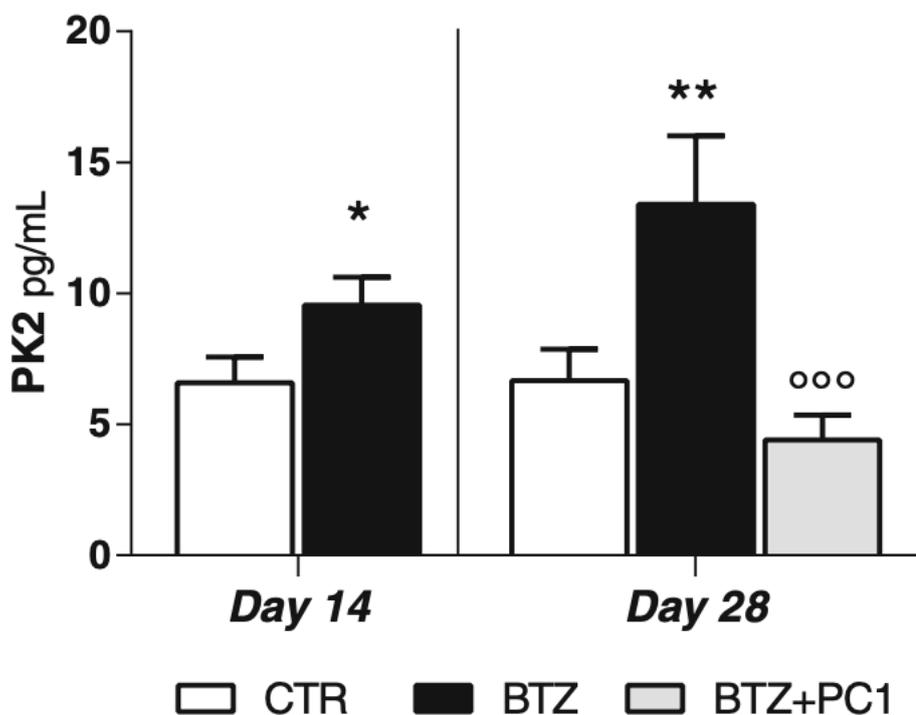


Figura 33: Livelli sierici di PK2 (Moschetti et al, 2019).

Analizziamo infine l'effetto dell'antagonismo PK sull'ipersensibilità durante cicli ripetuti di bortezomib: come mostrato in figura 34, dopo la sospensione del primo ciclo di trattamento con bortezomib, i modelli murini sono stati monitorati nel tempo fino al loro completo ritorno ai livelli basali di soglia di attivazione meccanica. Al giorno 84, gli animali hanno iniziato un nuovo trattamento con bortezomib con un protocollo identico a quello del primo ciclo e, come illustrato nella figura, il secondo ciclo di bortezomib induceva un effetto allodinico simile a quello osservato nel primo ciclo. Tuttavia, nei modelli murini trattati preventivamente con PC1 (primo ciclo), l'effetto allodinico indotto da bortezomib era meno intenso in confronto a quello osservato nei murini ritrattati solo con bortezomib (giorno 7 e 14). In aggiunta un secondo trattamento cronico con PC1, della durata di 14 giorni, si è dimostrato essere in grado di contrastare completamente l'allodinia (giorno 28).

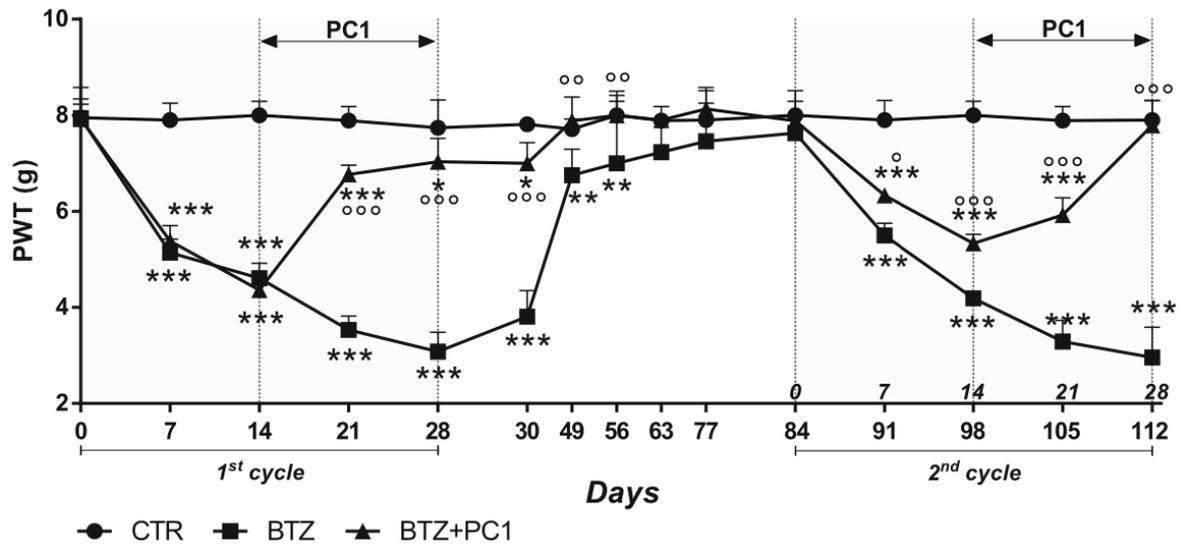


Figura 34: Effetto dell'antagonismo PK sull'allodinia meccanica durante cicli ripetuti di bortezomib (Moschetti et al, 2019).

## CAPITOLO 11

### NEUROPATIA PERIFERICA: EFFETTI DELL'IMMUNOTERAPIA ANTICANCRO

Oltre ai farmaci chemioterapici classici convenzionali, l'immunoterapia è emersa come approccio terapeutico significativo nelle aree dell'oncologia clinica ed ematologica. Per esempio, l'approvazione di ipilimumab, un anticorpo monoclonale che ha come bersaglio il recettore delle cellule immunitarie CTLA-4, ha dato il via allo sviluppo delle immunoterapie contro il cancro. Tuttavia anche questi farmaci immuno terapeutici alla stessa maniera delle terapie convenzionali, hanno mostrato complicazioni neurologiche (Roth et al, 2021). Essi infatti possono determinare deficit neurologici principalmente tramite alterazioni dell'integrità del sistema nervoso periferico, tra cui neuropatie, miopatie e sindrome miastenica, mentre gli effetti nei confronti del sistema nervoso centrale risultano meno frequenti ma possono determinare anch'essi gravi sintomi clinici e sindromi. Per tali ragioni, un preciso monitoraggio clinico dei sintomi neurologici è essenziale per un rapido riconoscimento degli effetti collaterali dell'immunoterapia (Roth et al, 2021).

Questi farmaci, definiti **ICI** (Immune checkpoint inhibitors) sono in grado di reclutare e attivare i linfociti T citotossici contro le cellule tumorali, agiscono interferendo con i segnali inibitori responsabili della riduzione dell'attività delle cellule T; questo può essere ottenuto bloccando il recettore di membrana presente nelle cellule T (TCR) oppure tramite il riconoscimento con il ligando specifico, presente nelle cellule presentanti l'antigene o nelle cellule tumorali (Roth et al, 2021). Attualmente, l'area terapeutica di maggior studio è quella dei farmaci che hanno come target la via PD-1 (Programmed cell death-1), ovvero tramite azione specifica sul recettore PD-1 o sul suo ligando PD-L1 che può essere espresso sia dalle cellule presentanti l'antigene che dalle cellule tumorali.

Durante lo sviluppo clinico, sono stati attribuiti vari effetti avversi a questi anticorpi e sono ritenuti ascrivibili alla sovra-attivazione delle cellule T. Tuttavia però il meccanismo fisiopatologico esatto rimane ancora non del tutto compreso (Burk et al, 2021). Per di più, non rimane chiaro se sono presenti differenze nella risposta immunitaria nei diversi organi, in termini di durata, insorgenza e intensità; questi effetti collaterali, definiti di frequente come eventi avversi immuno-correlati, consistono in una reazione infiammatoria promossa da diversi fattori (Harrison et al, 2020), tra questi abbiamo soprattutto un'iperattivazione delle cellule T contro antigeni che sono espressi anche nei tessuti sani (Khan et al, 2019). Inoltre, può verificarsi anche un incremento del titolo di autoanticorpi preesistenti capaci di

riconoscere antigeni espressi nei tessuti normali (Graus, Dalmau, 2019). Inoltre il conseguente incremento di citochine pro-infiammatorie e l'attivazione del sistema del complemento contribuiscono all'insorgenza di immunotossicità e possono fungere anche come biomarcatori (Lim et al, 2019; Postow et al, 2018).

Tra gli organi più frequentemente colpiti da questi eventi avversi immuno-correlati, abbiamo la cute, il fegato, il colon, diversi organi endocrini come ipofisi e tiroide, ma anche polmoni, reni, muscoli e articolazioni; Le reazioni avverse sembrano essere più significative con l'utilizzo di agenti che hanno come target CTLA-4 (Antigene-4 dei linfociti T-citotossici), interferendo con l'asse PD-1/PD-L1 (Patrick Roth et al, 2021).

l'incidenza di complicazioni neurologiche associate all'uso di anticorpi monoclonali rispetto agli eventi avversi che includono ad esempio la cute o il tratto gastrointestinale è bassa, si ritrova nel range del 4-6% in caso di monoterapia con anticorpi anti-CTLA4 e anti-PD1 e intorno al 12% per le terapie combinate (Cuzzubbo et al, 2017), anche se alcune analisi suggeriscono che gli eventi avversi neurologici sono molto più frequenti in pazienti colpiti da melanoma rispetto ad altri tumori e il loro sviluppo in genere è più frequente nei primi 3-4 mesi dopo l'inizio della terapia (Roth et al, 2021). A differenza di altri effetti noti, alcune complicazioni neurologiche non vengono facilmente diagnosticate perché necessitano dell'esclusione di altre possibili cause che richiedono una gestione terapeutica differente, nello specifico, a seconda della situazione clinica del paziente, la diagnosi di cancro, le eventuali co-morbidità e altre terapie contemporanee dovranno essere considerate (Roth et al, 2021).

Come discusso in precedenza, la maggioranza degli eventi avversi neurologici immuno-mediati colpiscono le radici dei nervi, i nervi periferici, muscoli e giunzioni neuromuscolari, ma tra le complicazioni più gravi abbiamo poliradicolopatie, neuropatie o una combinazione delle due, meglio definita come sindrome Guillain-Barrè-simile, oppure è frequente anche una areflessia e una compromissione dei nervi cranici (Larkin et al, 2017; Supakornnumporn, Katirji, 2017). Le neuropatie possono presentarsi con lesioni delle piccole fibre sensitive o essere conseguenza di uno stato infiammatorio cronico responsabile della polineuropatia demielinizzante; In ogni caso, deve essere considerato un ampio spettro di altre patologie e fattori che possono marcare lo sviluppo di radicolo-neuropatie, richiedendo appropriati studi elettrofisiologici e diagnosi di laboratorio (Watson, Dyck, 2015). Un esempio è fornito da quella che viene definita "dissociazione albuminocitologica", ovvero un aumento notevole dell'albumina e assenza di cellule

(globuli bianchi) nel liquido cefalorachidiano, rilevata nei pazienti che soffrono di poliradicolite (Bruna et al, 2020).

Per quanto riguarda effetti avversi sul sistema nervoso centrale, questi non sono comuni nell'immunoterapia, ma i pazienti che li manifestano richiedono un approccio diagnostico immediato e misure terapeutiche altrettanto rapide, a seconda della gravità dei sintomi clinici. Di queste, la sclerosi multipla è una malattia autoimmune caratterizzata da lesioni demielinizzanti delle fibre nervose. Tra queste vengono incluse anche le fibre del nervo ottico e in particolare, la demielinizzazione a livello del sistema nervoso centrale è stata associata a uno specifico meccanismo d'azione di tipo infiammatorio causato dall'immunoterapia. Inoltre esiste un numero crescente di evidenze riferite a complicazioni neurologiche nel contesto della terapia con ICI, questi includono pazienti con diagnosi di neurosarcooidosi o vasculiti a livello centrale (Dunn-Pirio et al, 2018; Tan I et al, 2018; Laubli et al, 2017).

Un altro aspetto molto importante nell'ambito dell'immunoterapia, è quella legata al contesto dei tumori cerebrali. Sono state sollevate questioni in merito al fatto che gli ICI potessero essere associati con un aumentato rischio di complicazioni nel sistema nervoso centrale in pazienti colpiti da tumore cerebrale; similmente allo sviluppo di molti altri farmaci, i pazienti con tumori cerebrali primari e secondari non sono da includere nei trials clinici per studiare l'attività degli ICI a causa delle complicazioni neurologiche piuttosto gravi (Roth et al, 2021). Entrambi i farmaci inibitori di CTLA-4 e PD-1 sono stati valutati in pazienti con metastasi cerebrali o con tumori primari come il glioblastoma. Anche se in questo caso sono stati trovati risultati abbastanza discordanti (Reardon et al, 2020), una serie di studi retrospettivi ha identificato lesioni intracraniche all'inizio della terapia con inibitori PD-1 come un fattore associato a un tasso elevato di complicazioni neurologiche (Shi et al, 2020).

Merita una particolare attenzione anche il caso dell'utilizzo di anticorpi bispecifici in immunoterapia. Il termine bispecifici si riferisce a due domini di legame che riconoscono diversi antigeni target; gli anticorpi bispecifici sono in grado quindi di legarsi a un antigene specificamente espresso in una cellula tumorale e al CD3 delle cellule T per mezzo di un altro dominio. In questo modo anticorpi bispecifici che richiamano le cellule T (TRBA) serve per attivare le cellule T e richiamarle in stretta prossimità dell'ambiente dove sono presenti le cellule tumorali, riuscendo ad ottenere un'efficace e immediata uccisione delle stesse (Goebeler, Bargou, 2020). Diversi anticorpi bispecifici sono stati studiati a livello pre-clinico, ma solo **blinatumomab** è stato approvato clinicamente nel trattamento di pazienti

con leucemia linfoblastica acuta refrattaria delle cellule B; blinatumomab si lega all'antigene CD-19 nelle cellule B, oltre a possedere una porzione che lega CD-3.

Vari anticorpi bispecifici sono ora in sviluppo pre-clinico e clinico. Questi agenti hanno come target antigeni tra cui HER-2, PD-1 o PD-L1, ma anche altre molecole coinvolte nella cascata di attivazione immunitaria (Roth et al, 2021); Per quanto riguarda gli effetti avversi e le complicazioni, i dati disponibili mostrano che gli eventi correlati ai TRBA sono limitati a blinatumomab, l'unico agente finora approvato. In particolare le complicazioni associate con la somministrazione di blinatumomab comprendono lo sviluppo di una sindrome da rilascio di citochine (CRS), una risposta infiammatoria sistemica, caratterizzata nel contesto della terapia delle cellule T a recettore antigene chimerico (CAR). La neurotossicità può verificarsi in parallelo o del tutto indipendente alla CRS ed è correlata in parte all'adesione delle cellule T a quelle endoteliali, indotta da blinatumomab. In un'analisi di 98 pazienti affetti da complicazioni neurologiche correlate alla terapia con blitumomab, sono state diagnosticate encefalopatie con mal di testa e tremori abbastanza diffusi e questi sintomi neurologici si sviluppavano tipicamente entro le prime due settimane dopo l'inizio del trattamento (Stein et al, 2019).

Un'evoluzione delle terapie finora elencate consiste nell'utilizzare cellule T derivate dal paziente per una terapia antitumorale. Tuttavia, i metodi classici come l'espansione e la stimolazione *ex vivo* a priori della risomministrazione non permettono di ottenere un'attività antitumorale clinicamente rilevante, ma questo aspetto è mutato considerevolmente con l'utilizzo di cellule T ingegnerizzate per esprimere il l'antigene CAR( Patrick Roth et al, 2021); andando ad approfondire meglio le caratteristiche, CAR consiste di un dominio di legame extracellulare che consente il legame alla cellula tumorale, insieme a domini intracellulari di segnale che determinano un'attivazione immediata delle cellule T (Dai et al, 2016); nel trattamento dei pazienti con tumori ematologici, in particolar modo le neoplasie delle cellule B, l'utilizzo di cellule CAR-T ha determinato benefici clinici evidenti (Maude et al, 2014; Porter et al, 2018), portando in campo terapeutico composti come tisagenlecleucel e axicabtagene-ciloeucel come prime terapie a base di cellule CAR-T.

Non mancano però, anche in questo caso gli effetti neurotossici, infatti la neurotossicità è stata riconosciuta come la complicazione principale e più frequente nei pazienti che hanno ricevuto questo tipo di terapia e le complicazioni neurologiche correlate vengono definite sindrome neurotossica associata alle cellule immuni effettrici (*Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome, ICANS*) (Pennisi et al, 2020) che insorge in circa il 50 % dei pazienti che hanno ricevuto l'approccio con le cellule CAR-T, ed in genere compare

intorno al terzo giorno dopo l'infusione delle cellule T, il quale termina dopo due settimane; la diagnosi di ICANS è difficoltosa in pazienti che soffrono anche di CRS perché le due condizioni si sovrappongono nel tempo (Roth et al, 2021).

Questo tipo di approccio terapeutico può inoltre comportare un'attivazione endoteliale e un'alterazione dell'integrità della barriera emato-encefalica determinanti l'insorgenza di ICANS (Gust et al, 2017) e causando l'alterazione della barriera emato-encefalica che risulta in un edema cerebrale e ulteriori complicazioni come ischemia tissutale ed emorragia, (Roth et al, 2021); ICANS di solito si manifesta con un'encefalopatia che include sintomi come confusione, delirio e allucinazioni, fino a portare al coma nei casi più severi; il metodo del punteggio CARTOX-10 (*CAR-T Cell Therapy-Associated Toxicity*), ideato da un team di collaboratori, denominato anch'esso CARTOX, è un metodo di misura delle funzioni cognitive, permette di classificare in gradi le complicazioni neurologiche associate all'utilizzo delle cellule CAR-T, assegnando un punteggio da grado 1 a 5, tuttavia il punteggio differisce marcatamente a seconda delle variabili incluse e della gravità della condizione patologica. Questo metodo è anche stato una base per sviluppare la valutazione anche dell'encefalopatia associata alle cellule immuni effettrici (ICE) da parte della ASTCT (*American Society for Transplantation and Cellular Therapy*) (Lee et al, 2019; Neelapu et al, 2018) ed è emerso che circa un terzo di pazienti riceventi axicabtagene-ciloleucel hanno sviluppato ICANS di grado superiore a 3, mentre il trattamento con tisagenlecleucel sembra essere meno correlato a ICANS di grado più severo (Pennisi et al, 2020).

Infine, il numero di pazienti che viene sottoposto a queste immunoterapie soprattutto in campo oncologico è in continuo aumento e i farmaci che agiscono a monte di CTLA-4 o dell'asse PD1/PD-L1 sono all'ultimo stadio di sviluppo clinico e rappresentano un utilizzo clinico maggiore nel futuro. Tuttavia come abbiamo visto, un gran numero di pazienti viene colpito da complicazioni neurologiche, anche se un preciso monitoraggio clinico e una diagnosi accurata di queste complicazioni è la chiave per dare il via a misure terapeutiche appropriate e per evitare la persistenza di questi effetti avversi, per di più una migliore comprensione di quelli che possono essere i biomarcatori di rilevanza clinica che aiutano a identificare meglio quei pazienti più suscettibili ai deficit neurologici, nel contesto dell'immunoterapia (Roth et al, 2021).

## CAPITOLO 12

### RUOLO DEI TRASPORTATORI DEI FARMACI NELLA NEUROPATIA PERIFERICA INDOTTA DA CHEMIOTERAPIA

Un elevato numero di studi di farmacogenetica ha evidenziato l'associazione tra i polimorfismi nei geni che codificano per i trasportatori dei farmaci e il rischio di insorgenza di neuropatia periferica da chemioterapici (Tabella 5) (Gréen et al, 2009).

Class	Drug	Transporter (gene)	dbSNP	Outcome	Odds ratio [95% confidence interval]	Ref.
Taxanes	Paclitaxel	P-gp ( <i>ABCB1</i> )	rs3213619	NCI CTCAE version 2. Grade $\geq 2$ neurotoxicity.	0.5 [0.3–0.8]	71
			rs1045642	NCI CTCAE version 4. Grade $\geq 2$ neurotoxicity.	2.8 [1.2–6.5]	72
			rs1128503	NCI CTCAE version 4. Grade $\geq 2$ neurotoxicity.	2.4 [1.1–5.4]	73
	Docetaxel	P-gp ( <i>ABCB1</i> )	rs17222723	NCI CTCAE version 2 Grade $\geq 2$ neurotoxicity.	0.6 [0.4–0.9]	71
			rs2032582	NCI CTCAE version 2. Time to onset of peripheral neuropathy.	1.9 months for reference genotypes vs. 0.7 months for carriers of variant	27
Platinum-based	Oxaliplatin	BCRP ( <i>ABCG2</i> )	rs3114018	NCI CTCAE version 2. Grade $\geq 2$ neurotoxicity when combined with <i>CCNH</i> rs2230641.	2.5 [1.2–5.1]	74
Vinca alkaloids	Vincristine	MRP1 ( <i>ABCC1</i> )	rs3887412	NCI CTCAE version 3. Grade 2-3 peripheral neuropathy vs. no peripheral neuropathy after two-three cycles of vincristine.	3.4 [1.5–7.7]	75
			rs2644983		4.2 [1.7–10.5]	
			rs11864374	Obtained from medical records. Grade 1-4 peripheral neuropathy vs. no peripheral neuropathy.	0.4 [0.2–0.8]	76
		rs3743527		0.3 [0.1–0.8]		
		rs1967120		0.4 [0.2–0.8]		
		rs17501331		2.5 [1.1–5.7]		
		rs12923345		2.4 [1.1–5.3]		
		rs11642957		0.4 [0.2–1.0]		
		rs3784867	NCI CTCAE version 4. Grade $\geq 2$ peripheral neuropathy.	4.9 [2.0–12.1]	77	
MRP2 ( <i>ABCC2</i> )	rs3740066	Obtained from medical records. Grade 1-4 peripheral neuropathy vs. no peripheral neuropathy.	0.2 [0.1–0.5]	76		
	rs12826		0.2 [0.1–0.5]			
	P-gp ( <i>ABCB1</i> )	rs4728709	NCI CTCAE version 3. Grade 1-2 peripheral neuropathy vs. no peripheral neuropathy.	0.3 [0.1–0.9]	78	

Tabella 5: Studi Clinici Farmacogenetici che correlano il rischio di CIPN a varianti genetiche in geni codificanti i trasportatori dei farmaci (Gréen et al, 2009).

I trasportatori localizzati sulla superficie delle cellule agiscono principalmente tramite la captazione e l'efflusso dei farmaci, determinandone un potenziale accumulo nell'organismo e quindi una manifestazione degli effetti tossici come quelli che abbiamo visto (neuropatia periferica), molto spesso però, queste associazioni non sono sempre valide perché gli effetti neurotossici possono derivare da una farmacocinetica alterata e i polimorfismi nelle proteine trasportatrici determinano variazioni farmacocinetiche minime (Gréen et al, 2009). Infatti una sperimentazione con topi resi knockout per il gene *MDR1A/1B* (Tabella 6) ha

dimostrato un aumento di solo il 30% dell'area sotto la curva nel profilo concentrazione-tempo del paclitaxel dopo somministrazione intravenosa (Lagas et al, 2006).

Per quanto riguarda i taxani, sia l'uptake che l'efflusso sono stati caratterizzati e poi studiati nei roditori per quantificare il loro contributo nella farmacocinetica e quindi nella manifestazione della neuropatia periferica. Paclitaxel è il substrato principale della glicoproteina-p (Tabella 6) codificato dal gene per MDR1, ABCB1 (Lagas et al, 2006; Fellner et al, 2002; Brooks et al, 2003); la glicoproteina-p fa parte della famiglia dei trasportatori ABC, ovvero ATP-binding cassette che utilizza il legame a due molecole di ATP per espellere i farmaci e altri ligandi dai tessuti bersaglio, essa è presente a livello intestinale, nel SNC rappresenta uno dei meccanismi principali di funzionamento della barriera ematoencefalica, responsabile dell'isolamento e della protezione delle strutture del sistema nervoso centrale dalla penetrazione di agenti tossici che potrebbero danneggiare il SNC; abbiamo diverse isoforme di glicoproteina-p e tutte appartengono alla vasta famiglia delle *Multidrug Resistance Associated Protein*. Di queste, MRP2 (Lagas et al, 2006; Hulsman et al, 2005) e MRP7 (Hopper-Borge et al, 2011; Hopper-Borge et al, 2004) hanno mostrato un efflusso del paclitaxel in vitro, ma il loro contributo nella distribuzione del farmaco al di fuori delle cellule tumorali, non è stato ancora caratterizzato (Tabella 6).

Per quanto riguarda l'uptake del paclitaxel, questo è mediato da due polipeptidi trasportatori di anioni organici, OATP1B3 e OATP1B1 (Smith et al, 2005; Nieuweboer et al, 2014); si tratta di proteine essenziali soprattutto nelle fasi di secrezione e assorbimento nei tubuli distali e prossimali del nefrone e hanno un ruolo chiave anche nella farmacocinetica delle statine (Tabella 6); Paclitaxel è noto per essere un inibitore di questi due trasportatori a concentrazioni clinicamente rilevanti (Mori et al, 2020; Stage et al, 2017).

Un altro farmaco della famiglia dei taxani è docetaxel che come paclitaxel è anch'esso un substrato della glicoproteina-p (Sissung et al, 2008; Zhu et al, 2013) e di OATP1B1 e OATP1B3 (Smith et al, 2005; Baker et al, 2009); gli studi in vivo dimostrano che questi due trasportatori esercitano un ruolo centrale per la farmacocinetica del docetaxel. Nei topi *knockout* per il gene SLCO1B2, gene che codifica per uno dei trasportatori, la *clearance* del docetaxel è più bassa del 66-83% (Lee et al, 2015; Iusuf et al, 2015), rispetto a quella del paclitaxel che si riduce solo del 30%, i topi *Knockout* per SLCO1B2 sono protetti contro la neurotossicità indotta da paclitaxel (Leblanc et al, 2018).

Per quanto riguarda i composti del platino, cisplatino, carboplatino e ossaliplatino dono risultati substrati di trasportatori del rame, come la proteina di uptake del rame (CTR1) (Ishida et al, 2002; Holzer et al, 2006); nel topo, questa proteina contribuisce all'uptake a

livello basolaterale del cisplatino a livello renale, regolando la nefrotossicità mediata da cisplatino (Pabla et al, 2009). Inoltre nei gangli della radice dorsale della specie murina, l'ossalipiatino sembra danneggiare principalmente i neuroni che esprimono CTR1, confermando l'importanza di questi trasportatori nel regolare la distribuzione dell'ossalipiatino in queste cellule (Tabella 6) (Ip et al, 2010).

La vincristina invece è substrato della glicoproteina-p e l'espressione elevata della glicoproteina-p risulta in un aumento della resistenza delle cellule tumorali al farmaco (Horio et al, 1989; Takara et al, 2002), infatti, la somministrazione contemporanea di vincristina e di un inibitore della P-gp, la ciclosporina A, determina un'aumento della tossicità al SNC (Bertrand et al, 1992); La vincristina inoltre è substrato della MRP1 e i topi resi knockout per il gene mostrano una riduzione della dose massima tollerata (Allen et al, 2000).

Nel caso del bortezomib, non abbiamo ancora informazioni esaustive riguardanti il suo trasporto. La citotossicità mediata da bortezomib è influenzata dal livello di P-gp e si è visto che è in grado di inibire l'internalizzazione dei composti del platino mediata da CTR1 attraverso l'inibizione del proteasoma, incrementando così l'*uptake* di cis-platino e la morte delle cellule sia *in vitro* che *in vivo* (Jandial et al, 2009).

Table 2 Summary of direct *in vitro* evidence (i.e., genetic overexpression or knockdown) of drug transport of chemotherapeutics that cause peripheral neuropathy

Transporter	Gene	Paclitaxel	Docetaxel	Oxaliplatin	Cisplatin	Carboplatin	Vincristine	Bortezomib	Ixabepilone
MRP1	ABCC1	✓	-	-	-	-	-	*	-
MRP2	ABCC2	✓	✓	-	-	-	✓	*	-
MRP7	ABCC10	✓	-	-	-	-	-	-	-
BCRP	ABCG2	-	-	-	-	-	-	*	*
P-gp	ABCB1	✓	✓	-	-	-	✓	✓	✓
OCT2	SLC22A2	-	-	✓	✓	*	-	-	-
OCTN1	SLC22A4	-	-	✓/*	-	-	-	-	-
OCTN2	SLC22A5	-	-	✓/*	-	-	-	-	-
OAT2	SLC22A7	✓	-	-	-	-	-	-	-
MATE1	SLC47A1	-	-	✓	-	-	-	-	-
OATP1B1	SLCO1B1	✓	✓	-	-	-	✓	✓	-
OATP1B3	SLCO1B3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	-
CTR1	SLC31A1	-	-	✓	✓	✓	-	-	-
References	-	17,19-23,26	22,28,29	35,39-41,43,45	34,35,43,45	34,35,43,45	17,46,47,49-52	53,56	57

✓ Direct evidence of transport (i.e., genetic overexpression or knockdown).

- Literature not available.

\*Evidence against transport.

Tabella 6: ✓: Evidenza diretta del trasporto ( sovraespressione genetica o knockdown)

-: Letteratura non disponibile \*: Evidenza contro il trasporto Rif: Tore B. stage et al, 2020.

L'espressione dei trasportatori dei farmaci nel sistema nervoso periferico è stata riportata in diversi studi, due di questi hanno utilizzato il sequenziamento dell'RNA nella cellula a livello dei gangli della radice dorsale nell'uomo, mentre altri studi sono stati condotti tramite l'analisi proteomica del lisato proveniente dai DRG (Flegel et al, 2015; Ray et al, 2018; Schwaid et al, 2018). L'espressione dei trasportatori che giocano un ruolo chiave nei DRG umani e che sono rilevanti per i chemioterapici responsabili della neuropatia periferica, sono illustrati nella Tab. (pagine 79,80) , in particolare viene mostrato che nello studio che utilizza il sequenziamento dell'RNA, l'espressione dei trasportatori era confermata se l'FPKM (Fragments Per Kilobase Million) era maggiore di 1; Nell'analisi proteomica, l'espressione dei trasportatori è stata definita come espressione proteica rilevabile in almeno due campioni dai dati di proteomica (Tabella 7) (Schwaid et al, 2018).

I trasportatori di efflusso P-gp (ABCB1), BCRP(ABCG2), MRP1( ABCC1) e MATE1 (SLC47A1) sono espressi nei DRG umani, al contrario di MRP2 (ABCC2) (Tabella 7); Il sistema nervoso periferico non è protetto dalla barriera emato-encefalica e così l'espressione dei trasportatori di efflusso è importante per garantire la protezione adeguata dagli agenti neurotossici; I trasportatori di uptake OCTN1/OCTN2 (SLC22A4/SLC22A5) e CTR1(SLC31A1) sono espressi nei DRG umani (Tabella 7); essi mediano l'ingresso nelle cellule di sostanze endogene, OCTN1/OCTN2 mediano l'uptake di ergotioneine mentre CTR1 media il trasporto del rame (Stage et al, 2020).

I dati di trascrittomici e proteomici però non confermano l'espressione di altri trasportatori SLC, come OATP1B1 e OATP1B3, OAT2 o OCT2, quindi questi dati non fungono da supporto significativo perché non danno informazioni sulla localizzazione e funzione di questi trasportatori, quindi sono necessarie ulteriori valutazioni (Tabella 7).

Transporter (gene/transporter)	RNAseq hDRG (> 1 FPKM cutoff)		Proteomics hDRG	
	Flegel <i>et al.</i> (2015)	Ray <i>et al.</i> (2018)	Schwaid <i>et al.</i> (2018)	Stage <i>et al.</i> (2020)
ABCC1/MRP1	+	+	+	+
ABCC2/MRP2	-	-	n.d.	-
ABCC10/MRP7	+	+	n.d.	n.d.
ABCG2/BCRP	+	+	n.d.	n.d.
ABCB1/P-gp	+	+	+	+
SLC22A2/OCT2	-	-	n.d.	n.d.
SLC22A4/OCTN1	+	+	n.d.	n.d.
SLC22A5/OCTN2	+	+	n.d.	n.d.
SLC22A7/OAT2	-	-	n.d.	n.d.
SLC47A1/MATE1	+	+	n.d.	n.d.
SLCO1B1/OATP1B1	-	-	n.d.	n.d.
SLCO1B3/OATP1B3	-	-	n.d.	n.d.
SLC31A1/CTR1	+	+	n.d.	n.d.

Tabella 7: +: Espressione confermata -: No espressione

n.d: Non determinato; Rif: Tore B. Stage et al, 2020.

In conclusione però, possiamo affermare che esiste un elevato numero di associazioni tra i polimorfismi nei geni dei trasportatori con la neuropatia da chemioterapici e l'espressione di trasportatori chiave nei gangli della radice dorsale potenzia il loro ruolo nella distribuzione dei farmaci nel sistema nervoso periferico (Figura 35).

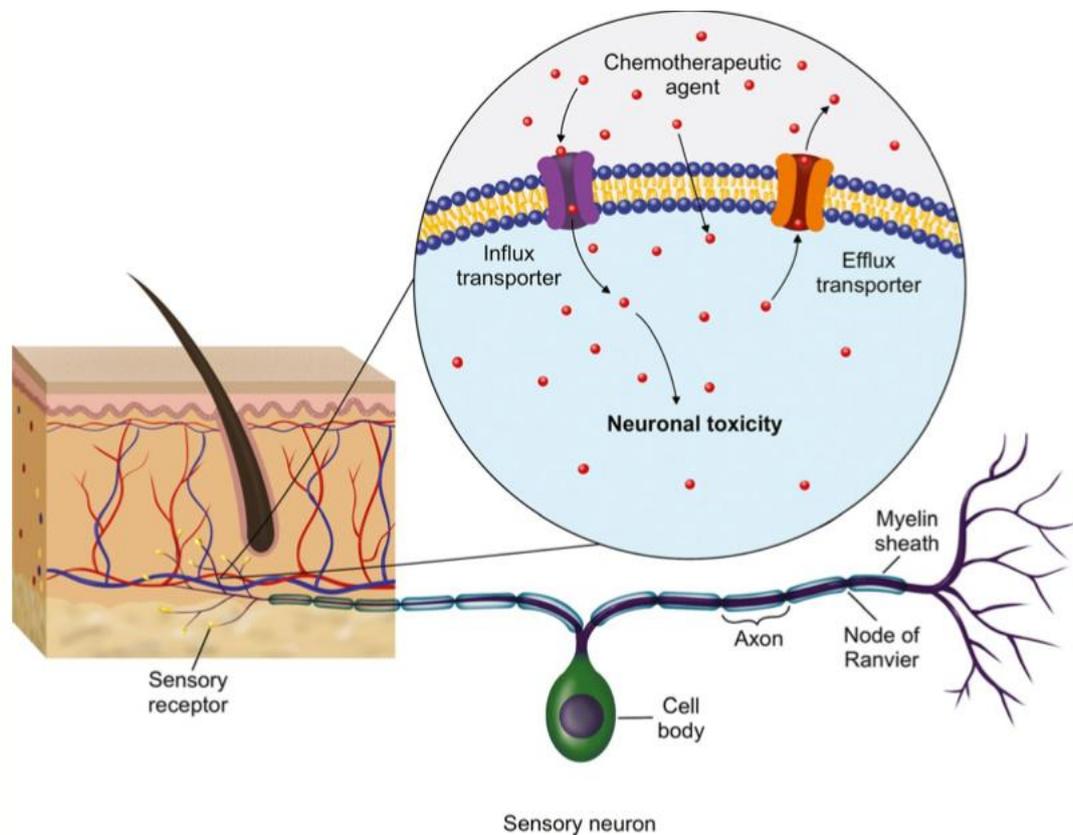


Figura 35: I trasportatori dei farmaci regolano l'influsso e l'efflusso dei chemioterapici nel sistema nervoso periferico modulando la tossicità e la neuropatia periferica (Stage et al, 2020)

Per quanto riguarda sempre i polimorfismi, diversi studi di farmacogenetica hanno correlato le alterazioni genetiche nei trasportatori di efflusso con il rischio di neuropatia periferica, infatti si è cercato di inibire l'efflusso mediato dai trasportatori, per esempio con farmaci ampiamente prescritti noti per la loro inibizione nei confronti della P-gp, come l'atorvastatina, ma questi hanno determinato un aumentato rischio di neuropatia periferica, quando usati in combinazione con il paclitaxel, supportando l'evidenza che l'inibizione dei trasportatori di efflusso provoca un accumulo del chemioterapico e conseguente tossicità nei neuroni sensitivi (Stage et al, 2020).

I composti del platino, sono substrati del trasportatore CTR1 che fondamentale è espresso in diversi tessuti e l'espressione di CTR1 nelle cellule tumorali è correlata con la risposta alla chemioterapia con questi farmaci (Kilari et al, 2016); sebbene l'intento di aumentare l'attività di CTR1 per favorire l'uptake del cis-platino può migliorare la risposta farmacologica, l'ampia distribuzione di CTR1 nei tessuti potrebbe anche determinare un rischio elevato di tossicità definita off-target a causa dell'elevata permeabilità dei composti del platino, quindi gli intenti clinici di avere come bersaglio CTR1 per aumentare l'uptake tumorale dei composti del platino deve essere effettuata tenendo in considerazione i possibili effetti avversi al di fuori del tessuto tumorale (Stage et al, 2020).

Paclitaxel e ixabepilone invece hanno mostrato essere attivatori dell'NPRX (Nuclear Pregnane X Receptor), conosciuto come meccanismo di induzione dell'espressione del gene ABCB1 (Mani et al, 2005); l'attivazione di questo recettore causa un aumento dell'espressioni di diversi geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci, tra cui CYP3A4 e ABCB1. L'aumento dell'espressione di ABCB1 e nella funzione della P-gp può influenzare la distribuzione dei chemioterapici nei neuroni periferici, anche se questa attività richiede un'esposizione prolungata agli induttori di questo fenomeno, ma sono pochi i regimi terapeutici che lo prevedono (Geick et al, 2001).

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Agnes, J. P., Santos, V. W. D., das Neves, R. N., Gonçalves, R. M., Delgobo, M., Girardi, C. S., Lückemeyer, D. D., Ferreira, M. A., Macedo-Júnior, S. J., Lopes, S. C., Spiller, F., Gelain, D. P., Moreira, J. C. F., Prediger, R. D., Ferreira, J., & Zanotto-Filho, A. (2021). Antioxidants Improve Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Tumor-Bearing Mice Model: Role of Spinal Cord Oxidative Stress and Inflammation. *The journal of pain*, 22(8), 996–1013. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2021.03.142>
- Al-Mazidi, S., Alotaibi, M., Nedjadi, T., Chaudhary, A., Alzoghaibi, M., & Djouhri, L. (2018). Blocking of cytokines signalling attenuates evoked and spontaneous neuropathic pain behaviours in the paclitaxel rat model of chemotherapy-induced neuropathy. *European journal of pain (London, England)*, 22(4), 810–821.
- Alé, A., Bruna, J., Calls, A., Karamita, M., Haralambous, S., Probert, L., Navarro, X. and Udina, E. (2016), Inhibition of the neuronal NFkB pathway attenuates bortezomib-induced neuropathy in a mouse model, *Neurotoxicology*, 55, 58-64.
- Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Joseph, E. K., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2008). Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(5), 1046–1057.
- Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Joseph, E. K., Reichling, D., & Levine, J. D. (2006). A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(14), 3864–3874.
- Alessandri-Haber, N., Dina, O. A., Yeh, J. J., Parada, C. A., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2004). Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(18), 4444–4452.
- Alessandri-Haber, N., Yeh, J. J., Boyd, A. E., Parada, C. A., Chen, X., Reichling, D. B., & Levine, J. D. (2003). Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron*, 39(3), 497–511.
- Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., van Deemter, L., Wijnholds, J., & Schinkel, A. H. (2000). Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer research*, 60(20), 5761–5766.

- Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S., & Bevan, S. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(10), 2485–2494.
- Areti, A., Yerra, V. G., Naidu, V., & Kumar, A. (2014). Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy. *Redox biology*, 2, 289–295.
- Argyriou, A. A., Iconomou, G., Kalofonos, H. P. (2008), Bortezomib -induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature, *Blood*, 112(5), 1593-1599.
- Argyriou, A. A., Park, S. B., Islam, B., Tamburin, S., Velasco, R., Alberti, P., Bruna, J., Psimaras, D., Cavaletti, G., Cornblath, D. R., & Toxic Neuropathy Consortium (TNC) (2019). Neurophysiological, nerve imaging and other techniques to assess chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity in the clinical and research settings. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 90(12), 1361–1369.
- Armstrong, T., Almadrones, L., & Gilbert, M. R. (2005). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Oncology nursing forum*, 32(2), 305–311.
- Arsenault, P., Chiche, D., Brown, W., Miller, J., Treister, R., Leff, R., Walker, P., & Katz, N. (2018). NEO6860, modality-selective TRPV1 antagonist: a randomized, controlled, proof-of-concept trial in patients with osteoarthritis knee pain. *Pain reports*, 3(6), e696.
- Authier, N., Gillet, J. P., Fialip, J., Eschalier, A., & Coudore, F. (2000). Description of a short-term Taxol-induced nociceptive neuropathy in rats. *Brain research*, 887(2), 239–249.
- Authier, N., Balayssac, D., Marchand, F., Ling, B., Zangarelli, A., Descoeur, J., Coudore, F., Bourinet, E., & Eschalier, A. (2009). Animal models of chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 6(4), 620–629.
- Azevedo, M. I., Pereira, A. F., Nogueira, R. B., Rolim, F. E., Brito, G. A., Wong, D. V., Lima-Júnior, R. C., de Albuquerque Ribeiro, R., & Vale, M. L. (2013). The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. *Molecular pain*, 9, 53.
- Balaban, C. D., O'Callaghan, J. P., & Billingsley, M. L. (1988). Trimethyltin-induced neuronal damage in the rat brain: comparative studies using silver degeneration stains, immunocytochemistry and immunoassay for neuronotypic and gliotypic proteins. *Neuroscience*, 26(1), 337–361.
- Baker, S. D., Verweij, J., Cusatis, G. A., van Schaik, R. H., Marsh, S., Orwick, S. J., Franke, R. M., Hu, S., Schuetz, E. G., Lamba, V., Messersmith, W. A., Wolff, A. C., Carducci, M.

- A., & Sparreboom, A. (2009). Pharmacogenetic pathway analysis of docetaxel elimination. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 85(2), 155–163.
- Balboni, G., Lazzari, I., Trapella, C., Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Nicotra, A., Melchiorri, P., Visentin, S., Nuccio, C. D., & Salvadori, S. (2008). Triazine compounds as antagonists at Bv8-prokineticin receptors. *Journal of medicinal chemistry*, 51(23), 7635–7639.
- Banach, M., Juranek, J.K., Zygulska, A. L. (2017), Chemotherapy-induced neuropathies: A Growing Problem for Patients and Health Care Providers, *Brain and Behavior*, 7, e00558.
- Bang, S., Yoo, J., Gong, X., Liu, D., Han, Q., Luo, X., Ji, R. R. (2018). Differential Inhibition of Na<sub>v</sub>1.7 and Neuropathic Pain by Hybridoma-produced and Recombinant Monoclonal Antibodies that Target Na<sub>v</sub>1.7: Differential Activities of Na<sub>v</sub>1.7-targeting Monoclonal Antibodies. *Neuroscience Bulletin*, 34(1), 22-41.
- Bao, T., Basal, C., Seluzicki, C., Li, S. Q., Seidman, A. D., & Mao, J. J. (2016). Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk. *Breast cancer research and treatment*, 159(2), 327–333.
- Barrière, D. A., Rieusset, J., Chanteranne, D., Busserolles, J., Chauvin, M. A., Chapuis, L., Salles, J., Dubray, C., & Morio, B. (2012). Paclitaxel therapy potentiates cold hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic rats through enhanced mitochondrial reactive oxygen species production and TRPA1 sensitization. *Pain*, 153(3), 553–561.
- Basu, S., & Sodhi, A. (1992). Increased release of interleukin-1 and tumour necrosis factor by interleukin-2-induced lymphokine-activated killer cells in the presence of cisplatin and FK-565. *Immunology and cell biology*, 70 (Pt 1), 15–24.
- Bennett, G. J., Liu, G. K., Xian, W. H., Jin, H. W. and Siau, C. (2011), Terminal Arbor Degeneration: A Novel Lesion Produced by the Antineoplastic Agent Paclitaxel, *European Journal of Neuroscience*, 33(9), 1667-1676.
- Bertrand, Y., Capdeville, R., Balduck, N., & Philippe, N. (1992). Cyclosporin A used to reverse drug resistance increases vincristine neurotoxicity. *American journal of hematology*, 40(2), 158–159.
- Boehmerle, W., Huehnchen, P., Peruzzaro, S., Balkaya, M., & Endres, M. (2014). Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. *Scientific reports*, 4, 6370.
- Boukelmoune, N., Laumet, G., Tang, Y., Ma, J., Mahant, I., Singh, S. K., Nijboer, C., Benders, M., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. (2021). Nasal administration of mesenchymal

stem cells reverses chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice. *Brain, behavior, and immunity*, 93, 43–54.

Boyette-Davis, J. A., Walters, E. T., & Dougherty, P. M. (2015). Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. *Pain management*, 5(4), 285–296.

Boyette-Davis, J., & Dougherty, P. M. (2011). Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. *Experimental neurology*, 229(2), 353–357.

Braga, A. V., Costa, S., Rodrigues, F. F., Melo, I. S. F., Morais, M. I., Coelho, M. M., & Machado, R. R. (2019). Thiamine, Riboflavin, and Nicotinamide Inhibit Paclitaxel-induced Allodynia by Reducing TNF<sub>alfa</sub> and CXCL-1 in Dorsal Root Ganglia and Thalamus and Activating ATP-sensitive potassium channels. *Inflammapharmacology*, 28, 201-213.

Brandolini, L., Castelli, V., Aramini, A., Giorgio, C., Bianchini, G., Russo, R., De Caro, C., d'Angelo, M., Catanesi, M., Benedetti, E., Giordano, A., Cimini, A., & Allegretti, M. (2019). DF2726A, a new IL-8 signalling inhibitor, is able to counteract chemotherapy-induced neuropathic pain. *Scientific reports*, 9(1), 11729.

Brewer, J. R., Morrison, G., Dolan, M. E. and Fleming, G. F. (2016), Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: Current Status and Progress, *Gynecol Oncology*, 140(1), 176-183.

Brito, A. M.S., Godin, A. M., Augusto, P. S. A., Menezes, R. R., Melo, I. S. F., Dutra, M., ... Coelho, M. M. (2018). Antiallodynic Activity of Leflunomide is Partially Inhibited by naltrexone and Glibenclamide and Associated with Reduced production of TNF<sub>alfa</sub> and CXCL-1. *European Journal of Pharmacology*, 818, 17-25.

Brooks, T. A., Minderman, H., O'Loughlin, K. L., Pera, P., Ojima, I., Baer, M. R., & Bernacki, R. J. (2003). Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein. *Molecular cancer therapeutics*, 2(11), 1195–1205.

Bruna, J., Argyriou, A. A., Anastopoulou, G. G., Alemany, M., Nadal, E., Kalofonou, F., Piulats, J. M., Simó, M., Velasco, R., & Kalofonos, H. P. (2020). Incidence and characteristics of neurotoxicity in immune checkpoint inhibitors with focus on neuromuscular events: Experience beyond the clinical trials. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, 25(2), 171–177.

Burgess, J., Ferdousi, M., Gosal, D., Boon, C., Matsumoto, K., Marshall, A., Mak, T., Marshall, A., Frank, B., Malik, R. A., & Alam, U. (2021). Chemotherapy-Induced

Peripheral Neuropathy: Epidemiology, Pathomechanisms and Treatment. *Oncology and therapy*, 9(2), 385–450.

Burgos, E., Gómez-Nicola, D., Pascual, D., Martín, M. I., Nieto-Sampedro, M., & Goicoechea, C. (2012). Cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents the development of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. Possible involvement of spinal glial cells. *European journal of pharmacology*, 682(1-3), 62–72.

Burke, K. P., Grebinoski, S., Sharpe, A. H., & Vignali, D. A. A. (2021). Understanding adverse events of immunotherapy: A mechanistic perspective. *The Journal of experimental medicine*, 218(1), e20192179.

Byrd-Leifer, C. A., Block, E. F., Takeda, K., Akira, S., & Ding, A. (2001). The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *European journal of immunology*, 31(8), 2448–2457.

C.Meregalli, P.Bonomo, G.Cavalletti, V.A.Carozzi.(2020), Blood molecular biomarkers for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: From preclinical models to clinical practice, *Neuroscience letters*, 1-7.

Cao, S., Li, Q., Hou, J., Li, Z., Cao, X., Liu, X., & Qin, B. (2019). Intrathecal TRPM8 blocking attenuates cold hyperalgesia via PKC and NF- $\kappa$ B signaling in the dorsal root ganglion of rats with neuropathic pain. *Journal of pain research*, 12, 1287–1296.

Cavaletti, G., Gilardini, A., Canta, A., Rigamonti, L., Rodriguez-Menendez, V., Ceresa, C., Marmiroli, P., Bossi, M., Oggioni, N., D'Incalci, M., & De Coster, R. (2007). Bortezomib-induced peripheral neurotoxicity: a neurophysiological and pathological study in the rat. *Experimental neurology*, 204(1), 317–325.

Celik, H., Kucukler, S., Ozdemir, S., Comakli, S., Gur, C., Kandemir, F. M., & Yardim, A. (2020). Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. *Neurotoxicology*, 80, 29–40.

Ceresa, C., Nicolini, G., Rigolio, R., Bossi, M., Pasqua, L., & Cavaletti, G. (2013). Functionalized mesoporous silica nanoparticles: a possible strategy to target cancer cells reducing peripheral nervous system uptake. *Current medicinal chemistry*, 20(20), 2589–2600.

Chang, W., Berta, t., Rim, Y. H., Ji, R. R., Lee, S. and Lee, S. Y. (2018), Expression and Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Human Dorsal Root Ganglion Neurons with Special Focus on Na<sub>v</sub>1.7, Species difference, and Regulation by Paclitaxel, *Neurosci Bull.*, 34(1), 4-12.

- Chen, E. I., Crew, K. D., Trivedi, M., Awad, D., Maurer, M., Kalinsky, K., Koller, A., Patel, P., Kim Kim, J., & Hershman, D. L. (2015). Identifying Predictors of Taxane-Induced Peripheral Neuropathy Using Mass Spectrometry-Based Proteomics Technology. *PloS one*, *10*(12), e0145816.
- Chen, L. H., Yeh, Y. M., Chen, Y. F., Hsu, Y. H., Wang, H. H., Lin, P. C., Chang, L. Y., Lin, C. K., Chang, M. S., & Shen, M. R. (2020). Targeting interleukin-20 alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *Pain*, *161*(6), 1237–1254.
- Chen, L. X., He, H., & Qiu, F. (2011). Natural withanolides: an overview. *Natural product reports*, *28*(4), 705–740.
- Chen, Y., Yang, C., & Wang, Z. J. (2011). Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience*, *193*, 440–451.
- Chen, E. I., Crew, K. D., Trivedi, M., Awad, D., Maurer, M., Kalinsky, K., Koller, A., Patel, P., Kim Kim, J., & Hershman, D. L. (2015). Identifying Predictors of Taxane-Induced Peripheral Neuropathy Using Mass Spectrometry-Based Proteomics Technology. *PloS one*, *10*(12), e0145816.
- Cheng, X., Huo, J., Wang, D., Cai, X., Sun, X., Lu, W., Yang, Y., Hu, C., Wang, X., & Cao, P. (2017). Herbal Medicine AC591 Prevents Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Animal Model and Cancer Patients. *Frontiers in pharmacology*, *8*, 344.
- Chhibber, T., Bagchi, S., Lahooti, B., Verma, A., Al-Ahmad, A., Paul, M. K., Pendyala, G., & Jayant, R. D. (2020). CNS organoids: an innovative tool for neurological disease modeling and drug neurotoxicity screening. *Drug discovery today*, *25*(2), 456–465.
- Cioroiu, C., Weimer, L. H. (2017), Update on Chemotherapy-induced peripheral neuropathy, *Curr Neurol Neurosci Rep*, *17*(6), 47.
- Coriat, R., Alexandre, J., Nicco, C., Quinquis, L., Benoit, E., Chéreau, C., Lemaréchal, H., Mir, O., Borderie, D., Tréluyer, J. M., Weill, B., Coste, J., Goldwasser, F., & Batteux, F. (2014). Treatment of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy by intravenous mangafodipir. *The Journal of clinical investigation*, *124*(1), 262–272.
- Costa, R., Bicca, M. A., Manjavachi, M. N., Segat, G. C., Dias, F. C., Fernandes, E. S., & Calixto, J. B. (2018). Kinin Receptors Sensitize TRPV4 Channel and Induce Mechanical Hyperalgesia: Relevance to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice. *Molecular neurobiology*, *55*(3), 2150–2161.

- Cuzzubbo, S., Javeri, F., Tissier, M., Roumi, A., Barlog, C., Doridam, J., Lebbe, C., Belin, C., Ursu, R., & Carpentier, A. F. (2017). Neurological adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: Review of the literature. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *73*, 1–8.
- da Costa, R., Passos, G. F., Quintão, N. L. M., Fernandes, E. S., Maia, J. R. L. C. B., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2020). Taxane-induced neurotoxicity: Pathophysiology and therapeutic perspectives. *British journal of pharmacology*, *177*(14), 3127–3146.
- Dai, H., Wang, Y., Lu, X., & Han, W. (2016). Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, *108*(7), djv439.
- De la Morena, B. P., Conesa, M., Gonzalez-Billalabeitia, E., Urrego, E., Garcia-Garre, E., Garcia-Martinez, E., Poves, M. Z., Vincente, V. and De la Pena, F. A. (2015), Delayed Recovery and Increased Severity of Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Patients with Diabetes, *Journal of National and Comprehensive Cancer Network*, *13*(4), 417-423.
- Deng, L., Guindon, J., Cornett, B. L., Makriyannis, A., Mackie, K., & Hohmann, A. G. (2015). Chronic cannabinoid receptor 2 activation reverses paclitaxel neuropathy without tolerance or cannabinoid receptor 1-dependent withdrawal. *Biological psychiatry*, *77*(5), 475–487.
- Di Cesare Mannelli, L., Lucarini, E., Micheli, L., Mosca, I., Ambrosino, P., Soldovieri, M. V., ... Gherardini, C. (2017). Effects of Natural and Synthetic Isothiocyanate-based H<sub>2</sub>S-releasers Against Chemotherapy-induced Neuropathic Pain: Role of K<sub>v</sub>7 Potassium Channels. *Neuropharmacology*, *121*, 49-59.
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Bonaccini, L., Zanardelli, M., Mello, T., & Ghelardini, C. (2013). Morphologic features and glial activation in rat oxaliplatin-dependent neuropathic pain. *The journal of pain*, *14*(12), 1585–1600.
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Corti, F., Boccella, S., Luongo, L., Esposito, E., Cuzzocrea, S., Maione, S., Calignano, A., & Ghelardini, C. (2015). Antineuropathic profile of N-palmitoylethanolamine in a rat model of oxaliplatin-induced neurotoxicity. *PloS one*, *10*(6), e0128080.
- Di Cesare Mannelli, L., Pacini, A., Matera, C., Zanardelli, M., Mello, T., De Amici, M., Dallanoce, C., & Ghelardini, C. (2014). Involvement of  $\alpha 7$  nAChR subtype in rat oxaliplatin-induced neuropathy: effects of selective activation. *Neuropharmacology*, *79*, 37–48.
- Dos Santos, G. G. L., Oliveira, A. L. L., Santos, D. S., do Espírito Santo, R. F., Silva, D. N., Juiz, P. J. L., Soares, M. B. P., & Villarreal, C. F. (2021). Mesenchymal stem cells reduce

the oxaliplatin-induced sensory neuropathy through the reestablishment of redox homeostasis in the spinal cord. *Life sciences*, 265, 118755.

Dougherty, P. M., Cata, J. P., Cordella, J. V., Burton, A., Weng, H. R. (2004), Taxol-Induced Sensory Disturbance is Characterized by Preferential Impairment of Myelinated Fiber Function in Cancer Patients, *Pain*, 109(1-2), 132-142.

Doyle, T. M., Chen, Z., Durante, M., & Salvemini, D. (2019). Activation of Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 in the Spinal Cord Produces Mechanohypersensitivity Through the Activation of Inflammasome and IL-1 $\beta$  Pathway. *The journal of pain*, 20(8), 956–964.

Duan, Z., Zhang, J., Li, J., Pang, X., & Wang, H. (2020). Inhibition of microRNA-155 Reduces Neuropathic Pain During Chemotherapeutic Bortezomib via Engagement of Neuroinflammation. *Frontiers in oncology*, 10, 416.

Duggett, N. A., Griffiths, L. A., McKenna, O. E., de Santis, V., Yongsanguanchai, N., Mokori, E. B., & Flatters, S. J. (2016). Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Neuroscience*, 333, 13–26.

Dunn-Pirio, A. M., Shah, S., & Eckstein, C. (2018). Neurosarcoidosis following Immune Checkpoint Inhibition. *Case reports in oncology*, 11(2), 521–526.

Eckhoff, L., Knoop, A., Jensen, M. B., & Ewertz, M. (2015). Persistence of docetaxel-induced neuropathy and impact on quality of life among breast cancer survivors. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 51(3), 292–300.

Eldridge, S., Scuteri, A., Jones, E. M. C., Cavaletti, G., Guo, L., & Glaze, E. (2021). Considerations for a Reliable In Vitro Model of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Toxics*, 9(11), 300.

Eskes, C., Boström, A. C., Bowe, G., Coecke, S., Hartung, T., Hendriks, G., Pamies, D., Piton, A., & Rovida, C. (2017). Good cell culture practices & in vitro toxicology. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 45(Pt 3), 272–277.

Fehrenbacher J. C. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Progress in molecular biology and translational science*, 131, 471–508.

Fellner, S., Bauer, B., Miller, D. S., Schaffrik, M., Fankhänel, M., Spruss, T., Bernhardt, G., Graeff, C., Färber, L., Gschaidmeier, H., Buschauer, A., & Fricker, G. (2002). Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 110(9), 1309–1318.

Feng, B., Zhou, F., Hou, B., Wang, D., Wang, T., Fu, Y., Ma, Y., Yu, H., & Li, Y. (2018). Binary Cooperative Prodrug Nanoparticles Improve Immunotherapy by Synergistically

- Modulating Immune Tumor Microenvironment. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30(38), e1803001.
- Ferrier, J., Pereira, V., Busserolles, J., Authier, N., & Balayssac, D. (2013). Emerging trends in understanding chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Current pain and headache reports*, 17(10), 364.
- Flatters, S. J. L., & Bennett, G. J. (2006). Studies of peripheral sensory nerves in paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy: evidence for mitochondrial dysfunction. *Pain*, 122(3), 245–257.
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., & Gisselmann, G. (2015). RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PloS one*, 10(6), e0128951.
- Franchi, S., Giannini, E., Lattuada, D., Lattanzi, R., Tian, H., Melchiorri, P., Negri, L., Panerai, A. E., & Sacerdote, P. (2008). The prokineticin receptor agonist Bv8 decreases IL-10 and IL-4 production in mice splenocytes by activating prokineticin receptor-1. *BMC immunology*, 9, 60.
- Franchi, S., Sacerdote, P., & Panerai, A. (2017). The prokineticin system: an interface between neural inflammation and pain. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 38(Suppl 1), 27–30.
- Fujita, S., Hirota, T., Sakiyama, R., Baba, M., Ieiri, I. (2019), Identification of Drug Transporters Contributing to Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy, *Journal of Neurochemistry*, 148(3), 373-385.
- Fukuda, Y., Li, Y., & Segal, R. A. (2017). A Mechanistic Understanding of Axon Degeneration in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in neuroscience*, 11, 481.
- Fuglsang-Frederiksen, A., & Pughahl, K. (2011). Current status on electrodiagnostic standards and guidelines in neuromuscular disorders. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 122(3), 440–455.
- Furgala-Wojas, A., Kowalska, M., Nowaczyk, A., Fijałkowski, Ł., & Sałat, K. (2020). Comparison of Bromhexine and its Active Metabolite - Ambroxol as Potential Analgesics Reducing Oxaliplatin-induced Neuropathic Pain - Pharmacodynamic and Molecular Docking Studies. *Current drug metabolism*, 21(7), 548–561.
- Galley, H. F., McCormick, B., Wilson, K. L., Lowes, D. A., Colvin, L., & Torsney, C. (2017). Melatonin limits paclitaxel-induced mitochondrial dysfunction in vitro and protects

against paclitaxel-induced neuropathic pain in the rat. *Journal of pineal research*, 63(4), e12444.

Gao, W., Zan, Y., Wang, Z. J., Hu, X. Y., & Huang, F. (2016). Quercetin ameliorates paclitaxel-induced neuropathic pain by stabilizing mast cells, and subsequently blocking PKC $\epsilon$ -dependent activation of TRPV1. *Acta pharmacologica Sinica*, 37(9), 1166–1177.

Gasparotti, R., Padua, L., Briani, C., & Lauria, G. (2017). New technologies for the assessment of neuropathies. *Nature reviews. Neurology*, 13(4), 203–216.

Geick, A., Eichelbaum, M., & Burk, O. (2001). Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *The Journal of biological chemistry*, 276(18), 14581–14587.

Gerdits, J., Summers, D. W., Milbrandt, J. and DiAntonio, A. (2016), Axon self-destruction: new links among SARM1, MAPKs and NAD<sup>+</sup> metabolism, *Neuron*, 89(3), 449-460.

Glimelius, B., Manojlovic, N., Pfeiffer, P., Mosidze, B., Kurteva, G., Karlberg, M., Mahalingam, D., Buhl Jensen, P., Kowalski, J., Bengtson, M., Nittve, M., & Näsström, J. (2018). Persistent prevention of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy using calmagafodipir (PledOx<sup>®</sup>): a placebo-controlled randomised phase II study (PLIANT). *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 57(3), 393–402.

Goebeler, M. E., & Bargou, R. C. (2020). T cell-engaging therapies - BiTEs and beyond. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(7), 418–434.

Gong, S. S., Li, Y. X., Zhang, M. T., Du, J., Ma, P. S., Yao, W. X., Zhou, R., Niu, Y., Sun, T., & Yu, J. Q. (2016). Neuroprotective Effect of Matrine in Mouse Model of Vincristine-Induced Neuropathic Pain. *Neurochemical research*, 41(11), 3147–3159.

Graus, F., & Dalmau, J. (2019). Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors. *Nature reviews. Clinical oncology*, 16(9), 535–548.

Gréen, H., Söderkvist, P., Rosenberg, P., Mirghani, R. A., Rymark, P., Lundqvist, E. A., & Peterson, C. (2009). Pharmacogenetic studies of Paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 104(2), 130–137.

Guida, F., Lattanzi, R., Boccella, S., Maftei, D., Romano, R., Marconi, V., Balboni, G., Salvadori, S., Scafuro, M. A., de Novellis, V., Negri, L., Maione, S., & Luongo, L. (2015). PC1, a non-peptide PKR1-preferring antagonist, reduces pain behavior and spinal neuronal sensitization in neuropathic mice. *Pharmacological research*, 91, 36–46.

Guo, J., Yu, Z., Das, M., & Huang, L. (2020). Nano Codelivery of Oxaliplatin and Folinic Acid Achieves Synergistic Chemo-Immunotherapy with 5-Fluorouracil for Colorectal Cancer and Liver Metastasis. *ACS nano*, 14(4), 5075–5089.

- Gust, J., Hay, K. A., Hanafi, L. A., Li, D., Myerson, D., Gonzalez-Cuyar, L. F., Yeung, C., Liles, W. C., Wurfel, M., Lopez, J. A., Chen, J., Chung, D., Harju-Baker, S., Özpolat, T., Fink, K. R., Riddell, S. R., Maloney, D. G., & Turtle, C. J. (2017). Endothelial Activation and Blood-Brain Barrier Disruption in Neurotoxicity after Adoptive Immunotherapy with CD19 CAR-T Cells. *Cancer discovery*, 7(12), 1404–1419.
- Han, Y., & Smith, M. T. (2013). Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Frontiers in pharmacology*, 4, 156.
- Hanig, J., Paule, M. G., Ramu, J., Schmued, L., Konak, T., Chigurupati, S., Slikker, W., Jr, Sarkar, S., & Liachenko, S. (2014). The use of MRI to assist the section selections for classical pathology assessment of neurotoxicity. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 70(3), 641–647.
- Hara, T., Chiba, T., Abe, K., Makabe, A., Ikeno, S., Kawakami, K., Utsunomiya, I., Hama, T., & Taguchi, K. (2013). Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion. *Pain*, 154(6), 882–889.
- Harrison, R. A., Tummala, S., & de Groot, J. (2020). Neurologic Toxicities of Cancer Immunotherapies: a Review. *Current neurology and neuroscience reports*, 20(7), 27.
- He, S., Li, C., Zhang, Q., Ding, J., Liang, X. J., Chen, X., Xiao, H., Chen, X., Zhou, D., & Huang, Y. (2018). Tailoring Platinum(IV) Amphiphiles for Self-Targeting All-in-One Assemblies as Precise Multimodal Theranostic Nanomedicine. *ACS nano*, 12(7), 7272–7281.
- Herndon, T. M., Deisseroth, A., Kaminskas, E., Kane R. C., Koti, K. M., Rothmann, M. d., Habtermariam, B., Bullock, J., Hawes, J., Palmby, T. R., Jee, J., Adams, W., Mahayni, H., Brown, J., Dorantes, A., Sridhara, R., Farrel, A. T. and Pazdur, R. (2013), U. S. Food and Drug Administration Approval: Carfilzomib for the Treatment of Multiple Myeloma, *Clinical Cancer Research*, 19(7), 4559-4563.
- Höke A. (2012). Animal models of peripheral neuropathies. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 9(2), 262–269.
- Höke, A., & Ray, M. (2014). Rodent models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *ILAR journal*, 54(3), 273–281.
- Holzer, A. K., Manorek, G. H., & Howell, S. B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular pharmacology*, 70(4), 1390–1394. <https://doi.org/10.1124/mol.106.022624>

- Hopper-Borge, E. A., Churchill, T., Paulose, C., Nicolas, E., Jacobs, J. D., Ngo, O., Kuang, Y., Grinberg, A., Westphal, H., Chen, Z. S., Klein-Szanto, A. J., Belinsky, M. G., & Kruh, G. D. (2011). Contribution of Abcc10 (Mrp7) to in vivo paclitaxel resistance as assessed in Abcc10(-/-) mice. *Cancer research*, 71(10), 3649–3657.
- Hopper-Borge, E., Chen, Z. S., Shchhaveleva, I., Belinsky, M. G., & Kruh, G. D. (2004). Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer research*, 64(14), 4927–4930.
- Horio, M., Chin, K. V., Currier, S. J., Goldenberg, S., Williams, C., Pastan, I., Gottesman, M. M., & Handler, J. (1989). Transepithelial transport of drugs by the multidrug transporter in cultured Madin-Darby canine kidney cell epithelia. *The Journal of biological chemistry*, 264(25), 14880–14884.
- Hu, X., Jiang, Z., Teng, L., Yang, H., Hong, D., Zheng, D., & Zhao, Q. (2021). Platinum-Induced Peripheral Neuropathy (PIPN): ROS-Related Mechanism, Therapeutic Agents, and Nanosystems. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 770808.
- Hu, L. Y., Zhou, Y., Cui, Q. W., Hu, M. X., Du, X. L., Mi, L. W., Chu, X. Y., Wu, C. G., Wang, Q. Y. and Mao-Ying, L. Q. (2018), Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2) Dependent Microglial Activation Promotes Cisplatin-Induced Peripheral Neuropathy in Mice, *Brain, Behavior and Immunity*, 68, 132-145.
- Huisman, M. T., Chhatta, A. A., van Tellingen, O., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2005). MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *International journal of cancer*, 116(5), 824–829.
- Iijima, Y., Bandow, K., Amano, S., Sano, M., Hino, S., Kaneko, K., Horie, N. and Sakagami, H. (2020), Protection of bortezomib-induced neurotoxicity by antioxidants, *Anticancer Research*, 40(7), 3685-3696.
- Illias, A. M., Gist, A. C., Zhang, H., Kosturakis, A. K., & Dougherty, P. M. (2018). Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *Pain*, 159(7), 1308–1316.
- Ip, V., Liu, J. J., Mercer, J. F., & McKeage, M. J. (2010). Differential expression of ATP7A, ATP7B and CTR1 in adult rat dorsal root ganglion tissue. *Molecular pain*, 6, 53.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14298–14302.
- Ishii, N., Tsubouchi, H., Miura, A., Yanagi, S., Ueno, H., Shiomi, K., & Nakazato, M. (2018). Ghrelin alleviates paclitaxel-induced peripheral neuropathy by reducing oxidative

stress and enhancing mitochondrial anti-oxidant functions in mice. *European journal of pharmacology*, 819, 35–42.

Islam, B., Lustberg, M., Staff, N. P., Kolb, N., Alberti, P. and Argyriou, A. A. (2019), Vinca Alkaloids, Thalidomide and Eribulin-Induced Peripheral Neurotoxicity: From Pathogenesis to Treatment, *Journal of The Peripheral Nervous System*, 24(Suppl 2), S63-73.

Iusuf, D., Hendrikx, J. J., van Esch, A., van de Steeg, E., Wagenaar, E., Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2015). Human OATP1B1, OATP1B3 and OATP1A2 can mediate the in vivo uptake and clearance of docetaxel. *International journal of cancer*, 136(1), 225–233.

Jandial, D. D., Farshchi-Heydari, S., Larson, C. A., Elliott, G. I., Wrasidlo, W. J., & Howell, S. B. (2009). Enhanced delivery of cisplatin to intraperitoneal ovarian carcinomas mediated by the effects of bortezomib on the human copper transporter 1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(2), 553–560.

Janes, K., Little, J. W., Li, C., Bryant, L., Chen, C., Chen, Z., Kamocki, K., Doyle, T., Snider, A., Esposito, E., Cuzzocrea, S., Bieberich, E., Obeid, L., Petrache, I., Nicol, G., Neumann, W. L., & Salvemini, D. (2014). The development and maintenance of paclitaxel-induced neuropathic pain require activation of the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1. *The Journal of biological chemistry*, 289(30), 21082–21097.

Jean-Gilles, L., Gran, B., & Constantinescu, C. S. (2010). Interaction between cytokines, cannabinoids and the nervous system. *Immunobiology*, 215(8), 606–610.

Jones, I., Yelhekar, T. D., Wiberg, R., Kingham, P. J., Johansson, S., Wiberg, M., & Carlsson, L. (2018). Development and validation of an in vitro model system to study peripheral sensory neuron development and injury. *Scientific reports*, 8(1), 15961.

Joseph, E. K., Levine, J. D. (2006), Mitochondrial electron transport in models of neuropathic and inflammatory pain, *Pain*, 121(1-2), 105-114.

Julius D. (2013). TRP channels and pain. *Annual review of cell and developmental biology*, 29, 355–384.

Kane, R. C., Bross, P. F., Farrel, A. T., Pazdur, R. (2003), Velcade: US FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy, *Oncologist*, 8(6), 508-513.

Kawashiri, T., Shimizu, S., Shigematsu, N., Kobayashi, D., & Shimazoe, T. (2019). Donepezil ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via a neuroprotective effect. *Journal of pharmacological sciences*, 140(3), 291–294.

- Khadrawy, Y. A., El-Gizawy, M. M., Sorour, S. M., Sawie, H. G., & Hosny, E. N. (2019). Effect of curcumin nanoparticles on the cisplatin-induced neurotoxicity in rat. *Drug and chemical toxicology*, *42*(2), 194–202.
- Khan, A., Shal, B., Khan, A. U., Ullah, R., Baig, W. M., Ul Haq, I., Seo, K. E. and Khan, S. (2021). Suppression of TRPV1/TRPM8/P2Y nociceptors by Withamethelin via Downregulating MAPK Signaling in Mouse Model of Vincristine-Induced Neuropathic Pain, *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 6084.
- Khan, Z., Hammer, C., Guardino, E., Chandler, G. S., & Albert, M. L. (2019). Mechanisms of immune-related adverse events associated with immune checkpoint blockade: using germline genetics to develop a personalized approach. *Genome medicine*, *11*(1), 39.
- Khasabova, I. A., Khasabov, S. G., Olson, J. K., Uhelski, M. L., Kim, A. H., Albino-Ramírez, A. M., Wagner, C. L., Seybold, V. S., & Simone, D. A. (2019). Pioglitazone, a PPAR $\gamma$  agonist, reduces cisplatin-evoked neuropathic pain by protecting against oxidative stress. *Pain*, *160*(3), 688–701.
- Kidd, J. F., Pilkington, M. F., Schell, M. J., Fogarty, K. e., Skepper, J. N., Taylor, C. W. and Thorn, P. (2002), Paclitaxel Affects Cytosolic Calcium Signals by Opening the Mitochondrial Permeability Transition Pore, *Journal of Biological Chemistry*, *277*(8), 6504-6510.
- Kilari, D., Iczkowski, K. A., Pandya, C., Robin, A. J., Messing, E. M., Guancial, E., & Kim, E. S. (2016). Copper Transporter-CTR1 Expression and Pathological Outcomes in Platinum-treated Muscle-invasive Bladder Cancer Patients. *Anticancer research*, *36*(2), 495–501.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthi, I., Emerson, M., & Altman, D. G. (2012). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Veterinary clinical pathology*, *41*(1), 27–31.
- Kim, J., Kim, H. Y., Song, S. Y., Go, S. H., Sohn, H. S., Baik, S., Soh, M., Kim, K., Kim, D., Kim, H. C., Lee, N., Kim, B. S., & Hyeon, T. (2019). Synergistic Oxygen Generation and Reactive Oxygen Species Scavenging by Manganese Ferrite/Ceria Co-decorated Nanoparticles for Rheumatoid Arthritis Treatment. *ACS nano*, *13*(3), 3206–3217.
- Kono, T., Satomi, M., Suno, M., Kimura, N., Yamazaki, H., Furukawa, H. and Matsubara, K. (2012), Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity Involves TRPM8 in the Mechanism of Acute Hypersensitivity to Cold Sensation, *Brain and Behavior*, *2*(1), 68-73.
- Krarup-Hansen, A., Helweg-Larsen, S., Schmalbruch, H., Rørth, M., & Krarup, C. (2007). Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain : a journal of neurology*, *130*(Pt 4), 1076–1088.

Krøigård, T., Metaxas, A., Wirenfeldt, M., & Finsen, B. (2019). Protective effect of ibuprofen in a rat model of chronic oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Experimental brain research*, 237(10), 2645–2651.

Krukowski, K., Eijkelkamp, N., Laumet, G., Hack, C. E., Li, Y., Dougherty, P. M., Heijnen, C. J. and Kavelaars, A. (2016), CD8<sup>+</sup> T cells and Endogenous IL-10 are Required for Resolution of Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain, *Journal of Neuroscience*, 36(43), 11074-11083.

Krukowski, K., Ma, J., Laumet, G. O., Gutti, T., Heijnen, C. J., Kavelaars, A., Golonzhka, O., Van Duzer, J., Mazitschek, R. and Jarpe, M. B. (2017), HDAC6 Inhibition Effectively Reverses Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy, *Pain*, 158(6), 1126-1137.

Lagas, J. S., Vlaming, M. L., van Tellingen, O., Wagenaar, E., Jansen, R. S., Rosing, H., Beijnen, J. H., & Schinkel, A. H. (2006). Multidrug resistance protein 2 is an important determinant of paclitaxel pharmacokinetics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(20 Pt 1), 6125–6132.

Landowski, T. H., Megli, C. J., Nullmeyer K. D., Lynch, R. M. and Dorr, R. T. (2005), Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca<sup>2+</sup> is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines, *Cancer Research*, 65(9), 3828-3836.

Larkin, J., Chmielowski, B., Lao, C. D., Hodi, F. S., Sharfman, W., Weber, J., Suijkerbuijk, K. P. M., Azevedo, S., Li, H., Reshef, D., Avila, A., & Reardon, D. A. (2017). Neurologic Serious Adverse Events Associated with Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone in Advanced Melanoma, Including a Case Series of Encephalitis. *The oncologist*, 22(6), 709–718.

Lattanzi, R., Maftai, D., Marconi, V., Florenzano, F., Franchi, S., Borsani, E., Rodella, L. F., Balboni, G., Salvadori, S., Sacerdote, P., & Negri, L. (2015). Prokineticin 2 upregulation in the peripheral nervous system has a major role in triggering and maintaining neuropathic pain in the chronic constriction injury model. *BioMed research international*, 2015, 301292.

Läubli, H., Hench, J., Stanczak, M., Heijnen, I., Papachristofilou, A., Frank, S., Zippelius, A., & Stenner-Liewen, F. (2017). Cerebral vasculitis mimicking intracranial metastatic progression of lung cancer during PD-1 blockade. *Journal for immunotherapy of cancer*, 5, 46.

Leblanc, A. F., Sprowl, J. A., Alberti, P., Chiorazzi, A., Arnold, W. D., Gibson, A. A., Hong, K. W., Pioso, M. S., Chen, M., Huang, K. M., Chodisetty, V., Costa, O., Florea, T., de Bruijn, P., Mathijssen, R. H., Reinbolt, R. E., Lustberg, M. B., Sucheston-Campbell, L.

- E., Cavaletti, G., Sparreboom, A., ... Hu, S. (2018). OATP1B2 deficiency protects against paclitaxel-induced neurotoxicity. *The Journal of clinical investigation*, 128(2), 816–825.
- Lee, D. W., Santomasso, B. D., Locke, F. L., Ghobadi, A., Turtle, C. J., Brudno, J. N., Maus, M. V., Park, J. H., Mead, E., Pavletic, S., Go, W. Y., Eldjerou, L., Gardner, R. A., Frey, N., Curran, K. J., Peggs, K., Pasquini, M., DiPersio, J. F., van den Brink, M. R. M., Komanduri, K. V., ... Neelapu, S. S. (2019). ASTCT Consensus Grading for Cytokine Release Syndrome and Neurologic Toxicity Associated with Immune Effector Cells. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 25(4), 625–638.
- Lee, H. H., Leake, B. F., Teft, W., Tirona, R. G., Kim, R. B., & Ho, R. H. (2015). Contribution of hepatic organic anion-transporting polypeptides to docetaxel uptake and clearance. *Molecular cancer therapeutics*, 14(4), 994–1003. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0547>
- Lee, J. S., Kim, Y. T., Jeon, E. K., Won, H. S., Cho, Y. S., & Ko, Y. H. (2012). Effect of green tea extracts on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 12, 124.
- Lehky, T. J., Leonard, G. D., Wilson, R. H., Grem, J. L., Floeter, M. K. (2004), Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity: Acute Hyperexcitability and Chronic Neuropathy, *Muscle Nerve*, 29(3), 387-392.
- Li, C., Deng, T., Shang, Z., Wang, D., & Xiao, Y. (2018). Blocking TRPA1 and TNF- $\alpha$  Signal Improves Bortezomib-Induced Neuropathic Pain. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 51(5), 2098–2110.
- Li, J., Wang, H., Wang, Y., Gong, X., Xu, X., Sha, X., Zhang, A., Zhang, Z., & Li, Y. (2020). Tumor-Activated Size-Enlargeable Bioinspired Lipoproteins Access Cancer Cells in Tumor to Elicit Anti-Tumor Immune Responses. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 32(38), e2002380.
- Li, Y., Cui, H. J., Huang, J. C., & Wu, X. Q. (2006). Clinical study of Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction in preventing and treating peripheral neuro-sensory toxicity caused by oxaliplatin. *Chinese journal of integrative medicine*, 12(1), 19–23.
- Li, Y., North, R. Y., Rhines, L. D., Tatsui, C. E., Rao, G., Edwards, D. D., Cassidy, R. M., Harrison, D. S., Johansson, C. A., Zhang, H. and Dougherty, P. M. (2018), DRG Voltage-Gated Sodium Channel 1.7 is Upregulated in Paclitaxel-Induced Neuropathy in Rats and Humans with Neuropathic Pain, *Journal of Neuroscience*, 38(5), 1124-1136.

- Li, Y., Tatsui, C. E., Rhines, L. D., North, R. Y., Harrison, D. S., Cassidy, R. M., Johansson, C. A., Kosturakis, A. K., Edwards, D. d., Zhang, H. and Dougherty, P. M. (2017), Dorsal Root Ganglion Neurons Become Hyperexcitable and Increase Expression of Voltage-gated T-Type Calcium Channels ( $Ca_v3.29$  in Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy, *Pain*, 158(39), 417-429.
- Li, Y., Zhang, H., Zhang, H., Kosturakis, A. K., Jaward, A. B. and Dougherty, P. M. (2014), Toll-like Receptor 4 Signaling Contributes to Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy, *Pain*, 15(7), 712-725.
- Liachenko, S., Ramu, J., Konak, T., Paule, M. G., & Hanig, J. (2015). Quantitative Assessment of MRI T2 Response to Kainic Acid Neurotoxicity in Rats in vivo. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 146(1), 183–191.
- Lim, S. C., Choi, J. E., Kang, H. S., & Han, S. I. (2010). Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53-caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*, 126(7), 1582–1595.
- Lim, S. Y., Lee, J. H., Gide, T. N., Menzies, A. M., Guminski, A., Carlino, M. S., Breen, E. J., Yang, J. Y. H., Ghazanfar, S., Kefford, R. F., Scolyer, R. A., Long, G. V., & Rizos, H. (2019). Circulating Cytokines Predict Immune-Related Toxicity in Melanoma Patients Receiving Anti-PD-1-Based Immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(5), 1557–1563.
- Lin, H. M., Lin, L. F., Sun, M. Y., Liu, J., & Wu, Q. (2020). Topical Delivery of Four Neuroprotective Ingredients by Ethosome-Gel: Synergistic Combination for Treatment of Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *International journal of nanomedicine*, 15, 3251–3266.
- Lindå, H., Sköld, M. K., & Ochsmann, T. (2011). Activating transcription factor 3, a useful marker for regenerative response after nerve root injury. *Frontiers in neurology*, 2, 30.
- Lindå, H., Sköld, M. K., Ochsmann, T. (2011), Activating Transcription Factor 3, a Useful Marker for Regenerative Response After Nerve Root Injury, *Frontiers in Neurology*, 2, 30.
- Liu, C. C., Huang, Z. X., Li, X., Shen, K. F., Liu, M., Ouyang, H. D., Zhang, S. B., Ruan, Y. T., Zhang, X. L., Wu, S. L., Xin, W. J., & Ma, C. (2018). Upregulation of NLRP3 via STAT3-dependent histone acetylation contributes to painful neuropathy induced by bortezomib. *Experimental neurology*, 302, 104–111.

- Liu, C. C., Lu, N., Cui, Y., Yang, T., Zhao, Z. Q., Xin, W. J., & Liu, X. G. (2010). Prevention of paclitaxel-induced allodynia by minocycline: Effect on loss of peripheral nerve fibers and infiltration of macrophages in rats. *Molecular pain*, 6, 76.
- Liu, C., Luan, S., OuYang, H., Huang, Z., Wu, S., Ma, C., Wei, J., & Xin, W. (2016). Upregulation of CCL2 via ATF3/c-Jun interaction mediated the Bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Brain, behavior, and immunity*, 53, 96–104.
- Liu, D., Sun, M., Xu, D., Ma, X., Gao, D., & Yu, H. (2019). Inhibition of TRPA1 and IL-6 signal alleviates neuropathic pain following chemotherapeutic bortezomib. *Physiological research*, 68(5), 845–855.
- Liu, T., Li, Q., Yang, S., Zhao, T., Lin, J., Ju, T., & Wen, Z. (2021). CNTs-CaP/chitosan-coated AZ91D magnesium alloy extract promoted rat dorsal root ganglia neuron growth via activating ERK signalling pathway. *Cell biochemistry and function*, 39(7), 908–920.
- Liu, Y., Wu, Y., Zhang, R., Lam, J., Ng, J. C., Xu, Z. P., Li, L., & Ta, H. T. (2019). Investigating the Use of Layered Double Hydroxide Nanoparticles as Carriers of Metal Oxides for Theranostics of ROS-Related Diseases. *ACS applied bio materials*, 2(12), 5930–5940.
- Lordani, T. V. A., de Lara, C. E., Ferreira, F. B. P., de Souza Terron Monich, M., Mesquita da Silva, C., Felicetti Lordani, C. R., Giacomini Bueno, F., Vieira Teixeira, J. J., & Lonardoni, M. V. C. (2018). Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic Review. *Mediators of inflammation*, 2018, 7354250.
- Maftai, D., Marconi, V., Florenzano, F., Giacotti, L. A., Castelli, M., Moretti, S., Borsani, E., Rodella, L. F., Balboni, G., Luongo, L., Maione, S., Sacerdote, P., Negri, L., & Lattanzi, R. (2014). Controlling the activation of the Bv8/prokineticin system reduces neuroinflammation and abolishes thermal and tactile hyperalgesia in neuropathic animals. *British journal of pharmacology*, 171(21),
- Makker, P. G. S., White, D., Lees, J. G., Parmar, J., Goldstein, D., Park, S. B., Howells, J. and Moalem-Taylor, G. (2020), Acute Changes in Nerve Excitability Following Oxaliplatin Treatment in Mice, *Journal of Neurophysiology*, 124(1), 232-244.
- Mangaiarkkarasi, A., Rameshkannan, S., & Ali, R. M. (2015). Effect of Gabapentin and Pregabalin in Rat Model of Taxol Induced Neuropathic Pain. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(5), FF11-FF14.
- Mani, S., Huang, H., Sundarababu, S., Liu, W., Kalpana, G., Smith, A. B., & Horwitz, S. B. (2005). Activation of the steroid and xenobiotic receptor (human pregnane X receptor) by

- nontaxane microtubule-stabilizing agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(17), 6359–6369.
- Marawaha, L., Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Kuhad, A. (2016), TRP channels: Potential Drug Target for Neuropathic Pain, *Inflammapharmacology*, 24, 305-317.
- Martucci, C., Franchi, S., Giannini, E., Tian, H., Melchiorri, P., Negri, L., & Sacerdote, P. (2006). Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, induces a proinflammatory phenotype of mouse macrophages. *British journal of pharmacology*, 147(2), 225–234.
- Masuoka, T., Kudo, M., Yoshida, J., Ishibashi, T., Muramatsu, I., Kato, N., Imaizumi, N., & Nishio, M. (2016). Long-Term Activation of Group I Metabotropic Glutamate Receptors Increases Functional TRPV1-Expressing Neurons in Mouse Dorsal Root Ganglia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 79.
- Matsumoto, M., Inoue, M., Hald, a., Xie, W., & Ueda, H. (2006). Inhibition of Paclitaxel-induced A-fiber Hypersensitization by gabapentin. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 318(2), 735-740.
- Maude, S. L., Frey, N., Shaw, P. A., Aplenc, R., Barrett, D. M., Bunin, N. J., Chew, A., Gonzalez, V. E., Zheng, Z., Lacey, S. F., Mahnke, Y. D., Melenhorst, J. J., Rheingold, S. R., Shen, A., Teachey, D. T., Levine, B. L., June, C. H., Porter, D. L., & Grupp, S. A. (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *The New England journal of medicine*, 371(16), 1507–1517.
- McCormick, B., Lowes, D. A., Colvin, L., Torsney, C. and Galley, H. F. (2016), MitoVitE, a Mitochondria-Targeted Antioxidant, Limits Paclitaxel-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in vitro and Paclitaxel-Induced Mechanical Hypersensitivity in a Rat Pain Model, *British journal of Anesthesia*, 117(5), 659-666.
- McMillan, D. E., Chang, L. W., Idemudia, S. O., & Wenger, G. R. (1986). Effects of trimethyltin and triethyltin on lever pressing, water drinking and running in an activity wheel: associated neuropathology. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 8(5), 499–507.
- Meregalli, C., Bonomo, R., Cavaletti, G., & Carozzi, V. A. (2021). Blood molecular biomarkers for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: From preclinical models to clinical practice. *Neuroscience letters*, 749, 135739.
- Miguel, C. A., Raggio, M. C., Villar, M. J., Gonzalez, S. L., & Coronel, M. F. (2019). Anti-allodynic and anti-inflammatory effects of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone caproate in oxaliplatin-

induced peripheral neuropathy. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, 24(1), 100–110.

Miyake, T., Nakamura, S., Zhao, M., So, K., Inoue, K., Numata, T., Takahashi, N., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2016). Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nature communications*, 7, 12840.

Molassiotis, A., Cheng, H. L., Leung, K. T., Li, Y. C., Wong, K. H., Au, J. S. K., Sundar, R., Chan, A., Ng, T. R., Suen, L. K. P., Chan, C. W., Yorke, J., & Lopez, V. (2019). Risk factors for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients receiving taxane- and platinum-based chemotherapy. *Brain and behavior*, 9(6), e01312.

Montague, K., & Malcangio, M. (2017). The Therapeutic Potential of Monocyte/Macrophage Manipulation in the Treatment of Chemotherapy-Induced Painful Neuropathy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 397.

Mori, D., Ishida, H., Mizuno, T., Kusumoto, S., Kondo, Y., Izumi, S., Nakata, G., Nozaki, Y., Maeda, K., Sasaki, Y., Fujita, K. I., & Kusuhara, H. (2020). Alteration in the Plasma Concentrations of Endogenous Organic Anion-Transporting Polypeptide 1B Biomarkers in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Paclitaxel. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 48(5), 387–394.

Moschetti, G., Amodeo, G., Maffei, D., Lattanzi, R., Procacci, P., Sartori, P., Balboni, G., Onnis, V., Conte, V., Panerai, A., Sacerdote, P., & Franchi, S. (2019). Targeting prokineticin system counteracts hypersensitivity, neuroinflammation, and tissue damage in a mouse model of bortezomib-induced peripheral neuropathy. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 89.

Moser V. C. (1996). Rat strain- and gender-related differences in neurobehavioral screening: acute trimethyltin neurotoxicity. *Journal of toxicology and environmental health*, 47(6), 567–586.

Mustafa Ali, M., Moeller, M., Rybicki, L., & Moore, H. C. F. (2017). Long-term peripheral neuropathy symptoms in breast cancer survivors. *Breast cancer research and treatment*, 166(2), 519–526.

Mustafa, A. M., Moeller, M., Rybicki, L., Moore, H. C. F. (2017), Long-term Peripheral Neuropathy Symptoms in Breast Cancer Survivors, ***Breast Cancer Research Treatment***, 166(29), 519-526.

Neelapu, S. S., Tummala, S., Kebriaei, P., Wierda, W., Gutierrez, C., Locke, F. L., Komanduri, K. V., Lin, Y., Jain, N., Daver, N., Westin, J., Gulbis, A. M., Loghin, M. E., de

- Groot, J. F., Adkins, S., Davis, S. E., Rezvani, K., Hwu, P., & Shpall, E. J. (2018). Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nature reviews. Clinical oncology*, *15*(1), 47–62.
- Ness, K. K., Jones, K. E., Smith, W. A., Spunt, S. L., Wilson, C. L., Armstrong, G. T., Srivastava, D. K., Robinson, L. L., Hudson, M. M. and Gurney, J. G. (2013), Chemotherapy-Related Neuropathic Symptoms and Functional Impairment in Adult Survivors of Extracranial Solid Tumors of Childhood: Results from the St. Jude Lifetime Cohort Study, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, *94*(8), 1451-1457.
- Nieto, F. R., Entrena, J. M., Cendan, C. M., Pozo, E. D., Vela, J. M., & Baeyens, J. M. (2008). Tetrodotoxin Inhibits the Development and Expression of Neuropathic Pain Induced by Paclitaxel in mice. *Pain*, *137*(3), 520-531.
- Nieuweboer, A. J., Hu, S., Gui, C., Hagenbuch, B., Ghobadi Moghaddam-Helmantel, I. M., Gibson, A. A., de Bruijn, P., Mathijssen, R. H., & Sparreboom, A. (2014). Influence of drug formulation on OATP1B-mediated transport of paclitaxel. *Cancer research*, *74*(11), 3137–3145.
- North, R. Y., Li, Y., Ray, P., Rhines, L. D., Tatsui, C. E., Rao, G., Johansson, C. A., Zhang, H., Kim, Y. H., Zhang, B., Dussor, G., Kim, T. H., Price, T. J., & Dougherty, P. M. (2019). Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons. *Brain : a journal of neurology*, *142*(5), 1215–1226.
- Oda, T., Yang, Y., Uchinoumi, H., Thomas, D. D., Chen-Izu, Y., Kato, T., Yamamoto, T., Yano, M., Cornea, R. L., & Bers, D. M. (2015). Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter, RyR structure and calmodulin affinity. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *85*, 240–248.
- Ogata, K., Sumida, K., Miyata, K., Kushida, M., Kuwamura, M., & Yamate, J. (2015). Circulating miR-9\* and miR-384-5p as potential indicators for trimethyltin-induced neurotoxicity. *Toxicologic pathology*, *43*(2), 198–208.
- Okubo, K., Takahashi, T., Sekiguchi, F., Kanaoka, D., Matsunami, M., Ohkubo, T., Kawabata, A. (2011). Inhibition of T-type Calcium Channels and Hydrogen Sulfide-forming Enzyme Reverses paclitaxel-evoked Neuropathic Hyperalgesia in rats. *Neuroscience*, *188*, 148-156.
- Ottaiano, A., Nappi, A., Tafuto, S., Nasti, G., De Divitiis, C., Romano, C., Cassata, A., Casaretti, R., Silvestro, L., Avallone, A., Capuozzo, M., Capozzi, M., Maiolino, P., Quagliariello, V., Scala, S., & Iaffaioli, V. R. (2016). Diabetes and Body Mass Index Are

Associated with Neuropathy and Prognosis in Colon Cancer Patients Treated with Capecitabine and Oxaliplatin Adjuvant Chemotherapy. *Oncology*, 90(1), 36–42.

Oztürk, G., Erdoğan, E., Anlar, O., Kösem, M., & Taşpınar, M. (2005). Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. *Cytokine*, 29(1), 31–41.

Pabla, N., Murphy, R. F., Liu, K., & Dong, Z. (2009). The copper transporter Ctrl contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(3), F505–F511.

Pachman, D. R., Qin, R., Seisler, D., Lavoie Smith, E. M., Kaggal, S., Novotny, P., Ruddy, K. J., Lafky, J. M., Ta, L. E., Beutler, A. S., Wagner-Johnston, N. D., Staff, N. P., Grothey, A., Dougherty, P. M., Cavalletti, G., Loprinzi, C. L. (2016), Comparison of Oxaliplatin and Paclitaxel-Induced Neuropathy, *Support Care Cancer*, 24(12), 5059-5068.

Pennisi, M., Jain, T., Santomasso, B. D., Mead, E., Wudhikarn, K., Silverberg, M. L., Batlevi, Y., Shouval, R., Devlin, S. M., Batlevi, C., Brentjens, R. J., Dahi, P. B., Diamonte, C., Giralt, S., Halton, E. F., Maloy, M., Palomba, M. L., Sanchez-Escamilla, M., Sauter, C. S., Scordo, M., ... Perales, M. A. (2020). Comparing CAR T-cell toxicity grading systems: application of the ASTCT grading system and implications for management. *Blood advances*, 4(4), 676–686.

Penson, R. T., Kronish, K., Duan, Z., Feller, A., Stark, P., Cook, S. E., Duska, L. R., Fuller, A. F., Goodman, A. K., Nikrul, N., MacNeill, K. M., Matulonis, U. A., Preffer, F. I. and Seiden, M. V. (2000), Cytokines IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNF $_{\alpha}$  in Patients with Epithelial Ovarian Cancer and Their Relationship to Treatment with Paclitaxel, *International Journal of Gynecological Cancer*, 35, 5239.

Peters, C. M., Jimenez-Andrade, J. M., Jonas, B. M., Sevcik, M. A., Koewler, N. J., Ghilardi, J. R., Wong, G. Y., & Mantyh, P. W. (2007). Intravenous paclitaxel administration in the rat induces a peripheral sensory neuropathy characterized by macrophage infiltration and injury to sensory neurons and their supporting cells. *Experimental neurology*, 203(1), 42–54.

Peters, C. M., Jimenez-Andrade, J. M., Kuskowski, M. A., Ghilardi, J. R. and Mantyh, P. W. (2007), An Evolving Cellular Pathology Occurs in Dorsal Root Ganglia, Peripheral Nerve and Spinal Cord Following Intravenous Administration of Paclitaxel in the Rat, *Brain Research*, 46, 1168.

Pittman, S. K., Gracias, N. G., Vasko, M. R., & Fehrenbacher, J. C. (2014). Paclitaxel alters the evoked release of calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons in culture. *Experimental neurology*, 253, 146–153.

- Podratz, J. L., Lee, H., Knorr, P., Koehler, S., Forsythe, S., Lambrecht, K., Arias, S., Schmidt, K., Steinhoff, G., Yudintsev, G., Yang, A., Trushina, E., & Windebank, A. (2017). Cisplatin induces mitochondrial deficits in *Drosophila* larval segmental nerve. *Neurobiology of disease*, *97*(Pt A), 60–69.
- Popiolek-Barczyk, K., Mika, J.,. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain. (2016), *Courent Medicinal Chemistry*, *23*, 2908-2928.
- Porter, D., Frey, N., Wood, P. A., Weng, Y., & Grupp, S. A. (2018). Grading of cytokine release syndrome associated with the CAR T cell therapy tisagenlecleucel. *Journal of hematology & oncology*, *11*(1), 35.
- Postow, M. A., Sidlow, R., & Hellmann, M. D. (2018). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*, *378*(2), 158–168.
- Puertas-Neyra, K., Usategui-Martín, R., Coco, R. M., & Fernandez-Bueno, I. (2020). Intravitreal stem cell paracrine properties as a potential neuroprotective therapy for retinal photoreceptor neurodegenerative diseases. *Neural regeneration research*, *15*(9), 1631–1638.
- Quintao, N. L. M., Santin, J. R., Stoeberl, L. C., Correa, T. P., Melato, J., & Costa, R. (2019). Pharmacological Treatment of Chemotherapy-induced Neuropathic Pain: PPAR<sub>gamma</sub> Agonists as a Promising Tool. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 907.
- Ravaglia, S., Corso, A., Piccolo, G., Lozza, A., Alfonsi, E., Mangiacavalli, S., Varettoni, M., Zappasodi, P., Moglia, A., Lazzarino, M., & Costa, A. (2008). Immune-mediated neuropathies in myeloma patients treated with bortezomib. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, *119*(11), 2507–2512.
- Ray, P., Torck, A., Quigley, L., Wangzhou, A., Neiman, M., Rao, C., Lam, T., Kim, J. Y., Kim, T. H., Zhang, M. Q., Dussor, G., & Price, T. J. (2018). Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain*, *159*(7), 1325–1345.
- Reardon, D. A., Brandes, A. A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., Baehring, J., Ahluwalia, M. S., Roth, P., Bähr, O., Phuphanich, S., Sepulveda, J. M., De Souza, P., Sahebjam, S., Carleton, M., Tatsuoka, K., Taitt, C., Zwirter, R., Sampson, J., & Weller, M. (2020). Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, *6*(7), 1003–1010.

- Roberts, R. A., Aschner, M., Calligaro, D., Guilarte, T. R., Hanig, J. P., Herr, D. W., Hudzik, T. J., Jeromin, A., Kallman, M. J., Liachenko, S., Lynch, J. J., 3rd, Miller, D. B., Moser, V. C., O'Callaghan, J. P., Slikker, W., Jr, & Paule, M. G. (2015). Translational Biomarkers of Neurotoxicity: A Health and Environmental Sciences Institute Perspective on the Way Forward. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, *148*(2), 332–340.
- Robinson, C. R., Zhang, H., & Dougherty, P. M. (2014). Astrocytes, but not microglia, are activated in oxaliplatin and bortezomib-induced peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience*, *274*, 308–317.
- Roth, P., Winklhofer, S., Müller, A. M. S., Dummer, R., Mair, M. J., Gramatzki, D., Le Rhun, E., Manz, M. G., Weller, M., & Preusser, M. (2021). Neurological complications of cancer immunotherapy. *Cancer treatment reviews*, *97*, 102189.
- Rothenberg, M. L., Oza, A. M., Bigelow, R. H., Berlin, J. D., Marshall, J. L., Ramanathan, R. K., Hart, L. L., Gupta, S., Garay, C. A., Burger, B. G., Le Bail, N., & Haller, D. G. (2003). Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *21*(11), 2059–2069.
- Sałat, K., & Filipek, B. (2015). Antinociceptive activity of transient receptor potential channel TRPV1, TRPA1, and TRPM8 antagonists in neurogenic and neuropathic pain models in mice. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, *16*(3), 167–178.
- Schmitt, S., Goldschmidt, H., Storch-Hagenlocher, B., Pham, M., Fingerle-Rowson, G., Ho, A. D., & Neben, K. (2011). Inflammatory autoimmune neuropathy, presumably induced by bortezomib, in a patient suffering from multiple myeloma. *International journal of hematology*, *93*(6), 791–794.
- Schwaid, A. G., Krasowka-Zoladek, A., Chi, A., & Cornella-Taracido, I. (2018). Comparison of the Rat and Human Dorsal Root Ganglion Proteome. *Scientific reports*, *8*(1), 13469.
- Scuteri, A., Galimberti, A., Maggioni, D., Ravasi, M., Pasini, S., Nicolini, G., Bossi, M., Miloso, M., Cavalletti, G. and Tredici, G. (2009), Role of MAPKs in Platinum-induced Neuronal Apoptosis, *Neurotoxicology*, *30*, 312-9.
- Segat, G. C., Manjavachi, M. N., Matias, D. O., Passos, G. F., Freitas, C. S., Costa, R., & Calixto, J. B. (2017). Antiallodynic effect of  $\beta$ -caryophyllene on paclitaxel-induced peripheral neuropathy in mice. *Neuropharmacology*, *125*, 207–219.

- Sharawy, N., Rashed, L., & Youakim, M. F. (2015). Evaluation of multi-neuroprotective effects of erythropoietin using cisplatin induced peripheral neurotoxicity model. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 67(4), 315–322.
- Sharma, A. D., McCoy, L., Jacobs, E., Willey, H., Behn, J. Q., Nguyen, H., Bolon, B., Curley, J. L., & Moore, M. J. (2019). Engineering a 3D functional human peripheral nerve in vitro using the Nerve-on-a-Chip platform. *Scientific reports*, 9(1), 8921.
- Shi, S., Jaoube, J. A., Kanwar, R., Jin, M. C., Amarin, A., Varanasi, V., Eisinger, E., Thomas, R., & Moore, J. M. (2020). Neurological adverse effects due to programmed death 1 (PD-1) inhibitors. *Journal of neuro-oncology*, 148(2), 291–297.
- Shim, H. S., Bae, C., Wang, J., Lee, K. H., Hankerd, K. M., Kim, H. K., Hankerd, M. K., Chung, M. J. and La, H. J. (2019), Peripheral and Central Oxidative Stress in Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain, *Pain*, 15.
- Shimizu, S., Takahashi, N., & Mori, Y. (2014). TRPs as chemosensors (ROS, RNS, RCS, gasotransmitters). *Handbook of experimental pharmacology*, 223, 767–794.
- Singh, J., Saha, L., Singh, N., Kumari, P., Bhatia, A., & Chakrabarti, A. (2019). Study of nuclear factor-2 erythroid related factor-2 activator, berberine, in paclitaxel induced peripheral neuropathy pain model in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 71(5), 797–805.
- Singh, S. K., & Spiegel, S. (2020). Sphingosine-1-phosphate signaling: A novel target for simultaneous adjuvant treatment of triple negative breast cancer and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Advances in biological regulation*, 75, 100670.
- Sissung, T. M., Baum, C. E., Deeken, J., Price, D. K., Aragon-Ching, J., Steinberg, S. M., Dahut, W., Sparreboom, A., & Figg, W. D. (2008). ABCB1 genetic variation influences the toxicity and clinical outcome of patients with androgen-independent prostate cancer treated with docetaxel. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(14), 4543–4549.
- Smith, N. F., Acharya, M. R., Desai, N., Figg, W. D., & Sparreboom, A. (2005). Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. *Cancer biology & therapy*, 4(8), 815–818.
- Smith, N. F., Acharya, M. R., Desai, N., Figg, W. D., & Sparreboom, A. (2005). Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. *Cancer biology & therapy*, 4(8), 815–818.

- Lavoie Smith, E. M., Li, L., Chiang, C., Thomas, K., Hutchinson, R. J., Wells, E. M., Ho, R. H., Skiles, J., Chakraborty, A., Bridges, C. M., & Renbarger, J. (2015). Patterns and severity of vincristine-induced peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, 20(1), 37–46.
- Sprowl, J. A., Ciarimboli, G., Lancaster, C. S., Giovinazzo, H., Gibson, A. A., Du, G., Janke, L. J., Cavaletti, G., Shields, A. F., & Sparreboom, A. (2013). Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(27), 11199–11204.
- Stage, T. B., Bergmann, T. K., & Kroetz, D. L. (2018). Clinical Pharmacokinetics of Paclitaxel Monotherapy: An Updated Literature Review. *Clinical pharmacokinetics*, 57(1), 7–19.
- Stanford, K. R., Hadley, S. H., Barannikov, I., Ajmo, J. M., Bahia, P. K., & Taylor-Clark, T. E. (2019). Antimycin A-induced mitochondrial dysfunction activates vagal sensory neurons via ROS-dependent activation of TRPA1 and ROS-independent activation of TRPV1. *Brain research*, 1715, 94–105.
- Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H. and Aneja, R. (2011), Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective, *Medicinal Research Reviews*, 31(3), 443-481.
- Stein, A. S., Schiller, G., Benjamin, R., Jia, C., Zhang, A., Zhu, M., Zimmerman, Z., & Topp, M. S. (2019). Neurologic adverse events in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia treated with blinatumomab: management and mitigating factors. *Annals of hematology*, 98(1), 159–167.
- Stockstill, K., Doyle, T. M., Yan, X., Chen, Z., Janes, K., Little, J. W., Braden, K., Lauro, F., Giancotti, L. A., Harada, C. M., Yadav, R., Xiao, W. H., Lionberger, J. M., Neumann, W. L., Bennett, G. J., Weng, H. R., Spiegel, S., & Salvemini, D. (2018). Dysregulation of sphingolipid metabolism contributes to bortezomib-induced neuropathic pain. *The Journal of experimental medicine*, 215(5), 1301–1313.
- Sun, H., Guo, X., Wang, Z., Wang, P., Zhang, Z., Dong, J., Zhuang, R., Zhou, Y., Ma, G., & Cai, W. (2019). Alpha-lipoic Acid Prevents Oxidative Stress and Peripheral Neuropathy in Nab-Paclitaxel-Treated Rats through the Nrf2 Signalling Pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 3142732.
- Supakornnumporn, S., & Katirji, B. (2017). Guillain-Barré Syndrome Triggered by Immune Checkpoint Inhibitors: A Case Report and Literature Review. *Journal of clinical neuromuscular disease*, 19(2), 80–83.

- Swain, S. M., & Arezzo, J. C. (2008). Neuropathy associated with microtubule inhibitors: diagnosis, incidence, and management. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O*, 6(6), 455–467.
- Swain, S. M., Arezzo, J. C. (2008), Neuropathy Associated with Microtubule Inhibitors: Diagnosis, Incidence and Management, *Clin Adv Hematol Oncology*, 6(6), 455-467.
- Syed, S. N., Weigert, A., & Brüne, B. (2020). Sphingosine Kinases are Involved in Macrophage NLRP3 Inflammasome Transcriptional Induction. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4733.
- Ta, L. E., Espeset, L., Podratz, J., Windebank, A. J. (2006), Neurotoxicity of Oxaliplatin and Cisplatin for Dorsal Root Ganglion Neurons Correlates with Platinum-DNA Binding, *Neurotoxicology*, 27, 992.
- Takara, K., Sakaeda, T., Yagami, T., Kobayashi, H., Ohmoto, N., Horinouchi, M., Nishiguchi, K., & Okumura, K. (2002). Cytotoxic effects of 27 anticancer drugs in HeLa and MDR1-overexpressing derivative cell lines. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(6), 771–778.
- Tamburin, S., Park, S. B., Alberti, P., Demichelis, C., Schenone, A., & Argyriou, A. A. (2019). Taxane and epothilone-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*, 24 Suppl 2, S40–S51.
- Tan, I., Malinzak, M., & Salama, A. K. S. (2018). Delayed onset of neurosarcoidosis after concurrent ipilimumab/nivolumab therapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 6(1), 77.
- Tanabe, Y., Hashimoto, K., Shimizu, C., Hirakawa, A., Harano, K., Yunokawa, M., Yonemori, K., Katsumata, N., Tamura, K., Ando, M., Kinoshita, T., & Fujiwara, Y. (2013). Paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer. *International journal of clinical oncology*, 18(1), 132–138.
- Thawani, S. P., Tanji, K., De Sousa, E. A., Weimer, L. H. and Brannagan, T. H. 3<sup>rd</sup>. (2015), Bortezomib-associated demyelinating neuropathy—clinical and pathologic features, *Journal of Clinical and Neurological Disease*, 16(4), 202-209.
- Tonkin, R. S., Bowles, C., Perera, C. J., Keating, B. A., Makker, P. G. S., Duffy, S. S., Lees, J. G., Tran, C., Don, A. S., Fath, T., Liu, L., O'Carroll, S. J., Nicholson, L. F. B., Green, C. R., Gorrie, C., & Moalem-Taylor, G. (2018). Attenuation of mechanical pain hypersensitivity by treatment with Peptide5, a connexin-43 mimetic peptide, involves inhibition of NLRP3 inflammasome in nerve-injured mice. *Experimental neurology*, 300, 1–12.

- Topp, K. S., Tanner, K. D. and Levine, J. D. (2000), Damage to the cytoskeleton of large diameter sensory neurons and myelinated axons in vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat, *Journal of Comparative Neurology*, 424(4), 563-576.
- Tore B. stage, Shuiying Hu, Alex Sparreboom, Deanna L. Kroetz.(2020), Role of drug transporters in chemotherapy-induced peripheral neuropathy, *Clinical and Translational Science*, 1-8.
- Vashistha, B., Sharma, A., & Jain, V. (2017). Ameliorative potential of ferulic acid in vincristine-induced painful neuropathy in rats: An evidence of behavioral and biochemical examination. *Nutritional neuroscience*, 20(1), 60–70.
- Wahlman, C., Doyle, T. M., Little, J. W., Luongo, L., Janes, K., Chen, Z., Esposito, E., Tosh, D. K., Cuzzocrea, S., Jacobson, K. A., & Salvemini, D. (2018). Chemotherapy-induced pain is promoted by enhanced spinal adenosine kinase levels through astrocyte-dependent mechanisms. *Pain*, 159(6), 1025–1034.
- Walker, A. L., Imam, S. Z., & Roberts, R. A. (2018). Drug discovery and development: Biomarkers of neurotoxicity and neurodegeneration. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 243(13), 1037–1045.
- Wan, H. I., Soares, H., & Waring, J. F. (2012). Use of cerebrospinal fluid biomarkers in clinical trials for schizophrenia and depression. *Biomarkers in medicine*, 6(1), 119–129.
- Warwick, R. A., & Hanani, M. (2013). The contribution of satellite glial cells to chemotherapy-induced neuropathic pain. *European journal of pain (London, England)*, 17(4), 571–580.
- Waseem, M., Kaushik, P., Tabassum, H., & Parvez, S. (2018). Role of Mitochondrial Mechanism in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Current drug metabolism*, 19(1), 47–54.
- Watson, J. C., & Dyck, P. J. (2015). Peripheral Neuropathy: A Practical Approach to Diagnosis and Symptom Management. *Mayo Clinic proceedings*, 90(7), 940–951.
- Weaver B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 25(18), 2677–2681.
- Wei, X. M., Chen, X. F., Shu, P., Jiang, Z. W., Wu, X. Y., Zou, X., Chen, K., Shen, B., Hu, W. W., Lu, W., Shen, W. X., Li, L., Wang, J. Y., Zhao, F. J., Yin, Q. F., Cheng, H. B., & Gu, Y. H. (2020). Study on efficacy and safety of Huangqi Guizhi Wuwu decoction treatment for oxaliplatin induced peripheral neurotoxicity: A protocol for a randomized, controlled, double-blind, multicenter trial. *Medicine*, 99(22), e19923.

- Windebank, A. J., Grisold, W. (2008), Chemotherapy-Induced Neuropathy, *J Peripheral Nervous System*, 13(1), 27-46.
- Wu, H., Li, F., Wang, S., Lu, J., Li, J., Du, Y., Sun, X., Chen, X., Gao, J., & Ling, D. (2018). Ceria nanocrystals decorated mesoporous silica nanoparticle based ROS-scavenging tissue adhesive for highly efficient regenerative wound healing. *Biomaterials*, 151, 66–77.
- Wu, J., Hocevar, M., Bie, B., Foss, J. F., & Naguib, M. (2019). Cannabinoid Type 2 Receptor System Modulates Paclitaxel-Induced Microglial Dysregulation and Central Sensitization in Rats. *The journal of pain*, 20(5), 501–514.
- Xia, Z., Xiao, Y., Wu, Y., & Zhao, B. (2016). Sodium Channel Na<sub>v</sub>1.7 Expression is Upregulated in the Dorsal Root Ganglia in a Rat Model of Paclitaxel-induced Peripheral Neuropathy, *Springerplus*, 5(1), 1738.
- Xiao, W. H., & Bennett, G. J. (2012). Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin. *Pain*, 153(3), 704–709.
- Xiao, W., Naso, L., & Bennet, G. J. (2008). Experimental Studies of Potential Analgesics for the Treatment of Chemotherapy-evoked Painful Peripheral Neuropathies. *Pain Medicine*, 9(5), 505-517.
- Y. Chen, C. Yang, Z.J. Wang.(2011), Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4 and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain, *Neuroscience*, 193, 440-451.
- Yamamoto, S., & Egashira, N. (2021). Drug Repositioning for the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy: A Mechanism- and Screening-Based Strategy. *Frontiers in pharmacology*, 11, 607780.
- Yamamoto, Y., Hyodo, I., Takigahira, M., Koga, Y., Yasunaga, M., Harada, M., Hayashi, T., Kato, Y., & Matsumura, Y. (2014). Effect of combined treatment with the epirubicin-incorporating micelles (NC-6300) and 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016) on a human gastric cancer model. *International journal of cancer*, 135(1), 214–223.
- Yamanouchi, K., Kuba, S., Sakimura, C., Morita, M., Kanetaka, K., Kobayashi, K., Takatsuki, M., Hayashida, N., & Eguchi, S. (2017). The Relationship Between Peripheral Neuropathy Induced by Docetaxel and Systemic Inflammation-based Parameters in Patients with Breast Cancer. *Anticancer research*, 37(12), 6947–6951.

- Yang, C., Mi, X., Su, H., , Yang, J., , Gu, Y., , Zhang, L., , Sun, W., , Liang, X., , & Zhang, C., (2019). GE11-PDA-Pt@USPIOs nano-formulation for relief of tumor hypoxia and MRI/PAI-guided tumor radio-chemotherapy. *Biomaterials science*, 7(5), 2076–2090.
- Yang, Y., Yu, Y., Chen, H., Meng, X., Ma, W., Yu, M., Li, Z., Li, C., Liu, H., Zhang, X., Xiao, H., & Yu, Z. (2020). Illuminating Platinum Transportation while Maximizing Therapeutic Efficacy by Gold Nanoclusters *via* Simultaneous Near-Infrared-I/II Imaging and Glutathione Scavenging. *ACS nano*, 14(10), 13536–13547.
- Yang, Y., Yu, Y., Chen, H., Meng, X., Ma, W., Yu, M., Li, Z., Li, C., Liu, H., Zhang, X., Xiao, H., & Yu, Z. (2020). Illuminating Platinum Transportation while Maximizing Therapeutic Efficacy by Gold Nanoclusters *via* Simultaneous Near-Infrared-I/II Imaging and Glutathione Scavenging. *ACS nano*, 14(10), 13536–13547.
- Yehia, R., Saleh, S., El Abhar, H., Saad, A. S., & Schaalán, M. (2019). L-Carnosine protects against Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in colorectal cancer patients: A perspective on targeting Nrf-2 and NF- $\kappa$ B pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 365, 41–50.
- Yi, J. M., Shin, S., Kim, N. S., & Bang, O. S. (2019). Ameliorative effects of aqueous extract of Forsythiae suspensa fruits on oxaliplatin-induced neurotoxicity in vitro and in vivo. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 339.
- Yokoo, S., Yonezawa, A., Masuda, S., Fukatsu, A., Katsura, T., & Inui, K. (2007). Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology*, 74(3), 477–487.
- Yonezawa, A., & Inui, K. (2011). Organic cation transporter OCT/SLC22A and H(+)/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochemical pharmacology*, 81(5), 563–568.
- Yoon, S. Y., Robinson, C. R., Zhang, H., & Dougherty, P. M. (2013). Spinal astrocyte gap junctions contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *The journal of pain*, 14(2), 205–214.
- Yuan, A., Xia, F., Bian, Q., Wu, H., Gu, Y., Wang, T., Wang, R., Huang, L., Huang, Q., Rao, Y., Ling, D., Li, F., & Gao, J. (2021). Ceria Nanozyme-Integrated Microneedles Reshape the Perifollicular Microenvironment for Androgenetic Alopecia Treatment. *ACS nano*, 15(8), 13759–13769.
- Zhang, H., Li, Y., de Carvalho-Barbosa, M., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Albrecht, P. J., & Dougherty, P. M. (2016). Dorsal Root Ganglion Infiltration by Macrophages Contributes

to Paclitaxel Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *The journal of pain*, 17(7), 775–786.

Zhang, R., Song, X., Liang, C., Yi, X., Song, G., Chao, Y., Yang, Y., Yang, K., Feng, L., & Liu, Z. (2017). Catalase-loaded cisplatin-prodrug-constructed liposomes to overcome tumor hypoxia for enhanced chemo-radiotherapy of cancer. *Biomaterials*, 138, 13–21.

Zhang, X., Guan, Z., Wang, X., Sun, D., Wang, D., Li, Y., Pei, B., Ye, M., Xu, J., & Yue, X. (2020). Curcumin Alleviates Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathic Pain through Inhibiting Oxidative Stress-Mediated Activation of NF- $\kappa$ B and Mitigating Inflammation. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 43(2), 348–355.

Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2012). Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Molecular pain*, 8, 55.

Zhao, W., Wang, W., Li, X., Liu, Y., Gao, H., Jiang, Y., and Yang, Y. (2019), Peripheral neuropathy following bortezomib therapy in multiple myeloma patients: association with cumulative dose, heparinase and TNF $_{\alpha}$ , *Annals of Hematology*, 98(12), 2793-2803.

Zhao, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, G., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2019). Electroacupuncture enhances antioxidative signal pathway and attenuates neuropathic pain induced by chemotherapeutic paclitaxel. *Physiological research*, 68(3), 501–510.

Zheng, H., Xiao, W. H., Bennett, G. J. (2012), Mitotoxicity and bortezomib-induced chronic painful peripheral neuropathy, *Experimental Neurology*, 238(2), 225-234.

Zheng, Y., Sun, Y., Yang, Y., Zhang, S., Xu, T., Xin, S. and Zhang, X. (2019), GATA3-dependent epigenetic upregulation of CCL21 is involved in the development of neuropathic pain induced by bortezomib, *Molecular Pain*, 15.

Zhu, Y., Liu, C., Nadiminty, N., Lou, W., Tummala, R., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2013). Inhibition of ABCB1 expression overcomes acquired docetaxel resistance in prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 12(9), 1829–1836.