

# ***In vivo* imaging della proliferazione cellulare per l'analisi dinamica degli effetti indesiderati di trattamenti farmacologici**

N. Rizzi<sup>1</sup>, I. Manni<sup>2</sup>, C. Vantaggiato<sup>3</sup>, G.A. Delledonne<sup>3</sup>, M.P. Gentileschi<sup>2</sup>, M. Marinovich<sup>3</sup>, A. Maggi<sup>3</sup>, G. Piaggio<sup>2</sup>, P. Ciana<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro di Eccellenza per lo studio delle Malattie Neurodegenerative (CEND) e Polo Veterinario di Lodi, Lodi

<sup>2</sup>Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Regina Elena, Roma.

<sup>3</sup>Centro di Eccellenza per lo studio delle Malattie Neurodegenerative (CEND) e Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari (DISFEB), Università degli Studi di Milano

**Introduzione.** L'imaging non invasivo è un nuovo strumento di analisi farmacologica e tossicologica che fornisce una misurazione diretta dell'attività di xenobiotici nella dimensione spazio/temporale. Questa nuova tecnologia consente di identificare in quale organo e con quale tempistica un effetto indesiderato si manifesta in conseguenza ad un trattamento farmacologico, e permette di valutare se tale effetto sia o non sia reversibile. Nonostante queste interessanti opportunità, l'applicazione dell'imaging nell'ambito tossicologico è correntemente impedita dalla limitata disponibilità di marcatori appropriati.

**Scopo del lavoro.** Lo scopo di questo studio è stato quello di dimostrare che gli effetti indesiderati di un farmaco possano essere rilevati e misurati attraverso l'imaging di marcatori della proliferazione cellulare associata alla rigenerazione ed alla risposta immunitaria provocata da un evento tossico.

**Metodi.** Lo studio è stato condotto sul topo reporter *repTOP<sup>TM</sup>mitoIRE*, un animale geneticamente modificato che porta nel suo genoma un gene reporter (luciferasi) la cui espressione è diretta da un promotore attivo solamente nelle cellule proliferanti. In questo animale è possibile misurare eventi proliferativi attraverso l'imaging della bioluminescenza emessa dai tessuti che esprimono la luciferasi. La metodologia è stata inizialmente validata sperimentalmente misurando la bioluminescenza indotta da trattamenti con agenti genotossici (es. dimetilbenzantracene) o con agenti fisici (raggi X). Una volta validato, il sistema sperimentale è stato applicato allo studio degli effetti collaterali di tre noti agenti chemioterapici: il taxotere (un inibitore della polimerizzazione dei microtubuli), il 5-fluorouracile (un anti-metabolita) ed il bortezomib (un inibitore del proteasoma).

**Risultati.** I risultati ottenuti dimostrano che il sistema sviluppato è in grado di rilevare e misurare la riduzione della proliferazione delle cellule del midollo osseo in conseguenza al trattamento con taxotere o con 5-fluorouracile, due agenti farmacologici noti per la loro attività mielosoppressiva; l'analisi di bioluminescenza condotta sugli stessi animali lungo un arco di tempo di circa due mesi, ha inoltre evidenziato la completa reversibilità dell'effetto mielotossico con il ripristino dei livelli iniziali di bioluminescenza nel midollo. Inoltre, l'imaging di bioluminescenza ha permesso di rilevare e misurare anche gli effetti indesiderati indotti dal trattamento con bortezomib e taxotere su tessuti con basso indice mitotico quali il sistema gastro-intestinale ed i polmoni, grazie alla proliferazione dovuta alla rigenerazione tissutale ed alla reazione immunitaria associata al danno tissutale.

**Conclusione.** La metodologia sviluppata fornisce una misura attendibile dell'effetto tossico sistemico provocato da un trattamento farmacologico e consente di seguire tale effetto nel corso del tempo. L'analisi condotta con le metodologie di imaging è rispettosa dei principi delle 3R poiché permette di ridurre fino ad 1/10 il numero di animali utilizzati nella sperimentazione preclinica rispetto all'analisi condotta con metodologie classiche e riduce la manipolazione dell'animale al semplice scatto di una fotografia.

Nell'ultimo decennio sono stati sviluppati alcuni radiotraccianti utilizzabili per l'imaging della proliferazione tramite PET (Positron Emission Tomography) che sono correntemente utilizzati nella pratica clinica, come ad esempio la 18F-Fluorotimidina. Il nostro studio suggerisce una nuova applicazione di questo tipo di radiotraccianti per la valutazione degli effetti indesiderati nello sviluppo clinico del farmaco o durante il monitoraggio di terapie farmacologiche nell'uomo.

**Ringraziamenti.** Lo studio è stato finanziato dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC)IG-2011 n. 11903 e dalla fondazione CARIPLO progetto n. 2009-2439.