



Università degli Studi di Firenze  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale

Scuola di Dottorato in Scienze e Tecnologie  
Biomolecolari e Morfologiche  
Dottorato di Ricerca in Morfologia e Morfogenesi Umana  
XXIII ciclo  
Settore Disciplinare BIO/16

***IL DOLORE NEUROPATICO: MODIFICAZIONI  
MORFOLOGICHE E FUNZIONALI DEL SISTEMA  
NERVOSO IN MODELLI DI RATTO***

Dott.ssa Laura Bonaccini

Coordinatore  
Prof.ssa Sandra Zecchi Orlandini

Tutor  
Prof. Paolo Pacini

*Tutti gli uomini sanno dare consigli e conforto al dolore che non provano.*

*William Shakespeare*

*I miei ringraziamenti vanno ai miei colleghi del Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale - Sezione Anatomia Umana e del Dipartimento di Farmacologia di Firenze.*

*Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Alessandra Pacini e al Dott. Lorenzo Di Cesare Mannelli che mi hanno seguito durante questi tre anni.*

*Infine, voglio ringraziare di tutto cuore la mia famiglia, per avermi sostenuto e per volermi bene.*

*Laura Bonaccini*

# **Capitolo 1**

## **Il sistema algico**

Secondo lo Zingarelli il dolore è una sensazione di sofferenza fisica, che rappresenta il mezzo con cui l'organismo segnala un danno tissutale. La IASP (International Association for the Study of Pain - 1986) e l'O.M.S. (Organizzazione Mondiale della Sanità) definiscono il dolore come "...un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno".

In concreto il dolore non può essere descritto veramente come un fenomenosensoriale, bensì deve essere visto come la composizione di diverse parti: una parte percettiva (la nocicezione) che costituisce la modalità sensoriale che permette la ricezione ed il trasporto al sistema nervoso centrale di stimoli potenzialmente lesivi per l'organismo, e di una parte esperienziale (quindi del tutto privata, la vera e propria esperienza del dolore) che è lo stato psichico collegato alla percezione di una sensazione spiacevole.

Secondo una classificazione di tipo patogenetica si riconoscono tre forme di dolore: il dolore idiopatico, il dolore nocicettivo e il dolore neuropatico.

Il dolore idiopatico ha origine sconosciuta e, per estensione, si può considerare il dolore il cui livello di intensità riportata dal paziente non abbia una corrispondente immediata motivazione organica.

Il dolore nocicettivo scaturisce dalla messa in atto di una serie di meccanismi mediante i quali lo stimolo lesivo è percepito a livello periferico dai nocicettori (terminazioni nervose periferiche) e trasmesso al sistema nervoso centrale e quindi inquadrato (in termini di localizzazione ed intensità), potenziato o inibito e infine memorizzato.

Il dolore neuropatico costituisce una forma particolare di dolore in cui il danno, spesso irreversibile, colpisce proprio il sistema percettivo alterando il sistema nervoso periferico o il sistema nervoso centrale.

Da questi primi rudimenti si capisce come il dolore non sia dunque un fenomeno direttamente osservabile o misurabile, ma l'insieme di elementi sensoriali e affettivi che ha una relazione variabile con il tessuto danneggiato [Merskey e Bogduk, 1994]. Proprio per questa ragione, la conoscenza della nocicezione e della componente somatica è fondamentale nella comprensione del dolore. Solo successivamente ad un evento che viene percepito dall'organismo come doloroso, vengono attivati i sistemi predisposti alla modulazione del dolore che sono pressoché identici fra gli individui e le specie, ed è su questi che si può intervenire per modificare la risposta agli stimoli nocivi.

L'insieme morfofunzionale che, per comodità descrittiva, definiamo "sistema algico" è costituito di due sezioni: l'apparato nocicettivo e l'apparato antinocicettivo. L'interazione fra i due apparati attua la modulazione della percezione dolorosa, facendo in modo che determinati stimoli evocano il dolore e graduandone l'intensità.

## **Apparato nocicettivo**

L'apparato nocicettivo è costituito da: i nocicettori periferici, da un primo neurone, dalla giunzione fra primo e secondo neurone (o DREZ – Dorsal Root Entry Zone) e da un secondo, terzo e quarto neurone (che danno origine alle vie lemniscali ed extralemniscali).

### **Nocicettori periferici**

Le informazioni nocicettive vengono raccolte da recettori "specializzati" detti nocicettori [Sherrington, 1906]. Questi ultimi sono terminazioni nervose specializzate nel riconoscere stimoli in grado di produrre potenzialmente o concretamente un danno tissutale. Tali stimoli sono tipicamente di natura meccanica, chimica o termica.

Nell'esperienza comune, nocicettori che rispondono a stimoli meccanici sono quelli che ci fanno provare dolore quando il nostro corpo subisce una pressione meccanica eccessiva. I nocicettori chimici rispondono invece a sostanze che possono provocare reazioni tali da ledere i tessuti, ad esempio gli acidi. I nocicettori termici ci avvisano del pericolo di ustioni o congelamento.

Va inoltre precisato che non esiste uno “stimolo doloroso di per sé”, vale a dire uno “stimolo specifico” responsabile del dolore. Tutti gli stimoli possono essere dolorosi se sufficientemente intensi e quindi potenzialmente in grado di danneggiare i tessuti. Le terminazioni nervose libere possono raccogliere anche stimoli diversi da quelli nocicettivi per cui non devono essere considerati recettori “specifici” per il dolore ma recettori “specializzati” a raccogliere le informazioni nocicettive.

Sulla base del tipo di stimolo i nocicettori possono essere classificati come descritto di seguito.

### **Nocicettori unimodali meccanici $A\delta$**

I nocicettori unimodali meccanici  $A\delta$  (meccanonocicettori) rispondono soprattutto a stimoli meccanici intensi, specie se provocati da oggetti appuntiti o taglienti, capaci di ledere i tessuti; non rispondono alla stimolazione meccanica non nociva ed agli stimoli chimici, mentre rispondono a stimoli freddi ( $<0^{\circ}\text{C}$ ) [Simone et al., 1997]. Tali recettori sono collegati alle fibre mieliniche di piccolo diametro  $A\delta$  e vanno distinti dai meccanorecettori a bassa soglia di eccitazione collegati alle fibre mieliniche di grande diametro  $A\beta$ . Questi ultimi rispondono sia alle stimolazioni meccaniche di bassa intensità (tattili e pressorie) che a quelle di alta intensità (nocicettiva), mentre i meccanonocicettori rispondono solo agli stimoli dolorosi.

### **Nocicettori meccano-termici $A\delta$**

I nocicettori meccano-termici  $A\delta$  (AMH) rispondono a stimoli nocivi meccanici e termici (sia caldi che freddi) e si possono suddividere in nocicettori di tipo I e di tipo II. AMHs sono considerati di tipo I se la loro soglia di risposta a stimoli termici è  $>51^{\circ}\text{C}$  e se si sensitizzano al calore dopo forte e prolungata sollecitazione ( $53^{\circ}\text{C}$  per 30 secondi). Nocicettori con soglia di risposta  $<51^{\circ}\text{C}$  sono classificati come AMH di tipo II [Simone et al., 1997]. Collegati alle fibre  $A\delta$ , si ritiene che essi siano i nocicettori che segnalano la “first pain sensation”.

### **Nocicettori polimodali C meccanici-termici-chimici**

I nocicettori polimodali sono collegati alle fibre C amieliniche e rispondono a stimoli meccanici, termici e chimici di alta intensità [Torebjork e Hallin 1974 e 1976; Van Hees e Gybels, 1981; Torebjork et al., 1984]. La soglia di eccitazione termica è compresa fra  $38$  e  $50^{\circ}\text{C}$  [Campero et al., 1996]. La risposta dei nocicettori polimodali può diminuire o aumentare a seconda della modalità di stimolazione. In particolare, la risposta si riduce quando lo stesso stimolo è applicato ripetitivamente a intervalli minori di 10 minuti che è il tempo che occorre per il completo recupero, altrimenti essa aumenta progressivamente durante l'applicazione dello stimolo [Tillman, 1992]. Si instaura cioè una “sensibilizzazione” che contribuisce a scatenare uno stato iperalgico caratteristico di danno tissutale.

### **Nocicettori termici e chimici C**

Sono stati identificati nocicettori C (“mechano insensitive” CMi) che non rispondono agli stimoli meccanici ma solo a stimoli chimici o termici [Schmidt et al., 2002]. Comunemente, come si dirà fra poco parlando del fenomeno del doppio dolore, si ritiene che i nocicettori  $A\delta$  siano in grado di localizzare esattamente lo stimolo nocicettivo e che i nocicettori C non siano in grado di fare altrettanto. I nocicettori C, infatti, sono classicamente considerati responsabili del dolore mal localizzato. Questo convincimento è contraddetto da un recente studio che ha dimostrato un errore di localizzazione per gli stimoli termici e chimici intorno ai 10 millimetri, in presenza di un blocco delle fibre A ottenuto

con la compressione nervosa [Koltzenburg et al., 1993]. Quindi, contrariamente a quanto comunemente ritenuto, anche le fibre C consentirebbero un'accurata localizzazione dello stimolo nocicettivo.

Ricordiamo infine che i nocicettori sono costituiti dalle terminazioni periferiche di assoni di neuroni di I ordine, o primi neuroni sensitivi (cellule a T o pseudounipolari), il cui corpo cellulare è situato in un ganglio annesso alle radici posteriori del midollo spinale o a un nervo cranico.

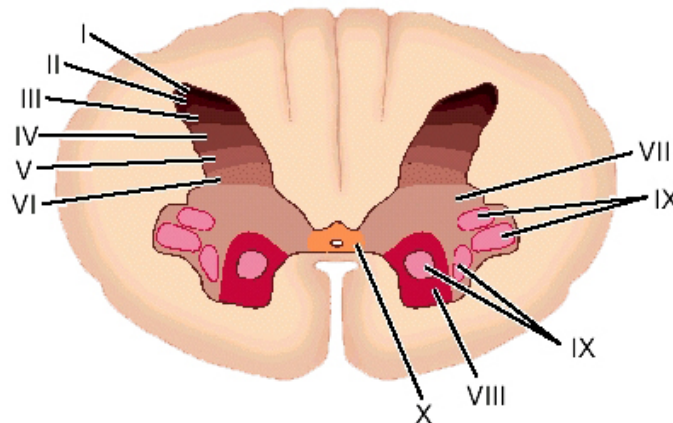
La fibra periferica del primo neurone sensitivo consiste di fibre tattili e propriocettive A $\beta$  di fibre nocicettive A $\delta$  (poco mielinizzate e con una velocità media di conduzione dello stimolo di 15 metri/secondo) e di fibre C (amieliniche, a lenta conduzione continua e con una velocità media di conduzione dello stimolo di 1 metro/secondo) [Bonica, 1990]. Poiché le fibre A $\delta$  conducono lo stimolo 15 volte più velocemente delle C, si verifica il cosiddetto "fenomeno del doppio dolore" [Raja et al., 1999]. Questo consiste nel fatto che uno stimolo nocicettivo applicato alla periferia è avvertito come due distinte percezioni separate da un breve intervallo: la prima ("primo dolore") consiste di una sensazione puntoria ben localizzata che è avvertita solo a livello della cute e delle mucose e non supera la durata dello stimolo, la seconda ("secondo dolore") consiste di una sensazione diffusa e mal localizzata che è avvertita sia sulla cute che nei tessuti più profondi e supera la durata dello stimolo.

Infine, è importante sottolineare che il secondo neurone del sistema algico può essere rappresentato da una cellula, particolarmente presente a livello delle corna posteriori del midollo spinale, detto neurone ad ampio range dinamico (Wide Dynamic Range - WDR neuron) o, più semplicemente, neurone "convergente". Tale neurone fu identificato per la prima volta da Mendell nel 1960 ed ha la caratteristica di rispondere a tutti i tipi di stimoli afferenti siano essi di tipo termico, meccanico o pressorio. Quando tali stimoli aumentano di intensità al punto da diventare dolorosi, i neuroni WDR aumentano la loro frequenza di scarica.

La zona di ingresso del primo neurone afferente nel sistema nervoso centrale, nota come DREZ, è la regione dove avviene la trasmissione sinaptica tra il primo



e il secondo neurone sensitivo che si trova localizzato a livello del sistema nervoso centrale (SNC), cioè nelle corna posteriori del midollo spinale o nella



**Figura 1** -Rappresentazione schematica dei territori appartenenti a dieci lamine grigie come proposto da Redex nel 1952. Le dieci lamine risultano visibili in una sezione trasversale del midollo spinale condotta, in questo caso, a livello del rigonfiamento lombare.

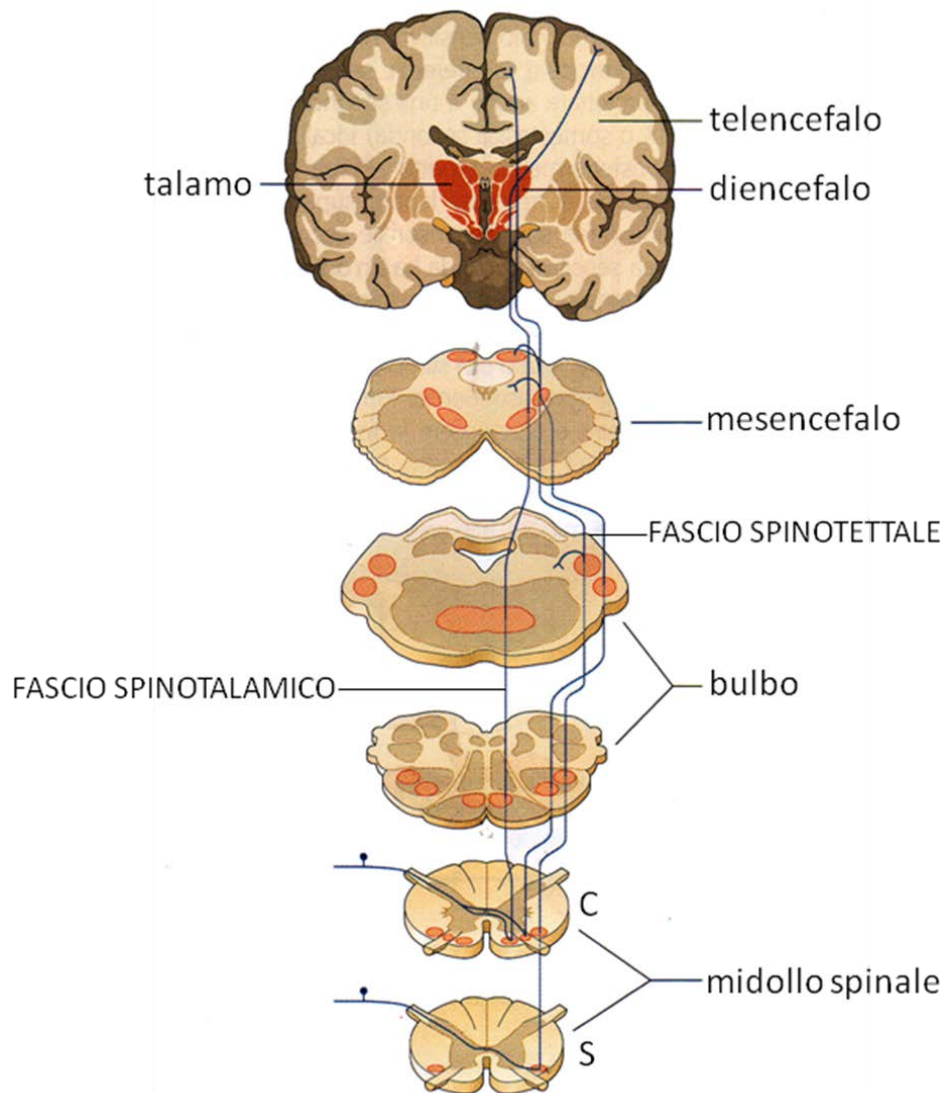
sostanza grigia del tronco encefalico. Le fibre che trasportano i vari tipi di stimoli mettono capo a neuroni che sono localizzati in lamine diverse delle corna posteriori (Fig. 1).

Tali neuroni danno successivamente origine a fibre dei sistemi ascendenti che conducono le informazioni nocicettive al talamo e sono costituiti da tre gruppi anatomicamente distinti: 1) la via nocicettiva afferente primaria o lemnisco spinale; 2) il sistema ascendente multisinaptico o extralemniscale; 3) il gruppo delle vie nocicettive afferenti “accessorie” [[www.curadeldolore.it/area\\_materiali/RIMI-2.PPT](http://www.curadeldolore.it/area_materiali/RIMI-2.PPT)].

## VIE NOCICETTIVE

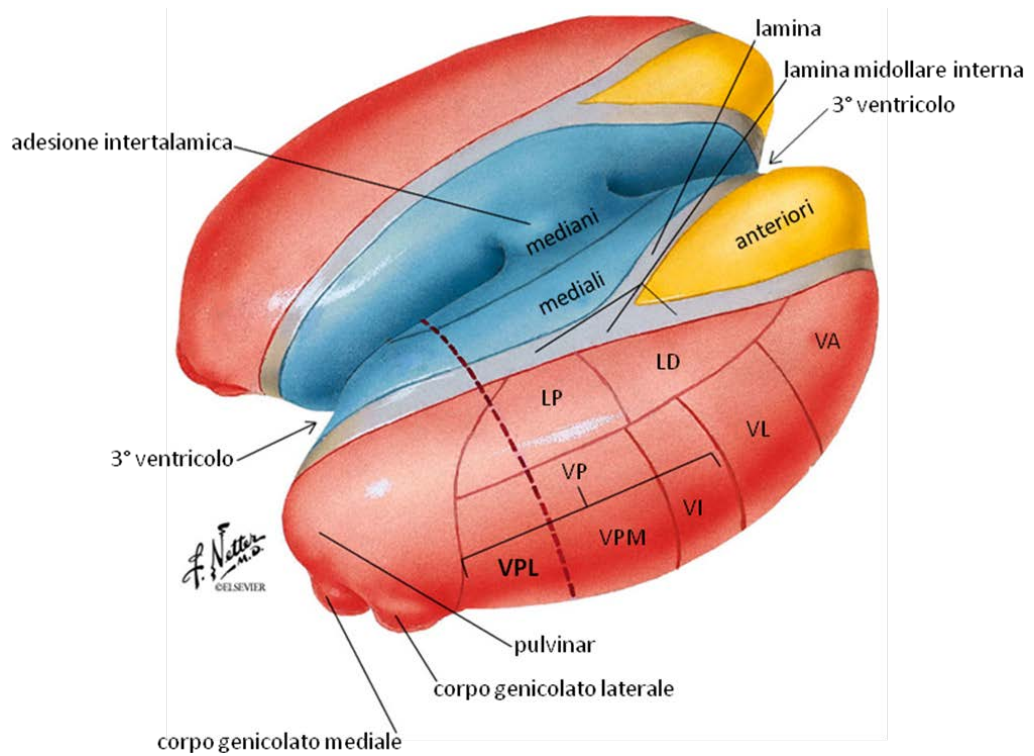
La via nocicettiva afferente primaria, o lemnisco spinale, è costituita dai fasci spinotalamico laterale, spinomesencefalico e spinoreticolare [Brooks e Tracey, 2005]. Questi fasci sono ben riconoscibili gli uni dagli altri a livello del tronco encefalico, mentre non sono più identificabili come entità anatomiche distinte a

livello del midollo spinale, dove le fibre decorrono frammiste le une alle altre. Per tale ragione si è soliti fare riferimento a tali vie col termine di “lemnisco spinale” o quello di “sistema anterolaterale” [Margaria e Gollo, 2001] (Fig. 2).

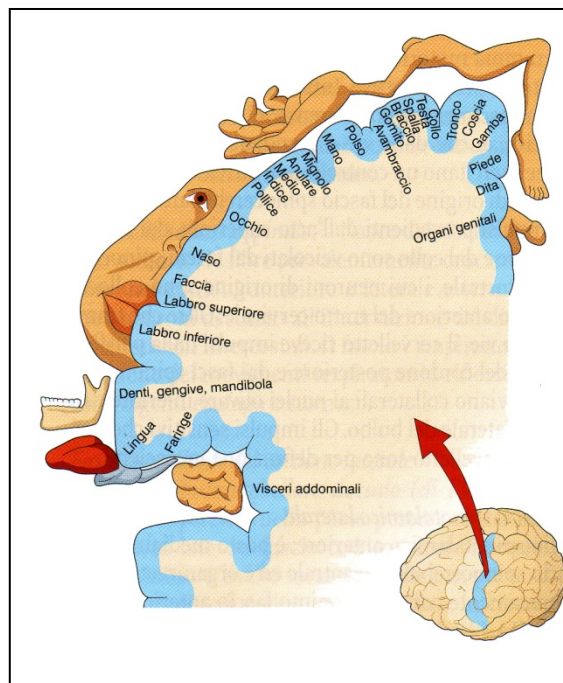


**Figura 2** - Decorso delle vie spinotalamiche e spinotettali che formano il lemisco spinale. Le fibre, originate a vari livelli del midollo spinale (C, segmento cervicale; S, segmento sacrale) si incrociano all'origine decorrendo nell'opposto antimerico.

Il fascio spinotalamico laterale è costituito dai fasci neo- e paleo-spinotalamico che originano dal corno dorsale del midollo e, metamero per metamero, decussano nella commessura bianca anteriore per portarsi nel quadrante anterolaterale del lato opposto (vedi Fig. 2). Il fascio neospinotalamico è posto lateralmente, ha i suoi neuroni di origine nella zona marginale (lamina I) [Ferrington et al., 1987] e nel nucleo proprio (lamina V) [Hunt e Mantyh, 2001], termina nel nucleo ventroposterolaterale (VPL) del talamo e costituisce la via oligosinaptica della componente epicritica del dolore (Fig. 3). Tale fascio ha origine filogenetica recente ed una precisa organizzazione somatotopica. (Fig. 4).



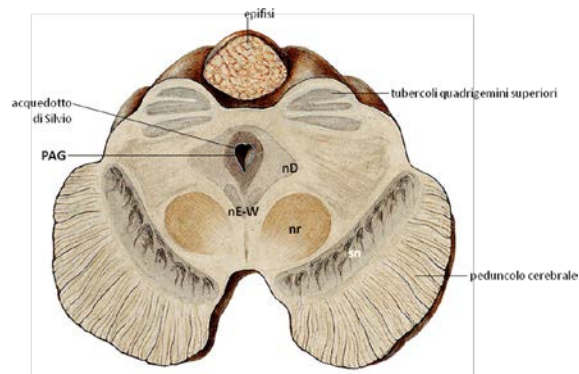
**Figura 3** - Principali raggruppamenti nucleari del talamo: LD, laterodorsale; LP, lateroposteriore; VA, ventrale anteriore; VI, ventrale intermedio; VL, ventrale laterale; VP, ventrale posteriore; VPM, ventrale postero mediale; VPL, ventrale postero laterale.



**Figura 4** – Area sensitiva della corteccia telencefalica localizzata nella circonvoluzione parietale ascendente. Ad ogni punto della della corteccia può essere associato una determinata parte del corpo. Essendo l’area della corteccia riservata a ogni parte del corpo proporzionale alla precisione con cui questa viene controllata (cioè innervata), il disegno delle parti del corpo assume una forma caricaturale detta OMUNCOLO.

Il fascio paleospinotalamico è la via filogeneticamente più antica e rappresenta il contingente di fibre più numeroso del fascio spinotalamico laterale; esso risulta localizzato medialmente nel quadrante anterolaterale, avendo i suoi neuroni di origine nei nuclei proprio e intermedio, e conduce la componente protopatica del dolore. Le sue fibre costituiscono una via polisinaptica che termina in parte su vari nuclei reticolari (che, a loro volta, proiettano sui nuclei intralaminari del talamo mediale) e in parte direttamente sul talamo nei medesimi nuclei.

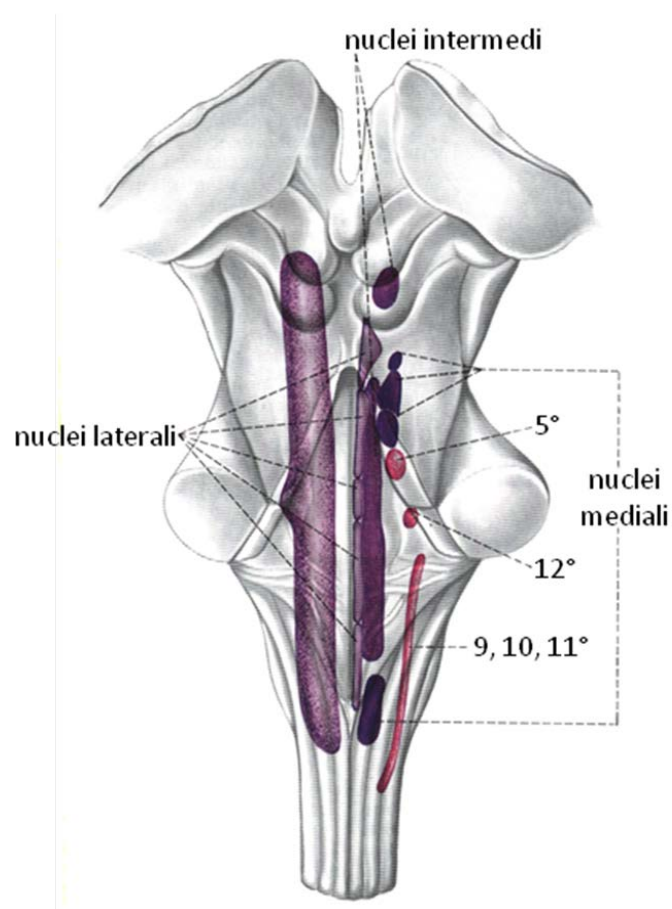
Il fascio spinomesencefalico è una via multisinaptica costituita da neuroni il cui soma è localizzato nelle lamine I e V. Due terzi delle fibre che lo costituiscono decussano sulla linea mediana per salire nei quadranti anterolaterale e dorsolaterale dei cordoni del midollo spinale fino al mesencefalo, dove terminano nella sostanza grigia periacqueduttale (PAG), nei tubercoli quadrigemini superiori e nei nuclei di Darkschewitsch e di Edinger-Westphal (Fig. 5).



**Figura 5** – Sezione trasversale di mesencefalo condotta all'altezza dei tubercoli quadrigemini superiori. PAG, grigio periacqueduttale; sn, sostanza nera di Sommering; nr, nucleo rosso; nD, nucleo di Darkschewitsch; nE-W, nucleo di Edinger-Westphal.

Da questi distretti le fibre proiettano poi al talamo mediale. Dal punto di vista funzionale, il fascio spinomesencefalico conduce stimoli nocicettivi epicritici (localizzazione e riconoscimento dello stimolo nocicettivo come doloroso) e protopatici (riconoscimento dell'intensità del dolore). Il collegamento di questa via con la PAG ha lo scopo di attivare i sistemi discendenti inibitori [Margaria e

Il fascio spinoreticolare ha le cellule di origine nelle lamine VII e VIII (nucleo intermedio) del midollo spinale, frammiste alle cellule di origine del fascio paleospinotalamico e del sistema ascendente multisinaptico. Queste cellule emettono fibre di piccolo calibro che, latrici di stimoli nocicettivi protopatici, costituiscono il 20% del lemnisco spinale; esse, in parte decussandosi sulla linea mediana e in parte ascendendo omolateralmente, decorrono nella parte più mediale del lemnisco spinale e terminano su vari nuclei reticolari e sulla PAG mesencefalica (Fig. 6).



**Figura 6** – Localizzazione della sostanza reticolare lungo l'intera callotta del tronco encefalico. I nuclei che ne fanno parte vengono suddivisi in tre colonne: *nuclei mediani* (nuclei del rafe), disposti centralmente, *nuclei mediali*, che occupano circa i due terzi della formazione reticolare *enuclei laterali* che attraversano sia il bulbo che il ponte. 5°, 12°, 9°, 10° e 11°, nuclei dei nervi encefalici corrispondenti.

A loro volta, i nuclei reticolari cui fanno capo le fibre del fascio spinoreticolare proiettano sul talamo mediale [Margaria e Gollo, 2001].

Un'ulteriore via nocicettiva centrale è la via extralemniscale o sistema ascendente multisinaptico, costituita da fibre propriospinali (fascicoli propri), dalla formazione reticolare e dalle connessioni reticolo-ipotalamo-talamo-limbiche. Il sistema ascendente multisinaptico consta di una catena di brevi neuroni che, collegati in polisinapsi longitudinali, hanno il corpo cellulare nella parte mediale delle lamine più profonde del corno dorsale del midollo e nella lamina X. Queste cellule ricevono l'input da nocicettori profondi, particolarmente dalle strutture mediane del corpo, e inviano brevi assoni che, percorsi uno o due metameri, rientrano nelle medesime lamine ad un livello superiore per collegarsi ad altri neuroni che ripetono lo stesso schema anatomico e proiettano infine sulla formazione reticolare troncale [Margaria e Gollo 2001]. Da questa sede, la via extralemniscale proietta sui corpi mammillari da dove origina il fascio mammillotalamico, sul sistema limbico attraverso il fascio prosencefalico mediale (Medial Forebrain Bundle –MFB) e sui nuclei intralaminari del talamo.

## **VIE NOCICETTIVE ACCESSORIE**

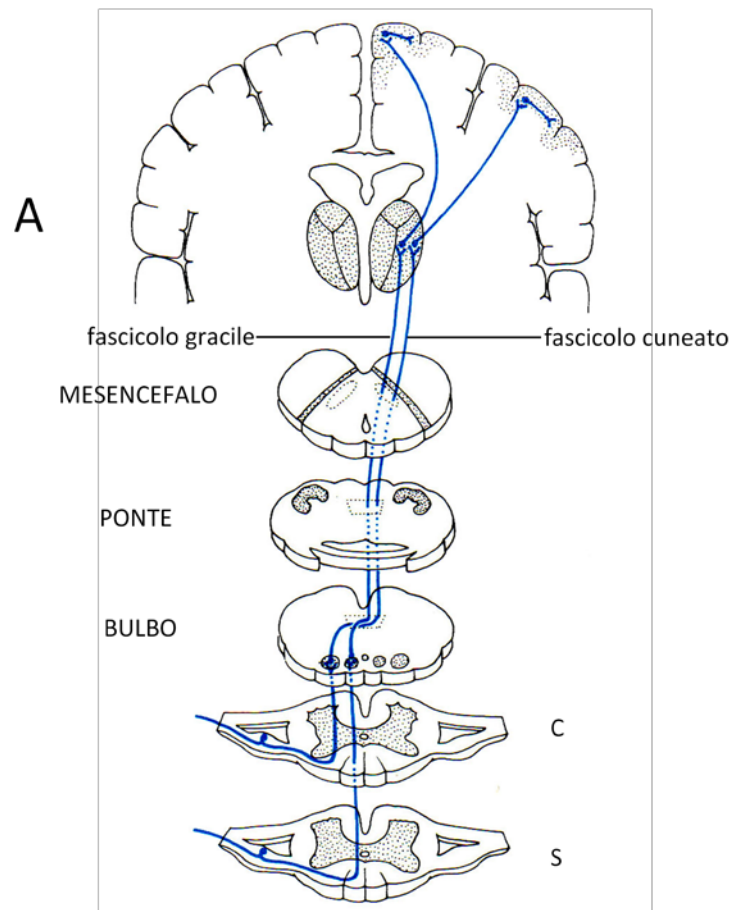
In particolari situazioni il dolore può essere condotto da vie alternative. Tra queste si riconoscono le seguenti vie.

## **VIE LEMNISCALI**

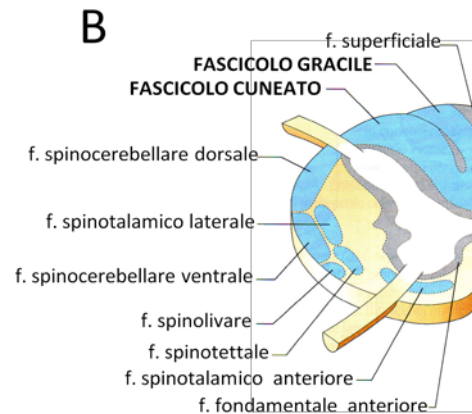
Il maggior contingente delle fibre dei cordoni posteriori è costituito dai prolungamenti centripeti dei neuroni di primo ordine che hanno il pirenoforo nel ganglio della radice dorsale e veicolano informazioni tattili epicritiche e propriocettive coscienti, costituendo i fascicoli gracile, disposto medialmente, e cuneato posto lateralmente. Il fascicolo gracile contiene fibre ascendenti che provengono da gangli sacrali, lombari e toracici inferiori; il fascicolo cuneato è formato da fibre che derivano dai restanti gangli più craniali. La via nervosa nel suo complesso consta di un proto neurone gangliare che dà origine alle fibre dei fascicoli gracile e cuneato; queste risalgono omolateralmente fino al bulbo, dove



terminano nei nuclei omonimi. Dal secondo neurone bulbare, le fibre si portano in direzione vetro mediale con il nome di fibre arciformi interne e si incrociano quindi, sulla linea mediana, costituendo il LEMNISCO MEDIALE. Con tale nome il complesso delle fibre risale, attraverso il ponte ed il mesencefalo, per giungere al nucleo ventroposterolaterale del talamo, dove si trova il terzo neurone. Attraverso il braccio posteriore della capsula interna, i neuroni talamici proiettano tali stimoli alle aree sensitive della corteccia telencefalica (quarto neurone) (Fig. 7).







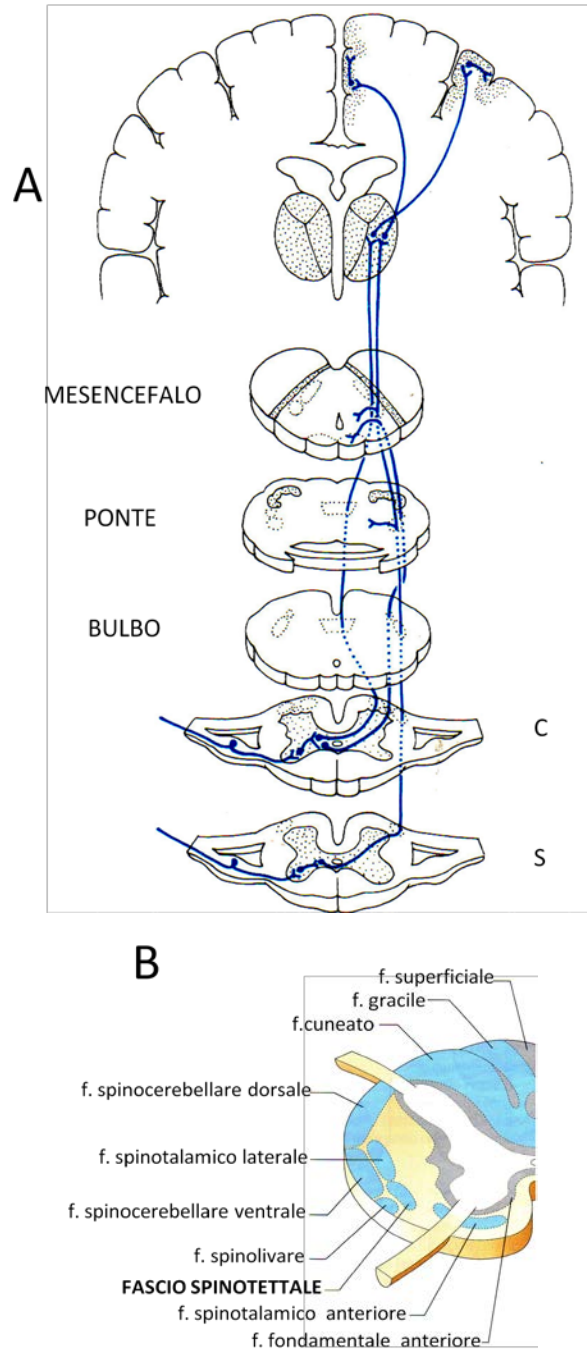
**Figura 7** - Via della sensibilità tattile epicritica e propriocettiva cosciente. In A viene indicato il decorso dell'intera via che origina da un neurone gangliare e subisce un primo arresto nei nuclei del fascicolo gracile e cuneato del bulbo, un secondo arresto nel nucleo ventroposterolaterale del talamo, per proiettarsi infine alla corteccia postcentrale. Il tratto bulbo-talamico crociato costituisce il lemnisco mediale. In B sono indicati i principali fasci di proiezione ascendenti nei cordoni della sostanza bianca del midollo spinale (visione in sezione trasversa). In neretto è riportata la posizione dei fascicoli gracile (mediale) e cuneato (laterale).

A tutti i livelli, in questa via, è possibile individuare una rappresentazione somatotopica che si mantiene anche nella circonvoluzione post-centrale, che rappresenta l'area corticale somestesica (vedi Fig. 4). Resta infine da sottolineare che le fibre dei fascicoli gracile e cuneato sono anche vere e proprie fibre di tipo nocicettivo che, come neuroni di secondo ordine con pirenoforo nel corno dorsale del midollo, salgono omolateralmente, davanti al fascio degli afferenti primari, per raggiungere i nuclei gracile e cuneato nel bulbo. Le fibre efferenti da questi nuclei, attraversano la linea mediana e, con il lemnisco mediale, raggiungono il nucleo ventroposterolaterale del talamo.

### **FASCIO SPINO-TETTALE**

Il fascio spino-tettale è diretto al mesencefalo ed è costituito da fibre che originano da pirenofori della sostanza gelatinosa di Rolando e della colonna posteriore, in prevalenza dal suo nucleo ventrolaterale. Da tale origine le fibre si portano in avanti e medialmente per incrociarsi attraverso la commessura bianca e poi ascendere verso il centro suddetto, situandosi tra tra il fascio spino-

cerebellare dorsale lateralmente ed i fascicoli rubro-spinale e vestibolo-spinale medialmente. Il fascicolo termina nei tubercoli quadrigemini superiori essendo latore di eccitamenti dolorifici cutanei ed anche di altre forme di (Fig. 8).



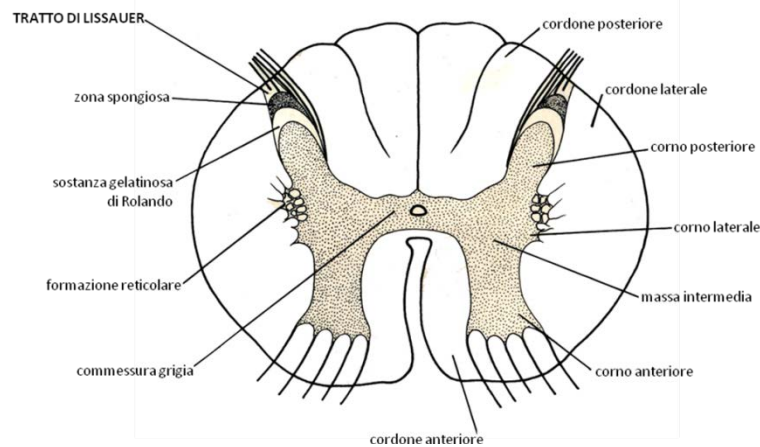
**Figura 8**—Decorso schematico delle vie del lemnisco spinale. In A sono illustrate le vie spino talamica e spino tettale. In B sono indicati i principali fasci di proiezione ascendente nei cordoni della sostanza bianca del midollo spinale (visione in sezione trasversa). In neretto è riportata la posizione del fascio spino tettale.

### **FASCIO SPINO-CERVICALE**

Il fascio spino-cervicale è un'ipotetica via accessoria per la conduzione del dolore epicritico. Esso è ben sviluppato nel gatto dove sembra che il quadrante posterolaterale sia più importante dell'anterolaterale per quanto concerne la conduzione delle informazioni nocicettive e che il fascio spino-cervicale sia l'omologo del fascio neo-spinotalamico nell'uomo. Nell'uomo la presenza del fascio spino-cervicale non è costante e nulla di preciso si sa circa l'origine di queste fibre: la lesione del quadrante postero-laterale provoca, però, la cromatolisi di neuroni del nucleo proprio omolaterale che potrebbero costituire i neuroni di origine di questo fascio. Sembra che il fascio spino-cervicale salga nel funicolo dorsolaterale omolaterale per raggiungere il nucleo cervicale laterale a livello di C1-C2 e che i neuroni di questo nucleo, a loro volta, proiettino controlateralmente nel quadrante anterolaterale del midollo per raggiungere il nucleo ventro-postero-laterale del talamo.

### **TRATTO DI LISSAUER**

Il tratto di Lissauer coincide con la zona terminale di Lissauer che ne costituisce una sezione trasversa; quest'ultima è una piccola area di sostanza bianca, costituita da fibre sottili, a decorso longitudinale collocate nell'intervallo che rimane fra la zona spongiosa (all'apice del corno posteriore) e la superficie del midollo. Il tratto di Lissauer si estende per tutta la lunghezza del midollo continuandosi rostralmente nel tratto spinale del trigemino ed è costituito dalle fibre della divisione laterale della radice dorsale che si biforcano in un ramo ascendente ed uno discendente (ciascuno dei quali emette collaterali dirette al corno dorsale del midollo) e da fibre derivate da neuroni della sostanza gelatinosa che entrano nel tratto di Lissauer e, percorrendovi pochi millimetri, collegano le parti adiacenti della zona periferica del midollo come "interneuroni a circuito locale" (Fig. 9). Ciascuna di queste corte fibre spino-spinali, pur avendo singolarmente un percorso molto breve, contribuisce a formare una via ascendente in quanto si associa ad altre fibre della stessa natura in polisinapsi longitudinali [Margaria e Gollo, 2001].



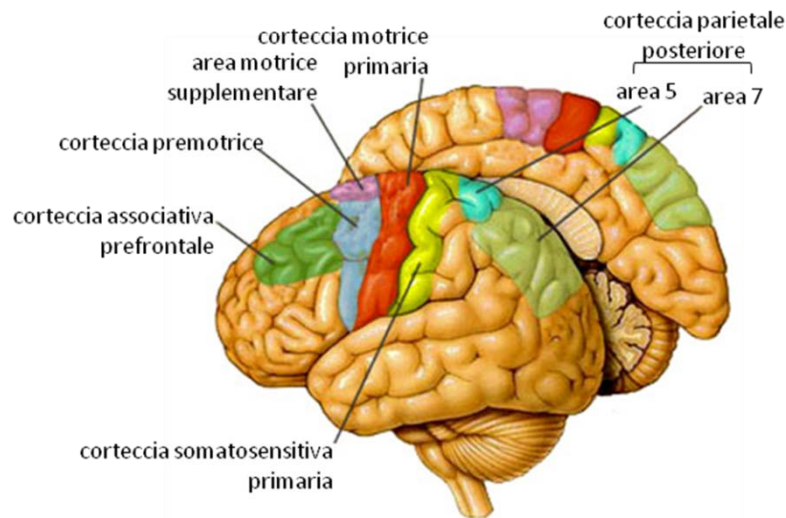
**Figura 9** – Tratto (o fascio) di Lissauer. Formazione costituita dalle fibre afferenti di piccolo diametro prima che queste mettano capo ai neuroni che occupano le corna dorsali del midollo spinale.

Il terzo neurone della catena polisinfaptica ha sede nel talamo sia a livello di nuclei di relay (isotalamo) che di nuclei intralaminari (allotalamo). Entrambi i tipi di nuclei sono in collegamento, quasi sempre reciproco, con la corteccia telencefalica ma, mentre i nuclei di relay rappresentano il centro di trasmissione delle vie ascendenti ad aree più o meno specifiche della corteccia, i nuclei intralaminari si caratterizzano sia per la totale diffusione delle proiezioni corticali, sia per la connessione reciproca coi gangli della base. Tuttavia, anche nell'ambito dei nuclei di relay si possono altresì distinguere nuclei di relay specifici, che proiettano ad aree corticali primarie quali l'area sensitiva primaria, e nuclei di relay non specifici che proiettano alla corteccia cerebrale in maniera più diffusa quali le aree associative dei lobi temporale, parietale e occipitale.

Il nucleo del talamo che connette le vie ascendenti dal midollo spinale con la corteccia sensitiva primaria è il nucleo ventrale posteriore laterale (VPL), mentre la sensibilità somatica proveniente dai nervi encefalici è proiettata sul nucleo ventrale posteromediale (VPM).

Vi sono nuclei di relay specifici anche per le vie provenienti dai nuclei della base e dal cervelletto, collegati con i nuclei ventrale anteriore e ventrale laterale (VLA e VLP rispettivamente) che, a loro volta, proiettano alle aree motoria primaria,

premotoria (aree 6 e 8 di Brodmann) e motoria supplementare (Fig. 10) [Brooks e Tracey, 2005]



**Figura 10** – Rappresentazione delle aree motrici primaria, promotrice e motrice supplementare.

Il quarto neurone nocicettivo ha sede nella corteccia. I neuroni nocicettivi specifici e gli “wide dynamic range (WDR) neurons” non si trovano soltanto a livello midollare ma anche nel talamo e nella corteccia telencefalica. E’ proprio a livello di quest’ultima che si possono localizzare aree distinte deputate, rispettivamente, al riconoscimento delle componenti sensoriale-discriminativa, affettiva motivazionale e cognitiva-valutativa del dolore [Treede et al., 1999].

Per quel che concerne il riconoscimento della componente sensoriale-discriminativa sono state identificate due aree chiamate somatosensoriali che costituiscono il sistema laterale del dolore: la “primary somatosensory area” (SI) e la “secondary somatosensory area” (SII). La SI è la più estesa e la più importante per il riconoscimento della componente sensoriale-discriminativa del dolore [Bushnell et al., 1999; Kanda et al., 2000] e per la localizzazione degli stimoli tattili. Essa si trova lungo il solco centrale ed è suddivisa in 4 aree secondarie, delle quali la 3, posta nella circonvoluzione post-centrale del lobo parietale o solco post-centrale, riceve le afferenze nocicettive. Quest’area si prolunga dalla superficie laterale del lobo parietale a quella mediale ed è organizzata somatotopicamente: in essa il ristretto campo recettoriale dei neuroni (ancora più piccolo di quello dei neuroni nocicettivi spinali e talamici [Treede, 1999] consente di individuare con precisione la parte del

corpo dov'è applicato lo stimolo nocicettivo [Lamour et al., 1983]. In altre parole, vi sarebbe nella corteccia del giro post-centrale una mappa delle varie regioni corporee e, anche se le potenziali implicazioni cliniche non sono ancora chiarite, già mezzo secolo fa Marshall [1951] aveva osservato che un circoscritto danno della corteccia parietale provoca la perdita della capacità di riconoscere lo stimolo doloroso applicato nella regione somatica corrispondente. Molto meno importante per quel che concerne il riconoscimento della componente sensoriale-discriminativa del dolore è la secondary somatosensory area (SII) [Dong et al., 1989 e 1994].

Per quel che concerne il riconoscimento della componente affettivo-motivazionale del dolore (comportante la sgradevolezza dell'esperienza che viene interpretata come "sofferenza" ed avvia i meccanismi di evitamento dello stimolo causale), sarebbero responsabili di questo aspetto gli stimoli che percorrono le vie paleo-spinotalamiche poste nella porzione mediale del quadrante anterolaterale del midollo e, a livello corticale, il giro cingolato anteriore appartenente alla corteccia prefrontale, il lobo limbico, l'insula e l'amigdala, elementi del sistema mediale del dolore [Rainville et al. 1997; Vogt et al. 2003].

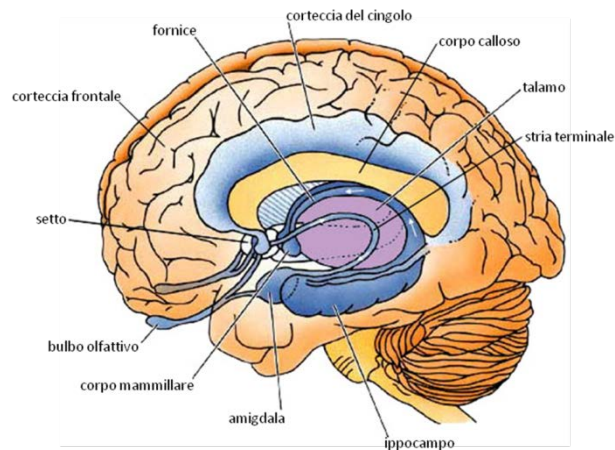
La corteccia prefrontale costituisce più della metà del lobo frontale che, a sua volta, rappresenta circa un terzo dell'intero cervello umano. E' posta rostralmente alla corteccia motoria e, diversamente da quest'ultima, oltre a non essere stimolabile elettricamente presenta sei strati ben distinti (corteccia associativa omotipica). Dal punto di vista anatomico la corteccia prefrontale viene suddivisa in due porzioni, quella dorso laterale (DLPFC – Dorso Lateral Pre Frontal Cortex) e la corteccia orbito mediale o ventro mediale (VMPFC – Ventro Medial Pre Frontal Cortex). E' da sottolineare il fatto che la corteccia frontale consta di altre tre regioni non facilmente classificabili che sono rappresentate dall'area visiva frontale (FEF – Frontal Eyes Field), dall'area di Broca e dal giro cingolato anteriore (ACG – Anterior Cyngulate Gyrus). Sempre dal punto di vista anatomico la PFC costituisce la regione del lobo frontale che riceve le afferenze dal nucleo medio dorsale (MD) del talamo. Suddetto nucleo è costituito da due

parti, una parvocellulare che scarica sulla DLPFC e l'altra, magno cellulare, che invia segnali alla VMPFC.

Da un punto di vista funzionale la corteccia prefrontale ha connessioni reciproche con quasi tutti i sistemi sensitivi e motori, sia corticali che sottocorticali. E' strettamente interconnessa con strutture mesencefaliche e limbiche coinvolte nei meccanismi di memorizzazione, emozionali e di rinforzo, siano essi positivi o negativi. Tuttavia essa non è direttamente connessa alle aree sensitive o motorie di tipo primario, bensì con aree di tipo associativo. Compito di tale corteccia, destinata dunque a ricevere le più disparate informazioni, sarebbe proprio quello di operare la sintesi di tale pletora di informazioni andando a regolare un'ampia gamma di processi mentali e di comportamenti.

Il lobo limbico è visibile sulla superficie mediale degli emisferi telencefalici e il termine limbico (dal latino *limbus* che significa bordo, contorno) si riferisce proprio a quelle formazioni che circondano ad anello la zona di passaggio tra diencefalo e telencefalo. Da un punto di vista strettamente anatomico tale lobo comprende tre formazioni: la circonvoluzione del corpo calloso o giro del cingolo, la circonvoluzione dell'ippocampo e la formazione dell'ippocampo. Da un punto di vista funzionale più che al lobo limbico siamo soliti fare riferimento al sistema limbico che risulta costituito da formazioni strutturalmente e filogeneticamente simili ma non sempre continue dal punto di vista anatomico. Infatti tale sistema comprende alcune regioni del diencefalo e del telencefalo che intervengono nell'elaborazione di tutto l'insieme dei comportamenti correlati con la sopravvivenza della specie, elaborano le emozioni e le manifestazioni vegetative che ad esse si accompagnano e sono coinvolte nei processi di memorizzazione (Fig. 11). Oltre alle già citate formazioni, il sistema limbico consta di parte del nucleo amigdaloido, dei nuclei del setto pellucido, dei nuclei mammillari dell'ipotalamo e del complesso nucleare anteriore del talamo. Le aree del sistema limbico concorrono, nel loro insieme, a due funzioni fondamentali della vita animale, quella della preservazione dell'individuo e quella della preservazione della specie. Per preservazione dell'individuo si intendono le reazioni emotive, la paura, i fenomeni detti di "attacco e fuga".

Relativamente alla funzione di preservazione della specie (funzione riproduttiva) il sistema limbico controlla il comportamento sessuale. Altra importante funzione del sistema limbico è quella di partecipare ai processi di memorizzazione. In particolare le strutture limbiche sarebbero deputate allo stabilirsi della traccia della memoria recente.

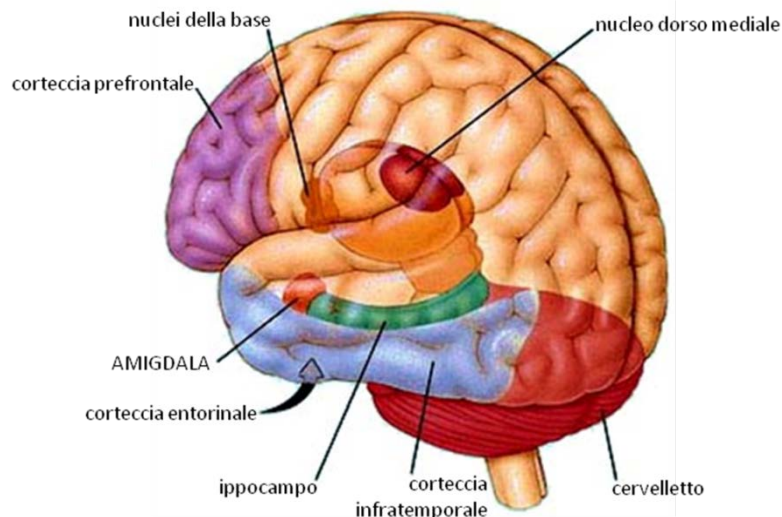


**Figura 11**–Disegno schematico illustrante il sistema limbico costituito da una serie di strutture cerebrali che includono: l'ippocampo, coinvolto nella formazione delle tracce di memoria a lungo termine e nell'orientamento spaziale, l'amigdala, implicata nella segnalazione alla corteccia di stimoli motivazionali associati a reazioni di paura e ricompensa e i nuclei talamici anteriori. Tale sistema include inoltre varie strutture corticali e sottocorticali quali il locus ceruleus che, pur facendo parte dei nuclei laterali della formazione reticolare viene annoverato tra i nuclei appartenenti al sistema limbico ed è all'origine della maggior parte delle risposte a stress e panico; il giro del cingolo deputato al controllo del battito cardiaco e della pressione sanguigna, oltre ad avere implicazioni cognitive specialmente nell'ambito dell'attenzione volontaria; il fornice, che trasporta segnali dall'ippocampo ai corpi mammillari ed è anch'esso implicato nella memoria a lungo termine; l'ipotalamo che esercita un controllo sul sistema nervoso autonomo e sulle vie neuroendocrine che influenzano le reazioni emozionali e di paura, i correlati fisiologici agli stati emotivi, ai ritmi circadiani (nucleo sopra chiasmatico) e ad alcuni comportamenti stereotipati; i corpi mammillari, importanti per la formazione della memoria a lungo termine; il giro dentato, coinvolto nella formazione di nuove tracce mnemoniche. Ricordiamo infine il giro del fornice costituente la regione che comprende l'ippocampo, il giro cingolato e il giro paraippocampale e il bulbo olfattivo deputato alla recezione degli stimoli di natura olfattiva.

L'amigdala (dal greco *amugdállos*, mandorla) o complesso nucleare amigdaloideo, è una formazione grigia a forma di mandorla che si trova



profondamente, nella parte dorso mediale del lobo temporale, in diretto rapporto con l'apice ventrale e con le parti superiore e mediale del corno inferiore del ventricolo laterale (Fig. 12).

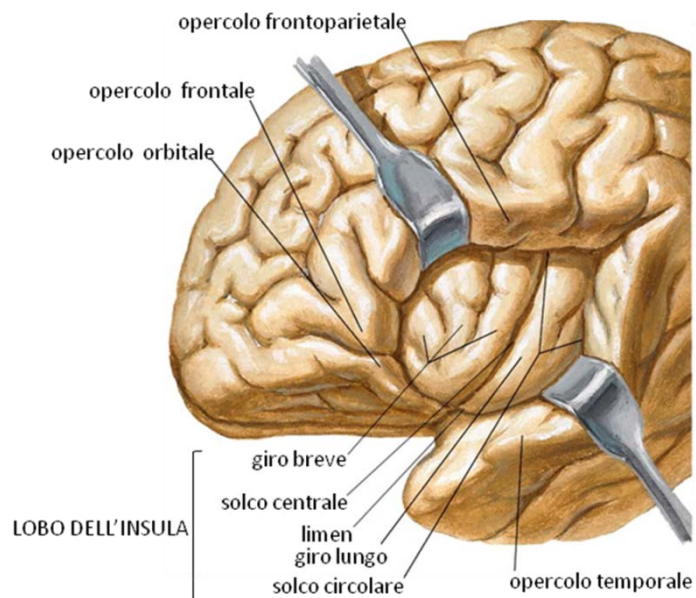


**Figura 12** – L'amigdala, che anatomicamente può essere assegnata al lobo temporale, è un nucleo facente parte dei nuclei della base ed è connessa con l'apice della coda del nucleo caudato; caudalmente, essa continua con l'*uncus* della circonvoluzione dell'ippocampo. I nuclei che compongono l'amigdala possono essere distinti in due gruppi: i nuclei corticomediale, comprendenti i nuclei amigdaloidi mediale, corticale e centrale, l'area amigdaloida anteriore ed il nucleo della stria olfattiva laterale, e i nuclei basolaterali, comprendenti i nuclei amigdaloidi laterale, basale e basale accessorio. Il nucleo centrale dell'amigdala è implicato in fenomeni di aggressività.

Date le estese connessioni che tale formazione grigia stabilisce con le altre strutture del sistema limbico, si può affermare che il complesso nucleare amigdaloidale partecipi a tutte le cosiddette funzioni limbiche rappresentate dalle emozioni, dall'olfatto, dalla memoria, dal controllo degli impulsi, dal controllo neuroendocrino e da quello vegetativo. Il ruolo dell'amigdala è soprattutto legato al comportamento emozionale, in particolare nell'attribuire un significato emozionale agli stimoli percepiti dalla corteccia associativa. Le connessioni con l'ipotalamo e i nuclei del tronco encefalico determinano il controllo dell'amigdala sul sistema nervoso autonomo regolando alcuni

meccanismi quali la frequenza cardiaca, la peristalsi e le funzioni gastriche osservabili in coincidenza di forti emozioni. E' infine importante rilevare il ruolo dell'amigdala negli aspetti motivazionali legati all'olfatto.

La corteccia insulare o lobo dell'insula o, più semplicemente, insula rappresenta quella porzione della corteccia cerebrale localizzata profondamente al solco laterale, tra il lobo frontale e il lobo temporale (Fig. 13). L'insula entra in gioco nella regolazione di svariate funzioni collegate alle emozioni e all'omeostasi corporea. Tra tali funzioni sono incluse la percezione degli stimoli, il controllo motorio, l'istinto di conservazione, le funzioni cognitive e le relazioni interpersonali.



**Figura 13** - Lobo dell'insula (o *insula di Reil*) che si presenta approfondato nello spessore della scissura laterale (di Silvio): come mostrato dalla figura, tale lobo risulta visibile soltanto dopo demolizione di tutti gli opercoli (ovvero i margini della scissura stessa). L'insula è composta da due porzioni, una anteriore (insula anteriore), costituita da circa tre circonvoluzioni brevi, e una posteriore (insula posteriore), costituita da una o due circonvoluzioni lunghe. I limiti del lobo dell'insula, nei confronti degli altri lobi, sono rappresentati dalla scissura circolare anteriore, posta al davanti della prima circonvoluzione breve, dalla scissura circolare posteriore, posta al di dietro dell'ultima circonvoluzione lunga, e dalla scissura circolare superiore, che abbraccia i margini di tutte le altre circonvoluzioni dell'insula.

## Capitolo 2

### Fisiologia del dolore

La detenzione di stimoli nocivi richiede l'attivazione di organi sensoriali periferici, i nocicettori, e la traduzione del segnale per la conduzione al SNC. Nel capitolo 1 è già stato sottolineato che le fibre afferenti nocicettive possono essere distinte in due categorie: le fibre A $\alpha$  mielinizzate di medio-piccolo diametro e le fibre C, amielinizzate, di piccolo diametro. Come abbiamo visto, un danno tissutale dovuto ad esempio ad infezione, infiammazione o ischemia, induce il rilascio di mediatori chimici che agiscono sia direttamente via canali ionici ligando-dipendenti, sia via recettori metabotropici collegati a secondi messaggeri, nell'attivare e/o sensitizzare i nocicettori (Tabella I). Molti di questi recettori sono accoppiati ad una proteina G (GPCRs) e trasmettono l'informazione attraverso l'attivazione di secondi messaggeri come adenosin monofosfato ciclica (cAMP), guanosina monofosfato ciclica (cGMP), diacilglicerolo e fosfolipasi C, accoppiati intracellularmente con alcune protein chinasi (sia la PKA che diversi isotipi di PKC). A loro volta queste chinasi fosforilano proteine cellulari specifiche, inclusi i canali ionici di membrana ligando-dipendenti (TRPV) e voltaggio-dipendenti (Na $\nu$  1.8), che sembrano avere un ruolo preminente nell'eccitabilità dei nervi periferici. Questi processi regolano l'attivazione dei nocicettori su una soglia più bassa rispetto a quella fisiologica ed inducono un'imponente " firing " neuronale. In aggiunta, l'eccitabilità delle fibre afferenti può essere modificata dai cambiamenti che avvengono nella sintesi di recettori, canali ionici ed enzimi controllata dalla trasmissione retrograda ai corpi cellulari dei neuroni sensoriali, che altera la trascrizione genica ed il fenotipo cellulare sensoriale [Woolf e Salter, 2000]. Alcuni sintomi quali l'iperalgia e l'allodinia potrebbero essere causati dalla stimolazione delle fibre sensoriali a bassa-soglia A $\alpha$  come risultato di un'infiammazione locale o dell'alterazione nel modo in cui i segnali sensitivi vengono processati a livello del SNC. Anche

l'ipereccitabilità secondaria del SNC (la cosiddetta sensitizzazione centrale) si attua attraverso numerosi meccanismi cellulari, inclusi la fosforilazione (attività dipendente delle proteine sinaptiche), il cambiamento della trascrizione genica e l'aumento dall'attivazione di recettori e canali [Woolf and Salter, 2000].

Tabella I

| RECETTORI<br>IONOTROPICI   | SOTTOTIPI                 | LIGANDI   |
|----------------------------|---------------------------|---|
| canali TRP                 | TRPV 1<br>TRPV 2<br>TRPVA | stimoli caldi (>42°), capsaicina<br>H <sup>+</sup><br>stimoli caldi (> 55°), stimoli freddi (< 17°) |
| purine                     | P2X3                      | ATP   |
| serotonina                 | 5HT3                      | 5HT   |
| NMDA                       | NR1                       | glutammato  |
| AMPA                       | iGluR1                    | glutammato  |
| kainato                    | iGluR5                    | glutammato  |
| RECETTORI<br>METABOTROPICI | SOTTOTIPI                 | LIGANDI   |
| glutammato metabotropico   | mGluR 1,2/3,5             | glutammato  |
| neurotrofine               | TrkA, p75                 | NGF   |
| prostanoidi                | EP 1-4<br>IP              | PGE2<br>PGI2  |
| istamina                   | HI                        | HA  |
| serotonina                 | 5 HT1<br>5 HT4<br>5 HT2A  | 5 HT  |
| bradichinina               | B1, B2                    | BK  |
| cannabinoidi               | CB 1-2                    | anandamide  |
| tachichinina               | NK1                       | sostanza P, neurokinin A  |
| oppioidi                   | ?                         | encefaline, dinorfine, endorfine  |

**Tabella I** – Esempi di recettori e dei relativi ligandi delle afferenze primarie e delle corna dorsali. Abbreviazioni: 5HT: serotonina, AMPA: acido α-ammino-3-rossi-5-metil-4-isoxazolo propionico, ATP: adenosina trifosfato, BK: bradichinina, iGluR: recettore glutammato ionotropico, H: istamina, P2X3: sottotipo recettoriale purinergico, PGE2: prostaglandina E2, PGI2: prostaciclina, TRP: recettori potenziali transienti, NMDA: N-Methyl-D-aspartato, NGF: fattore di crescita dei nervi, NK1: neurochinina 1, TRPV: recettore vanilloide. TrkA: recettore tiroxina kinasi A. Altri come p75 etc. non rappresentano abbreviazioni ma i nomi dei sottotipi recettoriali.

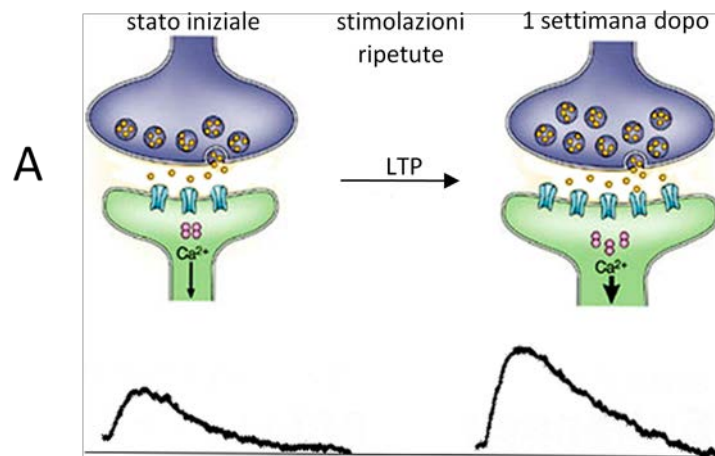
I terminali afferenti primari contengono, amminoacidi eccitatori (come il glutammato), polipeptidi a catena corta (per esempio la sostanza P) e numerosi neurotrasmettitori. La depolarizzazione dei terminali afferenti primari determina il rilascio del glutammato il quale attiva i recettori postsinaptici AMPA (Acido  $\alpha$ -Ammino3-rossi5-Metil4-isoxazolo Propionico). Tale evento è necessario affinché venga immediatamente processata l'informazione relativa alla natura, alla localizzazione e all'intensità dello stimolo. Questo processo, che potremmo definire "lineare", consta di un input afferente e di un output efferente dai neuroni delle corna dorsali e, in risposta ad un unico stimolo ad alta intensità, genera un breve dolore localizzato. La sommatoria di input afferenti ai neuroni delle corna dorsali ripetuti, può indurre fenomeni di plasticità neuronale la cui esistenza potrebbe chiarire la natura ed il miglior trattamento clinico delle condizioni di iperalgesia. Almeno tre di questi meccanismi di plasticità hanno assunto in questo ambito un rilevanza basilare: il fenomeno del wind-up; la cosiddetta Long Term Potentiation o LTP (potenziamento a lungo termine) e, di contro, la Long Term Depression o LTD (depressione a lungo termine).

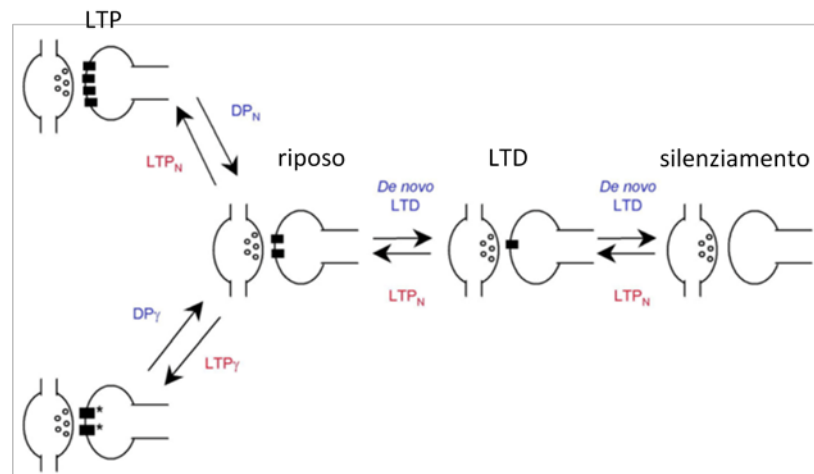
Il wind-up [Bliss e Collingridge, 1993; Malenka e Nicoll, 1993] costituisce un progressivo incremento registrato nei neuroni delle corna posteriori del midollo spinale ed in quelli motori delle corna anteriori del numero dei potenziali d'azione scatenati in seguito a stimolazione delle fibre C ad una frequenza maggiore di 0.5 Hz. Quando la frequenza di stimolazione di una singola radice dorsale raggiunge gli 0.5 Hz, il potenziale eccitatorio postsinaptico (EPSPs) totale nelle cellule delle corna anteriori produce una depolarizzazione cumulativa che si esprime in una raffica di potenziali d'azione invece che in un singolo potenziale d'azione per ogni stimolo a livello della radice posteriore. Quando la stimolazione ad alta frequenza viene interrotta, i potenziali d'azione si protraggono ancora per 60 secondi (intervallo corrispondente alla durata della depolarizzazione delle cellule delle radici dorsali) per poi cessare. L'utilizzazione di una stimolazione a bassa frequenza riduce notevolmente l'insorgenza del wind-up, insorgenza che viene completamente abolita dall'uso degli antagonisti recettoriali dell' N-Metil-

D-Aspartato (NMDA). Viene suggerito che il fenomeno del wind-up può essere visto come la sommazione temporale di EPSPs mediati dal recettore per l' NMDA.

Il fenomeno della LTP [Bliss e Collingridge, 1993; Malenka e Nicoll, 1993] si presenta come un'incremento a lunga durata della trasmissione sinaptica (cioè un incremento nell'ampiezza dei potenziali eccitatori postsinaptici registrati in risposta ad uno stimolo-prova ed un successivo incremento nell'eccitabilità della cellula postsinaptica) causata da una stimolazione ad alta frequenza (superiore ai 100 Hz) e di breve durata della via sinaptica (Fig. 14 A). La forma più comune di LTP si osserva quando scariche ad alta frequenza di attività presinaptica determinano un rilascio di glutammato dai terminali presinaptici.

Con il termine di LTD [Bliss e Collingridge, 1993; Malenka e Nicoll, 1993] si intende un decremento di lunga durata dell'efficacia della trasmissione sinaptica, che può essere causato da una stimolazione prolungata. I suoi meccanismi di base sono stati chiariti di recente. Essa è caratteristica dell'ippocampo, della corteccia visiva, di quella sensitiva, di quella motoria e di quella prefrontale. Nell'ippocampo e nella neo-cortex la LTD sembra essere indotta nelle cellule postsinaptiche da una fonte di ioni calcio simile a quella che si trova alla base dell'induzione della LTP, ma di concentrazione leggermente inferiore (Fig. 14 B).





**Figura 14** – A, LTP: all'istante zero viene dato uno stimolo tetanico; da questo momento in poi la cellula è potenziata e produrrà un numero maggiore di EPSP nell'unità di tempo. B, LTD: in un neurone dove è stata indotta in precedenza una LTP, si hanno una serie di stimolazioni protratte nel tempo prima di ritornare ai valori di base.

Come nel caso della LTP, la fonte di provenienza degli ioni calcio non sembra essere importante: essa potrebbe derivare infatti da un deposito di notevole entità di una vicina sinapsi, da depositi intracellulari, da un influsso attraverso i canali voltaggio-sensibili, o infine da canali associati al recettore per l'NMDA. Ciò che sembra essere importante è senza dubbio l'ampiezza dell'incremento della concentrazione dello ione all'interno della cellula.

E' proprio da un attento esame delle caratteristiche di questi fenomeni che emergono alcune sostanziali differenze tra LTP e wind-up; innanzitutto esiste una difformità di ordine cronologico in quanto il wind-up ha una durata di pochi minuti (fino ad un massimo di 20), mentre la LTP dura da 1 ora (limite temporale minimo) a diversi mesi; in secondi è da sottolineare che mentre dopo l'iniziale depolarizzazione dell'LTP, il potenziale di membrana di riposo, la resistenza all'ingresso delle correnti ioniche e le proprietà passive di membrana delle cellule postsinaptiche sono identiche a quelle delle cellule non potenziate, nel wind-up si verifica una depolarizzazione persistente. Inoltre la LTP può essere prevenuta ma non inibita dai bloccanti dei recettori NMDA, mentre il wind-up può essere prevenuto e bloccato dagli antagonisti dei recettori NMDA.

I cambiamenti intracellulari dovuti alla sensitizzazione sono associati all'attivazione di fattori di trascrizione sia nei gangli annessi alle radici dorsali (DRG) che nelle corna posteriori del midollo spinale che determinano cambiamenti nel profilo di espressione genica e delle proteine.

Ai processi eccitatori sopra menzionati va aggiunta la modulazione inibitoria presente all'interno delle corna dorsali che può essere mediata da inputs non nocicettivi periferici, da inibizione locale esercitata da interneuroni GABAergici, da proiezioni discendenti bulbo-spinali e da funzioni cerebrali di più alto livello (distrazione, input cognitivi etc.). Questi meccanismi inibitori vengono attivati in modo endogeno per ridurre la risposta eccitatoria seguente attività persistente delle fibre nocicettive.

## **Modulazione discendente del dolore**

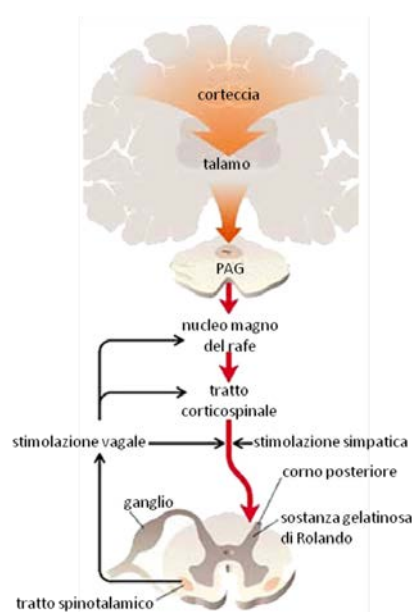
Le vie discendenti contribuiscono alla modulazione della trasmissione del dolore a livello spinale attraverso un'azione post-sinaptica sulle proiezioni dei neuroni o sugli interneuroni nelle corna dorsali. Di questo sistema fanno parte circuiti diretti corticofugali ed indiretti (attraverso strutture modulatorie come il grigio periacqueduttale – PAG, PeriAcqueductal Gray) dalla corteccia, dall'ipotalamo (importante nella coordinazione dell'informazione sensoriale e autonoma) e dalle regioni del tronco encefalico (nucleo parabrachiale del ponte, il midollo allungato e la PAG). Il complesso sistema di vie, trasmettitori e sottotipi recettoriali che costituiscono la modulazione discendente può determinare due effetti opposti sulla trasmissione del dolore: la facilitazione (effetto eccitatorio) e l'inibizione. E' chiaro che un sistema non alterato è in grado di bilanciare i due effetti in funzione del tempo e dello stimolo esercitato. Una molteplicità di lavori hanno ormai definitivamente stabilito il ruolo fondamentale della PAG nel sistema discendente, attribuendole, in modo assolutamente fondato, le caratteristiche di sito principale ed indispensabile nella modulazione del dolore. I primi studi misero in luce come una semplice stimolazione elettrica era in grado di produrre un'analgesia pari ad una dose di 10 mg/kg di morfina [Mayer e Liebeskind, 1974] o di bloccare dolore intrattabile negli umani [Hosubushi et al.,



1977]. Inoltre, i dati che incoraggiano a considerare la PAG come una struttura indispensabile, sono rafforzati da numerosi studi anatomici che mettono in evidenza come questa riceva connessioni dall'ipotalamo, dalle regioni corticali e libiche e dal fatto che comunichi con strutture da cui partono le proiezioni spinali [Fields, 2004]. E' naturale comunque che la PAG non sia l'unica struttura coinvolta nella modulazione, infatti, essa interagisce con altre strutture del tronco encefalico come i nuclei noradrenergici (locus coeruleus) [Westlund et al., 1983] e il midollo rostroventromediale (RostroVentral Medulla – RVM), inclusi i nuclei serotoninergici quali il nucleo magno del rafe e quello gigante cellulare, che è il principale “relay” nell'interazione di input nocicettivi ascendenti con i discendenti [Fields e Bausbaum, 1999; Fields, 2004].

In conclusione, le vie discendenti sono sostanzialmente due, di cui una prende origine dal locus coeruleus e manda gli assoni fino al corno dorsale dove il neurotrasmettitore che viene liberato è la noradrenalina, la quale inibisce la liberazione di sostanza P (SP), riducendo così la percezione del dolore.

La seconda via analgesica prende origine dalla sostanza grigia periacqueduttale (zona mesencefalica) e dal midollo allungato (nucleo dorsale del rafe) e proietta i suoi assoni al midollo spinale dove viene liberata la serotonina (Fig. 15).



**Figura 15** – Modulazione del dolore nelle vie discendenti.

Proprio questa seconda via costituisce una sede d'elezione per gli analgesici oppiacei in quanto tali aree mesencefaliche e bulbari sono ricche sia di peptidi oppioidi sia di recettori oppioidi, perché la stimolazione elettrica a questo livello provoca analgesia, e infine perché l'induzione della liberazione di peptidi oppioidi nel corno dorsale da parte della serotonina inibisce la liberazione di SP. Da tutto ciò ne consegue che le vie discendenti noradrenergiche e serotoninergiche modulano gli stimoli dolorosi riducendo direttamente o indirettamente la liberazione di SP. Tale riduzione provoca l'attivazione dei neuroni oppiatergici che liberano peptidi oppioidi che a loro volta inibiscono la liberazione di SP dando luogo ad una riduzione del dolore.

I circuiti di modulazione del dolore, oltre ad inibire la trasmissione nocicettiva sono in grado anche di facilitarla e sembra che tali circuiti siano costituiti da neuroni differenti [Fields, 1991]. E' stato dimostrato, infatti, che nell'RVM ci sono tre diverse classi di neuroni: i neuroni che iniziano a scaricare poco prima che si manifesti la risposta riflessa evocata da uno stimolo termico di temperatura elevata ("cellule on"), i neuroni che smettono di scaricare poco prima del manifestarsi della risposta riflessa ("cellule off") ed i neuroni che non manifestano nessun cambiamento nella frequenza di scarica quando si verifica la risposta riflessa ("cellule neutre"). Le "cellule on" vengono eccitate da stimoli nocivi che si presentano ovunque sulla superficie corporea mentre le "cellule off" sono inibite dai medesimi stimoli. Una porzione significativa dei neuroni dell'RVM di ciascuna delle tre classi proiettano nel midollo spinale. In particolare, le cellule on ed off proiettano nelle lamine I, II e V delle corna dorsali [Fields et al., 1995]. Sia le "cellule on" che le "off" sono eccitate dalla stimolazione elettrica della PAG, mentre solo le "cellule off" vengono attivate dalla morfina [Fields et al., 1991]. Esistono quindi due classi distinte di neuroni di modulazione nell'RVM che hanno effetti opposti sulla nocicezione: le "cellule on" che facilitano la trasmissione dell'informazione nocicettiva, e le "cellule off" che la inibiscono. La somiglianza nelle caratteristiche di risposta presente tra i membri di ciascuna classe neuronale, i loro campi nocicettivi somatici estremamente ampi, e la grande distribuzione degli assoni di ciascun neurone in segmenti spinali multipli

indicano che questi neuroni esercitano un'influenza globale sui processi che vengono messi in atto in risposta ad uno stimolo doloroso. Uno stimolo nocivo attiva quindi dei circuiti neurali multipli, alcuni con effetti antinocicettivi ed altri con effetti pronocicettivi. Se la risposta a tale stimolo sarà poi aumentata o soppressa dipenderà dalla localizzazione dello stimolo, dalla sua durata, dalla situazione ambientale in cui lo stimolo viene applicato e dallo stato comportamentale del soggetto [Watkins et al., 1982].

## **Metodi di valutazione del dolore**

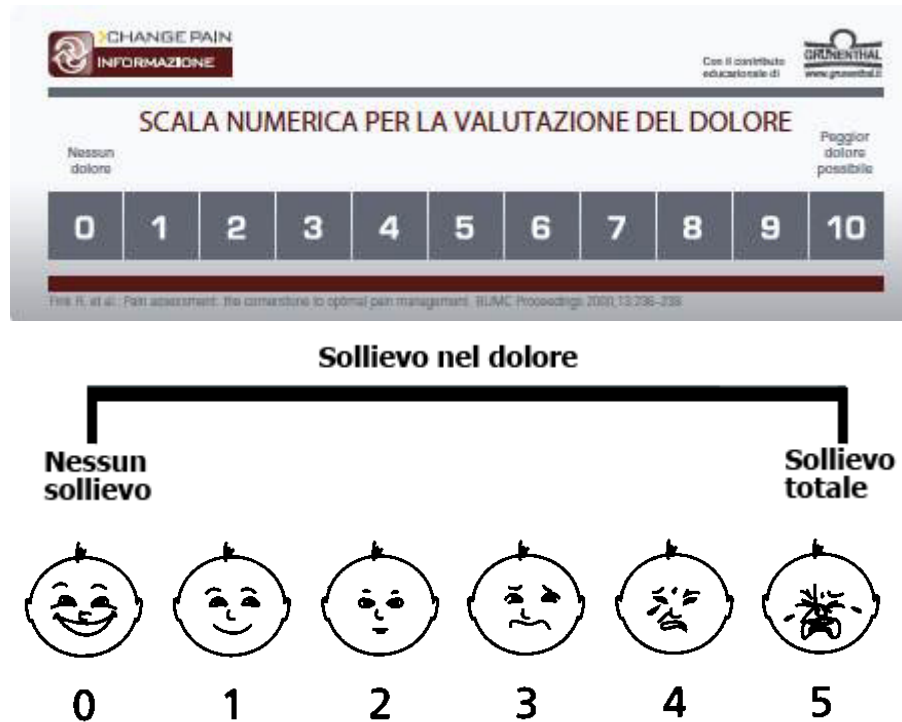
La misurazione del dolore è parte fondamentale della valutazione e della strategia terapeutica per il controllo del dolore. L'uso di una misurazione formale scritta del dolore, da riportare nella documentazione clinica dei pazienti, ha dimostrato di migliorare la capacità dei curanti di comprendere l'intensità del dolore [Au et al., 1994]. Vi sono raccomandazioni di standard di cura, che provengono da società scientifiche e da agenzie governative, che richiedono l'introduzione nella documentazione clinica dell'intensità del dolore per mezzo di scale numeriche da 0 a 10 [Ferrell et al., 1994]. Queste raccomandazioni ormai si spostano dall'area del miglioramento della qualità dei servizi sanitari a quella dell'accreditamento delle organizzazioni che forniscono interventi sanitari. Qualunque set di cura dovrebbe quindi qualificarsi per l'appropriatezza dei mezzi di controllo del dolore a partire da metodi affidabili e standardizzati di misurazione del dolore, inseriti nella routine dell'attività clinica. Diverse scale del dolore sono valide in oncologia e sono facilmente applicabili in clinica. Possono essere divise in 2 categorie principali: scale di intensità e questionari multidimensionali.

### **Scale di intensità**

Le principali sono le scale analogiche visive (VAS – *visual analogic scale*), numeriche, (NRS – *numerical rating scale*) (usualmente da 0 a 10) e verbali (VRS – *verbal rating scale*) [Ripamonti et al., 2000]. La VAS si presenta sotto forma di un segmento di linea retta di 100 mm, con gli estremi definiti da descrittori,

come “dolore assente” e “massimo dolore possibile”. Il paziente deve segnare sulla retta il punto che corrisponde a suo giudizio all’intensità del suo dolore. Il punteggio è calcolato in millimetri dall’estremo che corrisponde all’intensità minima al punto segnato dal paziente. La VAS può risultare di difficile compilazione per i pazienti con minore livello di istruzione e per gli anziani. Le caratteristiche psicometriche della VAS la rendono particolarmente adatta per gli studi dei farmaci analgesici in acuto, in quanto è la scala più precisa nella misurazione, ma richiede una grande attenzione nella somministrazione e istruzione adeguata del soggetto [Price et al., 1994].

La NRS, da 0 a 10, sembra avere un significato comune anche in culture diverse [Serlin et al., 1995] e presenta caratteristiche psicometriche simili alla VAS. La scala può essere presentata al paziente come una semplice domanda: «Considerando una scala da 0 a 10, in cui a 0 corrisponde l’assenza di dolore e a 10 il massimo dolore immaginabile, quanto valuta l’intensità del suo dolore?»; è quindi svincolata dall’uso di carta, penna e centimetro, che sono necessari per la VAS. Un dolore che va da 1 a 4 è considerato un dolore lieve, tra 5 e 6 moderato, tra 7 e 10 severo. La soglia di 5 viene considerata il limite di dolore che inizia ad interferire con le attività quotidiane e la qualità di vita. Le VRS sono strumenti che impiegano degli aggettivi per descrivere il livello di intensità del dolore. Le proprietà psicometriche di queste scale sono simili a NRS e a VAS solo se vengono usati un numero adeguato di livelli [Gracely et al., 1992]. Si ritiene che almeno 6 livelli siano necessari; questo rende poco utili le comuni scale a 4 livelli del tipo: nessun dolore, un po’, molto, moltissimo (Fig. 16).



**Figura 13** – Esempi di scale del dolore: in alto, scala NRS; al centro scala VAS per adulti; in basso scala VAS per bambini o soggetti con deficit.

### Scale di sollievo

Con le metodologie precedentemente descritte sono state ricavate scale di sollievo dal dolore, spesso utilizzate per valutare i cambiamenti dell'intensità in brevi periodi (< 24 ore). Per tempi più lunghi si tende ad utilizzare le scale di intensità integrandole con misurazioni del tono dell'umore e dello stress psicologico.

### Questionari multidimensionali

Nella pratica clinica si deve considerare che l'intensità del dolore, di per se stessa, può non essere sufficiente a valutare l'efficacia del trattamento ed inoltre che è importante sapere quanto un dato dolore reca disturbo al paziente, qual è il livello di dolore che può essere considerato tollerabile, cosa corrisponde ad un sollievo dal dolore soddisfacente, quanto il dolore interferisce con la qualità della

vita e dove il paziente vorrebbe collocarsi nel bilancio finale costo-beneficio tra sollievo dal dolore ed effetti collaterali. È quindi ragionevole che siano state proposte interpretazioni multidimensionali. Ai fini della valutazione clinica, sono rilevanti i modelli che prevedono 2-3 dimensioni. Una teoria (qui descritta) suggerisce un modello a 3 dimensioni: sensoriale-discriminativa, motivazionale-affettiva e cognitivo-valutativa.

Un altro modello, specifico del dolore oncologico, identifica nell'intensità e nell'interferenza con le funzioni di vita quotidiana le principali dimensioni. Diversi strumenti sono disponibili per una valutazione multidimensionale del dolore da cancro; i più conosciuti sono il *McGill Pain Questionnaire* (MPQ), il *Brief Pain Inventory* (BPI) [Ripamonti et al., 2000]. Tutti questi strumenti sono validi ed affidabili. L'MPQ è stato formulato da Melzack nel 1975. È uno strumento complesso che, basandosi sull'uso di 78 aggettivi descrittivi del dolore, esplora 3 dimensioni: sensoriale, affettiva e valutativa. In italiano esistono due versioni validate: quella di Maiani e Sanavio (1985) e quella di De Benedittis et al. (1988). Il BPI (forma breve) è basato su scale numeriche da 0 a 10 che valutano l'intensità e l'interferenza del dolore con le abituali attività (7 aree di attività psicosociali e fisiche) [Martini et al., 2000]. La misurazione dell'intensità si riferisce al dolore peggiore, al dolore minimo e a quello medio riferiti alle 24 ore precedenti e al dolore attuale. Contiene anche una valutazione sul sollievo dal dolore in un range da 0 a 100%. L'uso di questo strumento in studi multicentrici ha permesso l'identificazione di livelli di dolore che rappresentano limitazioni clinicamente importanti a causa della loro interferenza con le abituali attività. Quando l'intensità del dolore raggiunge il livello di 5 inizia ad interferire significativamente con le normali abitudini di vita e, quando raggiunge un livello di 7, la sua interferenza con tali funzioni è ancora più evidente [Serlin et al., 1995].

## **Dolore acuto e dolore cronico**

### **Dolore acuto**

Il dolore acuto è un complesso sistema di interazioni tra i fattori tissutali rilasciati in seguito a numerose alterazioni che possono consistere in un “semplice” trauma fino ad un’infezione. Questo processo infiammatorio permette di distruggere in modo mirato corpi estranei o tessuti danneggiati favorendo il processo di riparazione e guarigione. Se questi aspetti non sono propriamente bilanciati l’infiammazione persiste e gli elementi tissutali coinvolti nel danno, come i leucociti, i linfociti e i macrofagi possono originare una condizione patologica [Nathan, 2002]. I componenti cruciali coinvolti nel dolore infiammatorio sono alcuni tipi cellulari che entrano in gioco nella risposta immunitaria (macrofagi e neutrofili) e cellule residenti (cellule di Schwann e mastociti) che producono numerosi mediatori in grado di attivare il sistema nervoso autonomo e sensoriale periferico, causando così la sensitizzazione dei nocicettori [Hunt e Mantyh, 2001; Sholz e Woolf, 2002]. Peptidi, proteasi, prostanoidei, citochine e chemochine sono mediatori che prendono parte al processo infiammatorio, per lo più agendo localmente e modulando l’eccitabilità nervosa. Tuttavia alcuni di questi fattori, quali il monossido di azoto (NO) o il fattore di necrosi tissutale alfa (TNF $\alpha$ ), possono arrivare a danneggiare i nervi ed instaurare una neuropatia. Inoltre le citochine sono in grado di entrare in circolo e produrre infiammazione in un sito distale dal sito di origine. Il risultato di una lesione periferica o di una lesione di un nervo può portare a cambiamenti a livello centrale, in particolar modo nel midollo spinale, dove l’ipereccitabilità secondaria cresce e rende attive le cellule neurogliali che a loro volta rilasciano fattori infiammatori e regolatori cellulari [Hunt e Mantyh, 2001; Watkins e Maier, 2002]. La sensitizzazione di nocicettori e l’induzione di ipereccitabilità sono processi chiave del dolore infiammatorio che sottostanno ai segni clinici manifestati nell’iperalgia, nell’allodinia e nel dolore in generale. Il dolore infiammatorio consta dunque di una componente periferica ed una centrale. Come già in parte detto, responsabili della componente periferica del dolore infiammatorio sono le chinine (come la bradichinina), i prostanoidei (in particolare la PGE<sub>2</sub>), le citochine (IL 1- $\beta$ ; TNF $\alpha$ ) i canali ionici (in particolare il TRPV1 capsaicino sensibile) ed alcune neurotrofine come l’NGF (Nerve Growth Factor).

Principale ruolo nell'insorgenza della componente centrale è svolto dai recettori glutammatergici, primariamente dagli NMDA, mentre un ruolo secondario viene attribuito agli AMPA, ad alcune neurochinine e neurotrofine.

### **Dolore cronico**

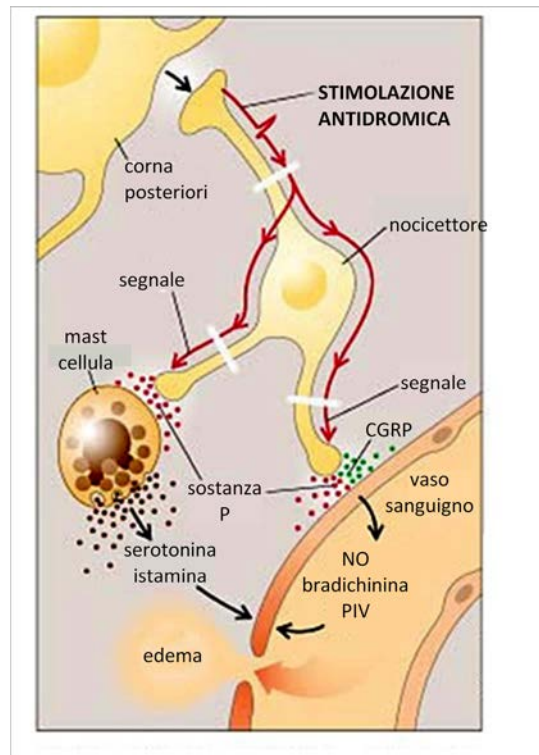
I processi patofisiologici che incorrono dopo una lesione di un nervo o di un tessuto possono dare origine ad uno stato persistente di dolore. Tra questi, uno stato di infiammazione che non si risolve spontaneamente e nel giusto lasso temporale può indurre cambiamenti ai nervi periferici, al midollo spinale, ai circuiti centrali cerebrali e al sistema simpatico. Successivamente a lesione o danno si osserva infatti un aumento di eccitabilità nei neuroni delle corna dorsali e, una misura di questo fenomeno, è l'estensione dei loro campi di ricezione. Ne consegue che l'attività neuronale è amplificata e che il soggetto che ne è affetto riferisce forte dolore o iperalgesia. Woolf, Wall e colleghi definirono questo processo "sensitizzazione centrale". La sensitizzazione centrale a livello spinale sembra coinvolgere i recettori del glutammato, della SP e del fattore neurotrofico derivante dall'encefalo (Brain-Derived Neurotrophic Factor - BDNF) [Ren et al., 1992; Woolf e Salter, 2002]. Il dolore transiente, che normalmente è provocato da stimoli nocivi, è diffusamente mediato dall'azione del glutammato sui recettori AMPA e sui neuroni delle corna dorsali i quali provvedono rapidamente a lanciare uno stato di allerta al cervello e a innescare un sistema di protezione. Quando la lesione non si risolve e lo stato infiammatorio persiste, il glutammato continua ad essere rilasciato dai terminali centrali dei neuroni nocicettivi afferenti insieme alla SP. A seguito di questo prolungato rilascio anche i recettori accoppiati a proteine G, come i metabotropici per il glutammato ed i recettori NK-1 per la SP, vengono attivati. Si innescano così secondi messaggeri che permettono la fuoriuscita di calcio dai depositi intracellulari.

A questo punto gli eventi si susseguono a catena: inizia la depolarizzazione di membrana, i recettori NMDA vengono attivati grazie alla rimozione del blocco da  $Mg^{2+}$  rilasciando così le chinasi calcio-dipendenti (per esempio la PKC). Infine il BDNF induce la fosforilazione degli NMDA: questo passaggio è uno dei maggiori



responsabili della sensitizzazione centrale e della conseguente iperalgesia. In molti modelli animali di dolore cronico la SP legata al recettore NK-1 induce l'espressione della proteina c-fos, che in molti casi è considerata "l'impronta" biochimica della presenza di uno stato di dolore persistente: essa è il marker dell'ipersensitizzazione centrale. All'inizio la proteina è localizzata nelle cellule afferenti spinali che ricevono l'input nocicettivo, ma con il protrarsi del dolore, la c-fos diffonde rapidamente ai livelli spinali più alti fino a raggiungere il talamo: giunto in questo distretto, il dolore diviene intrattabile.

Gli eventi sopradescritti si focalizzano principalmente sul ruolo dei neuroni primari afferenti e di quelli delle corna dorsali nell'indurre plasticità sinaptica e quindi nel mantenere uno stato patologico del dolore. Ma esiste una terza componente che negli ultimi anni ha ricevuto attenzioni e che entra in gioco in questi processi di alterazione del sistema: gli assoni terminali delle vie discendenti. Il dolore anormale generato da una lesione di un nervo periferico è correlato con un aumento dei neurotrasmettitori eccitatori dai neuroni afferenti primari: evento che sarebbe secondario a cambiamenti neuroplastici che portano ad un incremento della facilitazione discendente dall'RVM. Ossipov e Porreca [2000, 2002] ipotizzarono che la fase iniziale del dolore neuropatico è guidata dall'attività delle fibre afferenti primarie mentre la fase di mantenimento è guidata da questi adattamenti neuroplastici centrali. Numerose evidenze sperimentali tra cui l'ablazione del funicolo dorsolaterale [Burgess et al., 2002] ed il blocco del circuito bulbo spinale di facilitazione [Gardell et al., 2004] in animali con neuropatia, hanno mostrato come sia possibile prevenire manifestazioni associate alla neuropatia. Un altro punto che fino a pochi anni fa non era tenuto in considerazione perché sconosciuto, è la capacità dei neuroni afferenti di trasportare l'informazione in modo bidirezionale, ossia in caso di anormalità generata dallo stabilirsi di una condizione patologica, di condurre il segnale in modo antidromico. Questa insolita situazione si attua quando le fibre afferenti rilasciano nelle corna dorsali mediatori in grado di indurre un potenziale di azione che viene scaricato antidromicamente indietro, ovvero verso i nocicettori (Fig. 17).



**Fig. 17** -Effetti del trasporto antidromico delle fibre afferenti

Quando ciò accade, diverse molecole situate sui terminali periferici di queste cellule vengono liberate. Tra queste vi sono la SP e il NGF che come sappiamo non sono semplici neurotrasmettitori bensì potenti agenti infiammatori. Il rilascio di queste due molecole a livello periferico causa una reazione tissutale chiamata infiammazione neurogenica. Di contro alla risposta infiammatoria classica dovuta a trauma o a danno immuno-mediato, l'infiammazione neurogenica è dovuta ad eventi nel SNC e non dipende dalla messa in atto di meccanismo linfocito- o granulocito-dipendenti. NGF e SP inducono degranolazione dei mastociti e gli effetti sono visibili sul sistema vascolare dell'endotelio: il rilascio di bradichinina ed NO dopo degranolazione genera vasodilatazione.

Alla luce di questi eventi, diventa più comprensibile la difficoltà che si incontra nel trattamento di pazienti affetti da dolore cronico; proprio a causa della molteplicità dei sistemi che entrano in gioco non esiste ad oggi un'unica cura adatta a tutte le tipologie di dolore persistente. Il dolore incontrollato, diffuso

oltre il punto d'origine e che inspiegabilmente dura mesi o anni, affligge purtroppo la quotidianità di numerose persone.

Un particolare tipo di dolore cronico è il dolore che si associa a neuropatie: il dolore neuropatico.

## *Capitolo 3*

### **Il dolore neuropatico**

#### **Generalità**

Il dolore neuropatico è una condizione devastante per le persone e costosa in termini economici che affligge circa il 3-8% della popolazione. Lo studio e la cura delle neuropatie periferiche e delle nevralgie è divenuto un campo importante di ricerca. Il dolore associato a queste condizioni patologiche non è stato ancora ben compreso e comunque finora non ha ricevuto il dovuto interesse nei comuni test neurologici. Il dolore originato da una neuropatia periferica o da una nevralgia, sporadico o talvolta cronico può essere resistente al trattamento.

Sono stati proposti diversi termini per definire questo tipo di dolore legato ad alterazioni delle funzioni neurologiche, ma quello che oggi si preferisce è il termine generico, appunto, di dolore neuropatico, che indica unicamente la sua origine da un'anomalia funzionale del sistema nervoso. Per nevralgia si intende correntemente un dolore nel territorio di distribuzione di uno o più nervi. Il termine va utilizzato principalmente per indicare le forme di dolore non parossistico, anche se sussistono alcune eccezioni. Con il termine di neuropatia, invece, si indica un disturbo funzionale o un'alterazione patologica del tessuto nervoso periferico. Può essere limitata a un solo nervo (mononeuropatia), a diversi nervi (neuropatia multipla) o assumere una distribuzione simmetrica e bilaterale (polineuropatia). Le neuropatie dolorose più frequenti sono quelle mononeuropatiche.

Si riconoscono varie entità eziopatogenetiche: nelle aree urbane prevalgono le forme da trauma, negli anziani è frequente quella post-herpetica mentre in clinica medica è classica quella diabetica. Le mononeuropatie più conosciute sono la post-traumatica, la post-herpetica, la diabetica, la carcinomatosa, quella da artrite reumatoide, quella da lupus eritematoso sistemico (LES), quella da "intrappolamento" e la metastatica.

Per quanto riguarda le polineuropatie sono una varietà sconcertante e sono caratterizzate dall'interessamento, selettivo e non, di vari tipi fibre; la Tabella II mostra quali tipi di neuropatia sono connessi alla perdita di un tipo particolare di fibra.

Tabella II

| tipo di perdita di fibre | neuropatia |
|--------------------------|------------|
|--------------------------|------------|

|                       |   |
|-----------------------|---|
| fibre grandi          | <b>isoniazide, pellagra</b>   |
| fibre piccole         | <b>malattia di Fabry, sensoriale dominante<br/>diabetica, amiloidosica</b>                              |
| perdita non selettiva | <b>alcolica, mielomatosa</b>  |
| perdita sconosciuta   | <b>sindrome di Guillain – Barrè, Beri-Beri<br/>arsenico, cloramfenicolo, organo fosfati,<br/>tallio</b> |

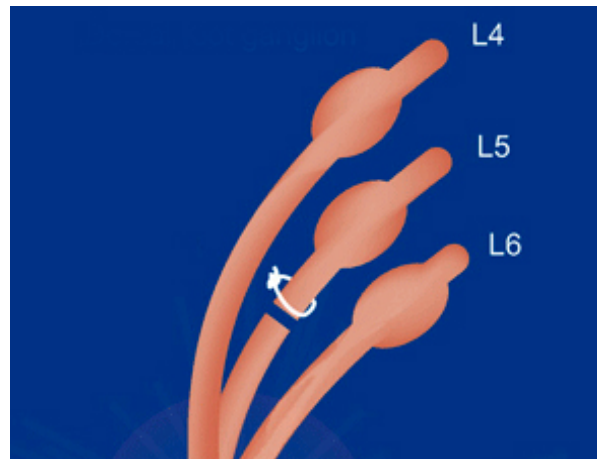
**Tabella II** – Tipi di neuropatia in relazione al tipo di fibra alterata o persa.

## **Meccanismi del dolore neuropatico**

### **Meccanismi periferici**

In condizioni normali è estremamente raro che, in assenza di una stimolazione adeguata, neuroni primari afferenti riescano a raggiungere un potenziale soglia e generare così una scarica eccitatoria. In caso di lesione nervosa, è stato dimostrato esserci un notevole incremento nell'attività di scarica spontanea nei neuroni afferenti correlati al sito della lesione [Wall e Gutnick, 1974]; tale attività spontanea è stata denominata attività ectopica. Un'indagine microneurografica effettuata in un paziente con dolore da arto fantasma ha permesso di esaminare il sito di origine delle scariche ectopiche e di dimostrare che, mentre la scarica ed il dolore evocati dalla lieve stimolazione del sito della lesione hanno un'origine locale, le scariche ed il dolore spontaneo non la possiedono [Nordin et al., 1984].

E' stato verificato che un piccolo numero di fibre A (10%) mostra oscillazioni sotto soglia del potenziale di membrana sia in assenza di stimolazioni (quiescenza), che sotto condizioni di depolarizzazione [Liu et al., 1999] e che tale attività incrementa del 23% dopo nove giorni dalla legatura serrata di alcuni nervi spinali (tight Ligation of Spinal Nerves – SNL) (Fig. 18).



**Figura 18** – Schema illustrante la modalità con la quale viene effettuata la legatura dei nervi spinali (SNL – Spinal Nerve Ligation).

Un simile incremento nelle oscillazioni di membrana sia di fibre A che di fibre C è stato in seguito notato anche da altri ricercatori [Amir et al., 1999]. Questo aumentato comportamento oscillatorio potrebbe portare ad un incremento di scariche ectopiche e a partire dal momento in cui le oscillazioni raggiungono più frequentemente il potenziale soglia si attuerebbe una “cross-eccitazione” di altri neuroni che ne amplificherebbe l’effetto. Un tale tipo di cross-eccitazione, cioè mediata chimicamente, è stata osservata anche all’interno dei DRG [Amir et al., 1996]. In condizioni normali questa cross-eccitazione sarebbe insufficiente a generare potenziali d’azione ma, come precedentemente detto, le modificazioni del potenziale di membrana potrebbero rendere possibile l’evocazione di scariche ectopiche. E’ importante notare che non c’è incremento nel livello di cross-eccitazione all’interno dei DRG in risposta a lesione nervosa ma semplicemente dell’eccitabilità dei neuroni stessi [Liu et al., 2000]. Un recente studio ha messo in evidenza eventi di cross-eccitazione tra fibre A e fibre C [Amir

e Devor, 2000]. Queste osservazioni suggeriscono che gli input di afferenze primarie possano svolgere un ruolo importante nel dolore neuropatico e nei comportamenti ad esso associati come iperalgesia ed allodinia. Diversi studi confermano tale ipotesi: somministrando sistemicamente AM1241, un agonista selettivo dei recettori cannabinoidi CB2, si ha reversione dei segni di iperalgesia termica e meccanica seguenti una SNL [Ibrahim et al., 2003]. Poiché i CB2 non sono espressi nel SNC, gli effetti sono probabilmente dovuti ad un meccanismo periferico. E' adesso riconosciuto che due popolazioni di fibre afferenti sviluppano attività ectopica in seguito a lesione nervosa: i neuroni sensoriali del nervo danneggiato e quelli facenti parte di nervi non lesionati ma che irradiano l'area lesa [Gold, 2000]. Il fatto che fibre di nervi lesionati e non, giochino un ruolo nell'insorgenza del dolore neuropatico, ha direzionato gli studi al fine di capire chi tra le due vi giochi un ruolo preminente.

In favore dell'ipotesi delle afferenze lese vi sono evidenze cliniche che suggeriscono come, in alcuni pazienti, il blocco esercitato da anestetici locali su nervi danneggiati elimini il dolore [Arner et al., 1990; Burchiel et al., 1993; Gracely et al., 1992; Koltzenburg et al., 1994]. Un supporto addizionale viene da esperimenti condotti su modelli di ratti in cui la neuropatia è stata indotta mediante legatura serrata dei nervi del V segmento lombare (L5 SNL); in tali animali la somministrazione di anestetici [Sukhotinsky et al., 2004], o tetratossina (TTX) [Liu et al., 2000] iniettata nel ganglio L5 revertiva i comportamenti neuropatici. Sorprendentemente, alcuni autori riportano che la L5 SNL induce attività spontanea nelle fibre afferenti di tipo A, ma non in quelle C, come registrato nelle emergenze dorsali L5 [Boucher et al., 2000; Liu et al., 2000]. Questi risultati fanno insorgere un dilemma poiché si pensava che l'attività spontanea delle fibre C fosse necessaria per indurre la sensitizzazione centrale che contribuisce all'iperalgesia [Ji e Woolf, 2001]. Una possibile spiegazione è che l'attività spontanea delle fibre A possa iniziare la sensitizzazione centrale dopo lesione nervosa, ammesso che le afferenze mostrino un cambiamento fenotipico. Si potrebbe avere per esempio un'espressione "de novo" di neuropeptidi normalmente espressi solo da

afferenze nocicettive, giustificando così l'aumentata immunoreattività alla SP in neuroni dei DRG di grande e media dimensione dopo assotomia [Noguchi et al., 1994]. Al contrario, studi che hanno investigato sul rilascio di SP da afferenze mielinizzate in seguito a lesione nervosa si sono rivelati inconclusivi [Allen et al., 1999; Malcangio et al., 2000]. Un'altra possibile spiegazione è che l'attività spontanea insorga in nocicettori "A $\alpha$ ", l'esistenza dei quali è stata documentata in roditori e primati [Treede et al., 1998; Djouhri e Lawson, 2004].

Esistono molti studi che suggeriscono però che i segnali originanti da nervi danneggiati non siano essenziali per l'insorgenza dell'iperalgia. Una rizotomia dorsale in L5 immediatamente prima o dopo una L5 SNL non previene né reverte comportamenti neuropatici [Eschenfelder et al., 2000; Li et al., 2000]. Decisamente rilevante è che comportamenti neuropatici sono stati osservati dopo una ganglionectomia in L5, dove le afferenze lesionate erano state rimosse completamente [Sheth et al., 2002]. Tutto ciò fa supporre che l'iperalgia possa svilupparsi in assenza di attività neuronale del nervo lesionato e gioca in favore dell'ipotesi delle afferenze intatte. In seguito a lesione nervosa periferica, sia in primati che in roditori, è stata verificata l'insorgenza di spontanea attività in afferenze nocicettive intatte non mielinizzate che innervavano lo stesso territorio delle fibre tagliate [Ali et al., 1999; Djouhri et al., 2006; Wu et al., 2001] e, sebbene la frequenza di scarica di queste fibre fosse bassa (sette potenziali d'azione/5 minuti), l'incidenza di attività spontanea era alta (50%). Essendo coinvolto quindi un numero elevato di fibre nocicettive C che convergono i loro input nel SNC, il fenomeno assume una certa importanza. Lo sviluppo di attività spontanea è stato osservato anche in afferenze mielinizzate non lesionate monitorando le emergenze dorsali in L4 [Boucher et al., 2000] e, questa attività, si originava all'interno dei DRG. Su modelli di SNL in L5 sono stati molto studiati i neuroni dei DRG in L4 per verificarne eventuali cambiamenti fenotipici; da tali osservazioni è risultata un'incrementata espressione di recettori TRPV1, TRPA1 [Katsura et al., 2006] e di mRNA per il peptide correlato al gene della calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide - CGRP) [Fukuoka et al., 1998]. Inoltre è stato

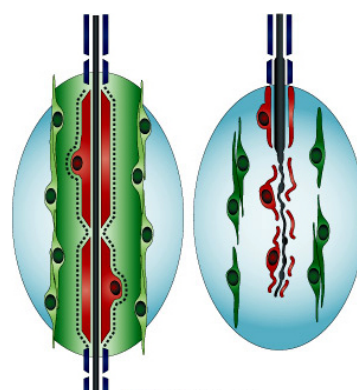


evidenziato un aumento del numero di neuroni dei DRG che esprimevano BDNF [Fukuoka et al., 2001].

In ogni modo, sia che il dolore neuropatico origini da nervi lesionati o non, la sensitizzazione a stimoli esogeni e l'eventuale attività ectopica sono conseguenza di modificazioni morfo-funzionali a carico dei neuroni di fibre che irradiano l'area danneggiata.

### **Degenerazione walleriana e neurotrofine come causa di cambiamenti fenotipici**

E' fuori discussione che in seguito a lesione nervosa il sistema immunitario svolga, nella fase iniziale, un importante ruolo nell'anormale processamento sensorio, sia a livello periferico che centrale. Zuo et al. [2003] indicarono che i mastociti venivano attivati in modelli di lesione parziale del nervo sciatico mentre Perkins [2000] e Tracey [2005] studiarono e dimostrarono un'invasione di neutrofili endoneurali all'interno del nervo lesa. Tale processo aveva il picco circa 24 h dopo la lesione. In più, alcuni studi evidenziarono una correlazione temporale tra l'invasione di macrofagi di origine sanguigna e lo sviluppo di iperalgesia e allodinia [Heumann, 1987; Myers et al., 1996; Sommer e Schafers, 1998; Cui et al., 2000; Liu et al., 2000]. Macrofagi e cellule di Schwann hanno un ruolo prominente nella degenerazione walleriana che segue al taglio di un nervo periferico (Fig.19): i primi si infiltrano nell'area lesa per rimuovere residui assonali e la mielina mentre le cellule di Schwann rimaste intatte all'interno della membrana basale della porzione distale del nervo, proliferano e cominciano a sintetizzare fattori di crescita [De Vries, 1993; Reynolds e Woolf, 1993] quali NGF, BDNF, NT-4 (Neurotrophin Type 4 receptor) [Heumann et al., 1987; Meyer et al., 1992; Funakoshi et al., 1993; Anand et al., 1997].



**Figura 19** - Fenomeno messo in evidenza nel 1850 da Waller caratterizzato dalla degenerazione e dal riassorbimento del segmento distale di un nervo quando sia stato sezionato in tutto il suo spessore.

L'NGF liberato è capace di regolare gli aspetti trofici e l'espressione genica attraverso trasporto assonale retrogrado verso il corpo cellulare [Di Stefano et al., 1992] dopo il legame con specifici recettori e successiva internalizzazione a partire dai terminali nervosi [Lewin e Barde, 1996]. Altri fattori di crescita come BDNF, NT-3, NT-4/5 (Neurotrophin Type 3 e Type4/5 receptor), presentano un alto grado di omologia nella sequenza aminoacidica con NGF [Glass e Yancopoulos, 1993; Maness et al., 1994], e mostrano basso grado di affinità per il recettore p75 [Chao et al., 1986], verso il quale si legano con eguale affinità [Rodriguez-Tebar et al., 1990 e 1992]. Sebbene lo specifico ruolo del p75 non sia stato ben compreso, è stato osservato come questo recettore interagisca con quelli ad alta affinità che appartengono alla famiglia dei recettori ad attività tirosino chinasi (Trk) [Barbacid, 1994; Chao e Hempstead, 1995]. Poiché recettori ad alta e bassa affinità sono stati trovati sulla membrana degli stessi neuroni [Verge et al., 1992], è stato ipotizzato che la loro interazione sia cruciale per il trasporto delle neurotrofine all'interno dei terminali neuronali [Gargano et al., 1997]. Sono stati identificati tre sottotipi di recettori ad alta affinità per le neurotrofine: Trk-A per l'NGF [Kaplan et al., 1991], Trk-B per il BDNF e l'NT-4/5 [Klein et al., 1989 e 1992], mentre l'NT-3 si lega preferenzialmente ai Trk-C [Lamballe et al., 1991]. Questi tre tipi sono distribuiti in modo distinto ma parzialmente sovrapposto in sottopopolazioni di neuroni sensoriali primari, dando vita ai diversi tipi di afferenze e modulandone le specifiche funzioni sensorie [McMahon et al., 1994; Wright e Snider, 1995]. Fra i fattori di crescita liberati in seguito a degenerazione walleriana, l'NGF, prodotto in grande quantità, da un lato stimola la ricrescita assonale (sprouting) del nervo danneggiato, dall'altra agisce sulle terminazioni nervose di fibre sane e sui mastociti [Griffin, 2006].

Recettori ad alta affinità Trk-A per l'NGF sono infatti normalmente espressi, non solo sulla gran parte dei neuroni sensoriali delle afferenze primarie, ma anche sulla superficie cellulare dei mastociti [Horigome et al., 1993; Tam et al., 1997] i quali, oltre alle varie citochine, sono in grado a loro volta di rilasciare NGF [Skaper et al., 2001].

E' stato inoltre verificato come l'NGF incrementi la sintesi di BDNF in circa il 90% delle cellule dei DRG che esprimono recettori Trk-A [Cho et al., 1997; Michael et al., 1997]. Il BDNF è trasportato assonalmente e svolge ruoli importanti nei processi centrali e periferici dei neuroni che esprimono Trk-A [Zhuo e Rush, 1996; Michael et al., 1997] nei quali è stato trovato all'interno di vescicole [Michael et al., 1997]. In seguito ad assotomia è stato visto come sia incrementata la sintesi ed il trasporto anterogrado di BDNF in neuroni sensitivi [James et al., 1998] ed è stato ipotizzato che esso possa agire come anterogrado messaggero trofico in quanto rilasciato nelle corna dorsali sotto l'influenza di NGF e in quanto capace di modulare il segnale nocicettivo per interazione con recettori Trk-B [Michael et al., 1997]. Ramer ed i suoi collaboratori [1995] tentarono di comprendere l'implicazione dell'NGF nella genesi del dolore neuropatico. Tre tipologie di topi sono state messe a confronto nella risposta comportamentale a stimoli meccanici e termici a seguito di costrizione del nervo sciatico (Chronic Constriction Injury - CCI): C57BL/Ola, che mostravano una delezione nel gene responsabile della messa in atto della degenerazione walleriana, C57BL/J, topi "normali" di controllo, e C57BL, topi transgenici che sovraesprimevano un "glial fibrillary acidic protein-driven NGF gene". I risultati misero in luce un forte incremento della risposta nocicettiva degli animali transgenici indicando l'NGF come un componente che prende parte allo sviluppo dei comportamenti associati al dolore in questo modello animale di neuropatia. In un nervo parzialmente danneggiato le fibre degli assoni intatti potrebbero essere esposti ad elevati livelli di NGF, molto più di quanto avviene in una normale infiammazione e con la differenza che l'origine dell'NGF sarebbe nelle immediate vicinanze dell'area di degenerazione, dando quindi luogo a "sprouting" che reinnerverebbero in modo assolutamente caotico i diversi organi (pelle, muscoli,

etc.). E' stato infatti dimostrato che somministrazioni intratecali di NGF inducono lo sprouting delle fibre nervose periferiche con successivo stato iperalgico [Pertens et al., 1999] e che somministrazioni locali di anti-NGF riducono lo sprouting delle fibre nei DRG [Ramer e Bisby, 1999; Ro et al., 1999; Streppel et al., 2002] e l'iperalgesia associata a CCI. Diversamente dalla gran parte dei neuroni di afferenze primarie, circa un terzo di questi, (soprattutto neuroni di piccolo diametro [Bennett et al., 1998]) identificabile attraverso il binding della lectina IB4, non esprime recettori Trk, ma solamente recettori per il "glial derived-neurotrophic factor" (GDNF) [Lin et al., 1993] che ne regola gli aspetti trofici. E' possibile fare una distinzione su basi anatomiche e funzionali tra neuroni dei DRG regolati da NGF e da GDNF [Snider e McMahon, 1998], infatti, mentre i primi esprimono SP e CGRP e terminano nella lamina I e nella parte esterna della II, i secondi esprimono una distinta serie di molecole come la "fluoride-resistant acid phosphatase" (FRAP), la glicoproteina legante l'IB4 ed i purinorecettori ionotropici P2X3 e terminano nella parte interna della lamina II [Bradbury et al. 1998; Vulchanova et al. 1998]. Il secondo gruppo di neuroni differisce inoltre per una più lunga durata del potenziale d'azione, una più elevata densità di correnti dei canali resistenti alla tetrodotossina (TTX) e minori correnti indotte da stimoli termici [Stucky e Lewin, 1999].

L'azione dei fattori di crescita su fibre nervose, in particolare di NGF ha come evidenza pratica un aumento dell'espressione di SP, CGRP, BDNF, TRPV1 e TRPA1 in neuroni esprimenti recettori Trk-A dei DRG dopo lesione nervosa parziale [Fukuoka et al., 2001; Obata et al., 2004; Cortright e Szallasi, 2004]. Di particolare importanza è poi il riarrangiamento e l'espressione *de novo* di canali per il sodio sia nell'area lesa [Devor, 2006] che sul corpo cellulare [Black et al., 1999]. Una maggiore espressione di tali canali, unita ad una diminuzione della soglia di scarica, potrebbe essere alla base di fenomeni come iperalgesia e allodinia. Che i canali per il sodio siano implicati nelle neuropatie lo si capisce da evidenze cliniche in cui la somministrazione di farmaci che vi agiscono diminuiscono notevolmente il dolore associato a tali forme: per esempio la carbamazepina, stabilizzante dello stato inattivo dei canali per il sodio è il farmaco di scelta per

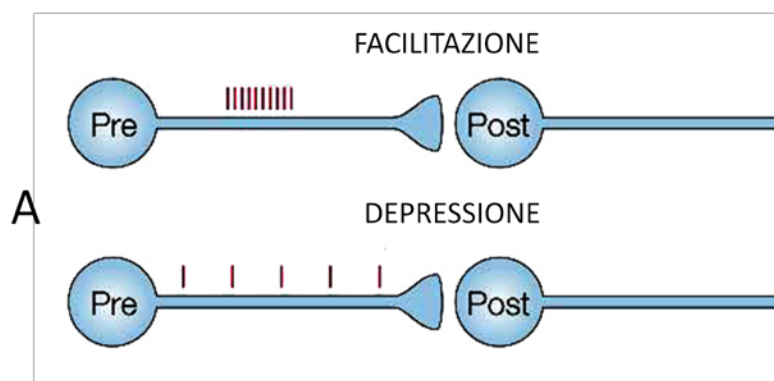
neuralgia del trigemino e bloccanti dei suddetti canali come la lidocaina, sono risultati efficaci nella terapia del dolore neuropatico [Tremont-Lukats et al., 2006]. Vi sono molti tipi di canali per il sodio voltaggio dipendenti espressi dai neuroni dei DRG, in particolare i  $Na_v$  1.3, 1.7 (TTX sensibili), 1.8 e 1.9 (TTX resistenti) sono stati evidenziati in cellule di piccole dimensioni all'interno dei DRG suggerendo quindi un loro possibile ruolo nella generazione del potenziale d'azione e conduzione in nocicettori [Campbell e Meyer, 2006]. Canali TTX sensibili sono espressi in tutto il SNC e principalmente in neuroni di fibre A nei DRG, mentre canali TTX resistenti sono stati trovati unicamente nelle piccole fibre C associate alla nocicezione [Akopian et al., 1996]. E' stato dimostrato come in seguito a lesione nervosa periferica ci sia una riorganizzazione della natura e dell'espressione dei vari canali [Waxman et al., 1994]. Più precisamente è stata verificata una sovraregolazione dei  $Na_v$  1.3 TTX sensibili all'interno dei DRG [Black et al., 1999] e un incremento dell'espressione dei  $Na_v$  1.8 nella zona danneggiata [Coward et al., 2001; Yangou et al., 2000]. Cummins and Waxman [1997] hanno dimostrato che nei DRG, successivamente ad assotomia del nervo sciatico, si ha una riduzione della densità di corrente dei TTX resistenti, ma anche un aumento della velocità di ripresa delle correnti dei TTX sensibili di ben quattro volte superiore. Esperimenti simili in modelli CCI hanno dimostrato la stessa ridotta corrente dei TTX resistenti ma anche uno spostamento del potenziale soglia verso valori più negativi [Dib Hajj et al., 1999; Kral e Xiong, 1999]. Per ciò che riguarda i  $Na_v$  1.8 è stato verificato che sono espressi da più del 50% di fibre C e da circa un 10% di fibre A [Amaya et al., 2000] e che contribuiscono alle correnti interne durante la generazione del potenziale d'azione in neuroni sensoriali di piccolo diametro [Renganathan al., 2001].  $Na_v$  1.8 contribuiscono al dolore neuropatico [Porreca et al., 1999; Joshi et al., 2006] e sono regolati in fibre C da NGF o GDNF. Poiché molte di queste fibre esprimono TRPV1 si suppone che tali canali abbiano un certo ruolo nell'iperalgia termica. In più, il fatto che siano espressi da fibre A e che vi siano dati mostranti che il blocco delle loro funzioni riduce la nocicezione di stimoli meccanici intensi, prova evidenza che l'attivazione dei  $Na_v$  1.8 contribuisce alla normale sensibilità verso

stimolazioni nocive meccaniche [Michael et al., 2007]. Sembra dunque chiaro come cambiamenti di espressione e di localizzazione dei canali per il sodio voltaggio dipendenti siano centrali nella generazione di potenziali d'azione spontanei.

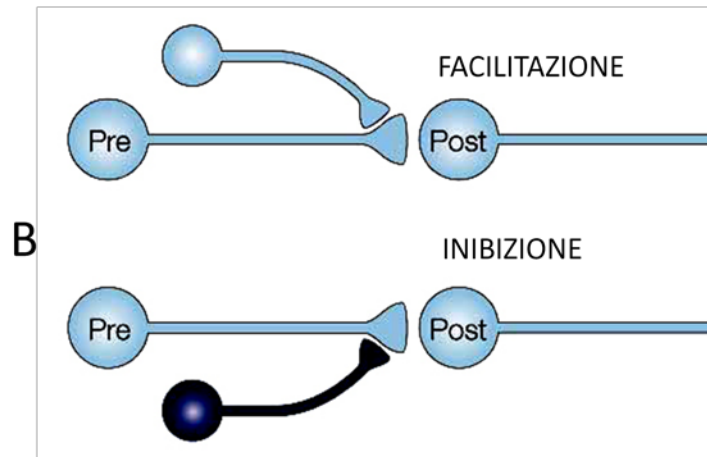
### Sensitizzazione centrale

La sensitizzazione centrale si riferisce ad un'incrementata risposta al segnale da parte dei neuroni centrali. Come vedremo, responsabili di tale fenomeno sono neuroni delle corna dorsali, centri talamici e corticali.

La sensitizzazione centrale coinvolge meccanismi omosinaptici ed eterosinaptici [Magerl et al., 1998; Woolf et al., 1998]. Una sensitizzazione omosinaptica significa che lo stimolo condizionante e lo stimolo "test" coinvolge lo stesso input. Nei neuroni delle corna dorsali è evidente nel fenomeno del wind-up (sensitizzazione di breve durata), dove una stimolazione continua a bassa frequenza di fibre C porta ad un'incrementata risposta nelle cellule delle corna dorsali (Fig. 20 A). Sensitizzazione eterosinaptica significa altresì che stimolo condizionante e stimolo "test" coinvolgono differenti gruppi di fibre (Fig. 20 B). La sensitizzazione eterosinaptica concorre al manifestarsi di condizioni allodiniche dove input nocicettivi sono in grado di alterare l'efficacia sinaptica a tal punto da far acquisire la capacità di evocare risposte dolorose a meccanorecettori A $\beta$  (Campbell e Meyer, 2006).



B



**Figura 20** – Schemi illustranti la sensitizzazione omosinaptica (A) ed eterosinaptica (B).

Vi sono ampie evidenze che indicano come entrambe le forme di sensitizzazione siano coinvolte nel dolore neuropatico [Campbell et al., 1998; Ji et al., 2003]. Campbell e Meyer [2006] hanno proposto un interessante modello per comprendere come queste possano avvenire in modelli neuropatici L5 SNL. Fibre mielinate lesionate emergenti in L5 sviluppano spontanea attività e, parte di tale attività potrebbe essere implicabile a meccanorecettori A $\beta$  (che hanno acquisito la capacità di rilasciare SP) o a nocicettori A $\delta$ . Gli input generati da tali fibre potrebbero portare ad una omosinaptica sensitizzazione e ad un'incrementata attività insorgente dal segmento L5. L'incrementata attività delle cellule del tratto spino talamico L5 potrebbe giocare un ruolo nell'insorgenza della sensazione dolorifica. Le afferenze lesionate in L5 potrebbero anche proiettare verso le adiacenti L4 dove produrrebbero una sensitizzazione eterosinaptica verso input provenienti dal segmento L4. Ciò potrebbe concorrere all'instaurarsi dell'iperalgia verso stimoli meccanici e termici segnalata dall'attività nelle afferenze intatte L4 in modelli SNL L5. Le due forme di sensitizzazione possono essere considerate conseguenza di un incrementato rilascio di neurotrasmettitori eccitatori (per esempio SP, glutammato) e/o di un'incrementata efficacia sinaptica che, a loro volta, possono essere correlati ad alcuni alterati meccanismi cellulari [Basbaum, 1999]: cambiamenti pre-sinaptici, cambiamenti post-sinaptici, modificazioni a carico di

interneuroni, cambiamenti nella modulazione discendente ed interazione con la microglia. Fenomeni di wind-up ed LTP, verificati in neuroni delle corna dorsali ed in quelli di centri superiori in seguito ad anormale attività delle afferenze primarie uniti a LTD in cellule di sistemi inibitori, sono conseguenze della sensitizzazione omo- ed eterosinaptica e possono spiegare l'alterata percezione dolorifica presente nelle neuropatie.

### **Modificazioni pre-sinaptiche**

Come è già stato precedentemente detto, il glutammato è il principale neurotrasmettitore delle afferenze primarie ed il suo rilascio nel vallo sinaptico è regolato oltre che dalla depolarizzazione indotta da stimoli di varia natura, anche da meccanismi pre-sinaptici che coinvolgono recettori metabotropici accoppiati a proteine G. Tra questi, vi sono recettori oppioidi  $\mu$ , gaba-B e recettori per l'adenosina, tutti accoppiati a proteine  $G_i$  e quindi aventi un ruolo inibitorio sul rilascio di glutammato. Ciò che si evince da studi condotti su tali recettori è una sensibile sottoregolazione dei recettori oppioidi  $\mu$  a livello sia pre- che post-sinaptico in seguito a lesione nervosa [Kohno et al., 2005] ed una diminuita attività GABAergica causata da alterazione della via modulatoria discendente (vedi capitolo 1) [Silviotti e Woolf, 1994]. In favore di quest'ultima ipotesi vi sono studi che dimostrano da un lato, come la somministrazione intratecale di agonisti GABAergici in modelli SNL porti ad una riduzione dose-dipendente dell'allodinia associata [Hwang e Yaksh, 1997], dall'altro, che in seguito a lesione nervosa periferica si verifica un decremento della concentrazione extracellulare di GABA [Stiller et al., 1996]. Per quanto concerne il ruolo dei recettori purinergici per l'adenosina, è stata dimostrata la loro espressione sia a livello pre- che post-sinaptico [Santicioli et al., 1992] e possono avere un ruolo anti-nocicettivo attraverso un'indiretta interazione con il rilascio di aminoacidi eccitatori [Corradetti et al., 1984]. Da notare con interesse è la sovraregolazione della subunità  $\alpha$ -2- $\delta$  dei canali per il calcio sia a livello dei DRG che a livello spinale [Li et al., 2004]. Questo fatto potrebbe legarsi con l'incrementato ingresso di calcio, con il conseguente aumentato rilascio di glutammato e spiegherebbe l'efficacia



nel trattamento neuropatico di gabapentin e pregabalin (prodotti capaci di legare e bloccare tale subunità) [Bian et al., 2006; Freynhagen et al., 2005]. Altri studi dimostrarono poi un diretto coinvolgimento della tipologia N di tali canali in manifestazioni iperalgiche ed allodinicche [Xiao e Bennett, 1995] mentre nessun ruolo è stato evidenziato per canali di tipo P e Q [White e Cousins, 1998]. Infine, Noguchi et al. [1994] hanno verificato un cambiamento fenotipico di fibre A- $\beta$  che in seguito a lesione nervosa iniziano ad esprimere SP. Come conseguenza, la stimolazione di queste fibre porterebbe al rilascio di SP, dando un ulteriore contributo alla sensitizzazione dei neuroni delle corna posteriori.

### **Modificazioni post-sinaptiche**

Le sinapsi glutammatergiche a livello delle corna dorsali si sono dimostrate eterogenee [Li e Zhuo, 1998; Li et al., 1999; Bardoni et al., 1998; Wang e Zhuo, 2002], ovvero sono stati identificati in esse, sia recettori NMDA che AMPA che KA post-sinaptici. Non di secondaria importanza è poi il fatto che in caso di stimolazioni intense vengano registrate correnti post-sinaptiche di buona intensità mediate da SP e NKA che a loro volta, per interazione con recettori NK-1 ed NK-2, contribuiscono all'eccitabilità dei neuroni delle corna dorsali [Li e Zhuo, 2001]. Abbiamo già detto che è stato ampiamente dimostrato un incremento del responso alle stimolazioni dei neuroni delle corna dorsali in seguito a lesione nervosa periferica e come ciò sia imputabile a fenomeni come il wind-up e la LTP seguenti a modificazioni morfo-funzionali dei neuroni stessi. Il potenziamento a lungo termine (LTP) sembra essere il principale responsabile della sensitizzazione centrale e fenomeni di LTP si possono riscontrare sia a livello spinale che corticale [Zhuo, 2007]. Esistono numerose prove in favore di un importante coinvolgimento di recettori NMDA in fenomeni di LTP [Doubell et al., 1999]. Davar e colleghi [1991] hanno descritto meccanismi preventivi nei confronti di iperalgesia conseguente a CCI attraverso la somministrazione intratecale di MK-801, un antagonista NMDA, sia pre- che post lesione. Successivamente è stato infatti dimostrato un suo effetto anti-iperalgico dose dipendente [Mao et al., 1992]. Recenti studi hanno evidenziato come la LTP si

attui soltanto in alcune cellule spinali e in particolare, si è dimostrato come i neuroni non esprimenti recettori per la SP, non danno potenziamento [Ikeda et al., 2003].

E' possibile quindi supporre che entrambi i recettori NMDA ed NK (1/2) siano necessari per indurre LTP a livello spinale. LTP può essere indotta e/o espressa attraverso meccanismi pre-sinaptici [Mellor et al., 2002] o post-sinaptici [Nicoll, 2003; Malinov, 2003] o da una loro combinazione. Vi sono chiare evidenze per una forma di LTP post-sinaptica calcio dipendente nei neuroni spinali situati nella lamina I. L'induzione di LTP in sinapsi di fibre C richiede una coattivazione di recettori NK-1 ed NK-2 [Liu et al., 1997], l'attivazione di recettori NMDA [Ikeda et al., 2003; Ikeda et al., 2006; Liu e Sandkuhler, 1995], l'apertura dei canali per il calcio di tipo T [Ikeda et al., 2003; Ikeda et al., 2006] e l'attivazione del gruppo I ma non del II e III dei recettori metabotropici glutammatergici [Azkue et al., 2003].

L'attivazione dei recettori NK-1 per interazione con SP potrebbe direttamente incrementare l'apertura del singolo canale NMDA e, di conseguenza, delle correnti mediate dai recettori NMDA nei neuroni della lamina I [Ikeda et al., 2003]. Tutto questo porterebbe ad un sostanziale aumento del calcio intracellulare. Non è ben chiaro se per l'induzione di questo tipo di LTP siano necessari recettori AMPA, anche se vi sono evidenze di un incremento dell'espressione di tali recettori sulla superficie delle corna dorsali [Harris et al., 1996]. In ogni caso l'aumento del calcio intracellulare è essenziale per l'induzione di LTP e la grandezza di tale aumento è correlato linearmente alla magnitudine di LTP *in vitro* [Ikeda et al., 2003]. Recenti dati dimostrano che lo stimolo inducente LTP causa un sostanziale aumento di calcio intracellulare nei neuroni della lamina I non solo in preparati ma anche in animali intatti [Bliss e Collingridge, 1993; Malenka e Bear, 2004]. In conseguenza a tutto ciò non sorprende che si verifichi l'attivazione della PKC, della calcio-calmodulina-dipendente protein chinasi II (CaMKII), della PKA, della fosfolipasi C (PLC), di recettori per l'inositoltrifosfato-3 (IP<sub>3</sub>), dell'ossido nitrico sintetasi (NOS) e di membri della famiglia del mitogen-activated protein kinase (MAPK), inclusa l'extracellular signal-regulated kinase

(ERK) [Ikeda et al., 2003; Ikeda et al., 2006; Wei et al., 2006; Zhang et al., 2005; Yang et al., 2004].

### **Meccanismi di disinibizione**

I neuroni inibitori svolgono un importante ruolo nel controllo della sensibilità dei neuroni delle corna dorsali [Gu et al., 1996]. Da un lato, un decremento dei recettori inibitori su terminali afferenti primari e su neuroni post-sinaptici è stato notato in seguito a lesione nervosa [Kohno et al., 2005], dall'altro, fenomeni di LTD potrebbero essere evocati dall'attivazione di recettori NMDA presenti sulle cellule GABAergiche che presentano una differente espressione delle subunità [Salter, 2006]. Inoltre è stato osservato un aumento rilevante dei fenomeni apoptotici negli inter-neuroni GABAergici [Moore et al., 2002] in seguito a lesione nervosa periferica [Suzuki et al., 2005]. Tutto ciò porterebbe ad una profonda alterazione dei circuiti neuronali spinali [Scholz et al., 2005] e di conseguenza ad una facilitazione della sensitizzazione centrale.

### **Meccanismi modulatori discendenti**

Abbiamo già detto come l'RVM sia luogo fondamentale per la modulazione discendente del dolore dal momento che riceve stimoli corticali, talamici e periacqueduttali [Moore et al., 2002]. E' logico supporre che la sensitizzazione centrale seguente a neuropatie possa coinvolgere tale centro, magari con modificazioni plastiche dei neuroni in esso locati. Alcuni studi hanno infatti evidenziato come neuroni del RVM presentino cambiamenti plastici durante e dopo lesione tissutale, e come la facilitazione discendente venga attivata e contribuisca all'iperalgia secondaria dovuta a sensitizzazione centrale [Calejman et al., 1998; Robinson et al., 2002]. Come supposto, il blocco della facilitazione discendente attraverso lesione dell'RVM o tramite blocco dei recettori serotoninergici spinali è risultato essere antinocicettivo [Urban e Gebhart, 1999; Porreca et al., 2001; Robinson et al., 2004].

### **Meccanismi sopraspinali**

Recenti studi hanno dimostrato come in condizioni di allodinia ed iperalgesia si abbiano cambiamenti nel processamento di stimoli cutanei da parte dei centri sopraspinali. Se da tali studi una stimolazione meccanica della pelle porta ad un'incrementata attivazione di aree associate alla percezione del dolore [Baron et al., 1999; Maihofner et al., 2004], in altri si è evidenziata attivazione anche di aree motorie e cognitive [Mainhofner et al., 2006; Schweinhardt et al., 2006]. Se questi cambiamenti nel processamento soprspinale siano passivi o se riflettano addizionali meccanismi di plasticità non è stato ancora compreso [Campbell e, Meyer 2006].

## ***Capitolo 4***

### **Trattamento del dolore neuropatico**

Attualmente, non vi è una cura per il dolore neuropatico, ma vengono impiegati farmaci e combinazioni terapeutiche provenienti da aree patologiche diverse.

L'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) nel 1986 ha stabilito la cosiddetta **“scala analgesica a tre gradini”**, il cui principio base è, appunto, la gradualità della terapia del dolore: l'approccio farmacologico deve essere sequenziale e deve adattarsi e essere proporzionato all'intensità del dolore, così come viene riportato dal paziente. La corretta applicazione delle linee guida OMS consente a quasi il 90% dei pazienti di trovare sollievo al proprio dolore, a prescindere dai trattamenti intrapresi e dall'ambiente sociale e culturale. Solo nel caso in cui tale approccio risulti inefficace, sono raccomandate sia la somministrazione spinale di farmaci analgesici oppiacei (nei pazienti con dolore non controllabile, dolore neuropatico o con effetti collaterali intollerabili), sia l'applicazione di procedure neuroinvasive, come la cordotomia percutanea cervicale e i blocchi neurolitici (terapia del dolore su [www.startoncology](http://www.startoncology)). In Italia le linee guida dell'OMS non vengono però generalmente seguite. Il nostro paese continua, infatti, a collocarsi agli ultimi posti della classifica europea per quanto riguarda la prescrizione della morfina e più in generale degli oppioidi.

### **Analgesici di I gradino**

I farmaci non oppiacei, quali i FANS (farmaci antinfiammatori non steroidei) o il paracetamolo, fanno parte del I gradino della scala OMS e sono raccomandati per il trattamento del dolore di intensità lieve [McNicol et al., 2005]. Nessuno studio ha sinora fornito dati conclusivi sul farmaco non-oppiaceo più efficace nel controllo del dolore oncologico, così come restano anche da definire dosi e via di somministrazione. Ogni paziente può rispondere in modo diverso al trattamento con questi farmaci, perciò la scelta della terapia dovrà basarsi su una precedente risposta positiva del paziente a un particolare analgesico. Solitamente, l'impiego di soli FANS a scopo analgesico è indicato per periodi di 3-5 settimane, a causa della mancanza di efficacia di tali farmaci per periodi più lunghi e degli effetti collaterali prodotti dal loro utilizzo cronico a piene dosi. Con l'aumentare dell'intensità del dolore e in assenza di un efficace controllo del dolore si passa all'utilizzo degli oppiacei.

## **Analgesici di II gradino**

Il II gradino della scala OMS comprende gli oppiacei “minori”, di cui fanno parte la codeina, diidrocodeina, tramadolo e dextropropoxifene. Diversamente dal ruolo degli oppiacei “maggiori”, universalmente riconosciuti per il trattamento del dolore da moderato a severo, non esiste un consenso generale rispetto al ruolo degli oppiacei “minori” nel trattamento del dolore da lieve a moderato. Gli aspetti controversi sono i seguenti: sono stati prodotti dati insufficienti per dimostrare l'efficacia di questi farmaci; sono stati condotti pochi studi che dimostrino un reale vantaggio rispetto all'utilizzo degli oppiacei “maggiori”; i farmaci del secondo gradino sono spesso commercializzati in combinazione con un non-oppiaceo (paracetamolo, aspirina o FANS), che ne limita la dose; sono farmaci spesso costosi rispetto al beneficio garantito.

Una delle questioni più discusse consiste proprio nella reale differenza, in termini di grado di analgesia e tollerabilità, tra oppiacei “minori” e basse dosi di oppiacei “maggiori”, in caso di dolore lieve-moderato. I risultati di alcuni studi indicano infatti che il passaggio diretto dai farmaci non-oppiacei agli oppiacei “maggiori” consente una riduzione del numero dei giorni con dolore di intensità medio-alta (valori da 5 a 7 in una scala da 0 a 10), riduzione che risulta però associata a un incremento di complicanze come anoressia e stipsi.

## **Analgesici di III gradino**

Gli oppioidi “maggiori” sono i farmaci del III gradino e sono indicati per il trattamento del dolore severo. Presentano una potenza farmacologica elevata e un rapporto dose-effetto lineare, che permette un incremento della dose in funzione dell'intensità del dolore. I più usati in terapia analgesica sono la morfina, la buprenorfina, il fentanyl, l'ossicodone, il metadone, la diidrocodeina, l'ossimorfone, l'idromorfone e l'idrocodone [Chou et al., 2003].

Il farmaco di elezione tra gli oppiacei “maggiori” è la morfina somministrata per via orale. Oltre che per bocca, può essere somministrata per via sottocutanea o, in tutti quei casi in cui la somministrazione sottocutanea è controindicata e nei pazienti già portatori di un catetere venoso, per via endovenosa. Per i pazienti in

trattamento con dosi regolari di morfina è preferibile il ricorso alla somministrazione sottocutanea continua.

Esistono però valide alternative alla morfina:

- il metadone, nei pazienti che non rispondono alla terapia con morfina o altri oppiacei o in loro sostituzione nel caso in cui questi causino effetti collaterali, quali mioclono, sedazione, confusione, nausea e vomito. La somministrazione di metadone richiede però una maggiore precauzione rispetto alla morfina in quanto, in caso di dosi troppo elevate o di intervalli di dosaggio troppo brevi in un periodo prolungato, sono possibili problemi di tossicità che possono portare a effetti collaterali quali per esempio l'alterazione del respiro e del ritmo cardiaco [Taylor et al., 2000].

- l'idromorfone, in pazienti che richiedono alte dosi di morfina (la potenza analgesica dell'idromorfone è circa 5 volte superiore alla morfina), o che riscontrano una scarsa diminuzione del dolore, effetti collaterali o che non rispettano una terapia che preveda più somministrazioni giornaliere di oppiacei [Chou et al., 2003].

- l'ossicodone, disponibile nella formulazione a rilascio lento e in quella a rilascio immediato, quest'ultima in combinazione con paracetamolo.

- gli oppiacei transdermici (ovvero somministrati mediante l'applicazione di un cerotto che contiene l'oppiaceo in questione), offrono un'interessante alternativa alla morfina orale nei casi di dolore oncologico stazionario, cronico. Rispetto alla morfina, il fentanil transdermico (TTS) sembra infatti causare meno effetti collaterali a carico del tratto gastrointestinale, con particolare riferimento alla stipsi. Naturalmente, questa formulazione è controindicata nel controllo del breakthrough pain, in quanto il farmaco viene rilasciato in maniera lenta e continua dal cerotto [Milligan et al., 2001]. Un altro candidato ideale per la somministrazione tramite cerotto transdermico è la buprenorfina.

- il fentanil transmucosale (OTFC), nella formulazione in pastiglie orosolubili, che consente un rilascio immediato del farmaco. L'effetto analgesico può essere ottenuto nell'arco di 5-10 minuti. Il suo impiego è limitato esclusivamente al

trattamento del breakthrough pain in pazienti già in terapia di base con un oppiaceo maggiore per il dolore cronico [Chou et al., 2003].

Tuttavia, l'uso di questi analgesici ha provocato controversie a causa del potenziale abuso da parte dei pazienti, che sono predisposti alla dipendenza, ma è raro che un malato affetto da dolore cronico sviluppi una vera e propria dipendenza. Come per altri farmaci neuroattivi, gli oppiacei devono essere usati in base al singolo caso e devono essere interrotti qualora si dimostrino inefficaci o qualora gli effetti collaterali non siano tollerati.

### **Farmaci adiuvanti del dolore neuropatico**

Accanto ai farmaci dei tre gradini vengono spesso adoperati farmaci denominati adiuvanti analgesici, i quali nascono con altre indicazioni terapeutiche ma possono migliorare l'analgesia o ridurre gli effetti collaterali indotti agli analgesici.

### **Farmaci Antidepressivi**

L'Amitriptilina è uno dei più vecchi e dei più comuni antidepressivi triciclici (TCAs) usati per la nevralgia post-erpetica (PHN) e la neuropatia diabetica [Farrar et al., 2001]. Questo farmaco esercita un'inibizione noradrenergica e serotonergica della ricaptazione procurando un'attività analgesica e un'elevazione dell'umore. L'Amitriptilina è anche associata a significativi effetti collaterali anticolinergici non tollerati da alcuni pazienti, inclusa la tachicardia in pazienti in età avanzata, ritenzione urinaria e secchezza delle fauci. Usato in sperimentazioni cliniche controllate, il farmaco Nortriptyline, ha mostrato di essere efficace nel trattamento della nevralgia post-erpetica, come l'amitriptilina ma con effetti collaterali minori. Gli effetti collaterali più comuni dei farmaci antidepressivi triciclici (TCAs) comprendono la secchezza delle fauci, la sonnolenza, l'aumento di peso corporeo, la stipsi e disturbi della memoria. Effetti collaterali meno comuni comprendono la ritenzione urinaria, l'ipotensione ortostatica (ovvero sensazione di svenimento in posizione verticale), tachicardia



e disturbi dell'accomodazione visiva (difficoltà di mettere a fuoco) [Max et al., 1987, 1988, 1992; Watson et al., 1998].

Gli inibitori selettivi di ricaptazione della serotonina (SSRIs) sono anch'essi impiegati di frequente per il trattamento del dolore cronico, tuttavia non sembrano avere proprietà analgesiche dirette. Con minori effetti collaterali ed efficaci effetti antidepressivi, sono coadiuvanti nel trattamento delle conseguenze psicologiche del dolore cronico che rinforzano ed aggravano il livello di percezione del dolore. Gli SSRIs come il citalopram, la fluoxetina, la fluvoxamina, la paroxetina e la sertralina hanno effetti collaterali di gran lunga minori rispetto a quelli dei TCA. Altri antidepressivi che anch'essi sulla ricaptazione del sistema norepinephrinico o noradrenergico includono il bupropione, la maprotilina, la mirtazapina, il nefazodone, il trazodone e la venlafaxina [Pernia et al., 2000; Sumpton et al., 2001]. In particolare la Venlafaxina ha mostrato in seguito a recenti casi studio riportati effetti benefici nel trattamento del dolore neuropatico. Gli SSRI hanno pochi effetti collaterali seri, ma possono provocare sonnolenza, variazioni del peso corporeo e alcuni disturbi della memoria [Farrar et al., 2001].

### **Farmaci Antiepilettici**

I farmaci antiepilettici (AEDs), sono utili per il trattamento del dolore neuropatico e della emicrania [Bergey et al., 2000]. Il meccanismo di azione degli antiepilettici AED nel trattamento del dolore neuropatico non è ben chiaro. Il loro effetto sull'attività cellulare sembra includere la modulazione dei canali ionici (del sodio) o l'alterazione della produttività, del rilascio, della ricaptazione e/o della rottura dei trasmettitori. Anche l'effetto sull'attività dei neuroni risulta essere oscuro e include la soppressione della scarica parossistica, la riduzione dell'iperattività dei neuroni, e l'eliminazione di residui aberranti. I farmaci antiepilettici AED agiscono sia sul sistema nervoso centrale che su quello periferico. I farmaci antiepilettici (AED) di prima generazione sono la carbamazepina, la fenitoina e l'acido valproato. La carbamazepina era inizialmente impiegata per il trattamento della nevralgia del trigemino (TN) ed è

stato il trattamento standard di punta per la TN, per molti anni. La seconda generazione di farmaci antiepilettici AED includono il gabapentin, la lamotrigina, il levetiracetam, l'oxcarbamazepina (un metabolita della carbamazepina), la tiagibina, il topiramato e la zonisamide [Rowbotham et al., 1998]. In generale, la seconda generazione di antiepilettici AED ha il vantaggio di un miglior profilo degli effetti collaterali.

Gli effetti collaterali gravi causati all'impiego di farmaci antiepilettici includono tossicità epatica (carbamazepina e valproato), la Sindrome di Stevens-Johnson (lamotrigina, fenitoina e zonisamide), l'anemia aplastica (carbamazepina) e la teratogenesi (carbamazepina, valproato e probabilmente altri). Gli effetti collaterali lievi e maggiormente frequenti sono capogiri e l'atassia, sonnolenza e disturbi cognitivi, nausea/vomito e aumento del peso corporeo. Tuttavia, il topiramato in alcuni soggetti è stato associato con una diminuzione del peso corporeo cosa che potrebbe essere utile per il trattamento di pazienti sovrappeso o obesi affetti con dolore neuropatico. Il topiramato, il levetiracetam e il gabapentin non sembrano causare la tossicità epatica. La tossicità epatica e l'anemia possono essere particolarmente problematiche nel trattamento del dolore in malati di cancro [Farrar et al., 2001].

### **Neuropatia indotta da agenti chemioterapici**

Il coinvolgimento del sistema nervoso in corso di malattia neoplastica è molteplice: infatti il tumore può ledere direttamente, ad esempio infiltrando o comprimendo nervi e/o radici nervose, può provocare un danno indiretto (che si ritiene nella maggior parte dei casi immuno-mediato) di tipo "paraneoplastico", oppure i farmaci antineoplastici possono essere essi stessi neurotossici. L'effetto diretto della neoplasia nei confronti del SNP non è raro, ma viene in genere facilmente diagnosticato ed il trattamento efficace della malattia di base produce un effetto rilevabile. Al contrario, gli effetti paraneoplastici e la neurotossicità dei farmaci antineoplastici rappresentano ancora un rilevante problema clinico.

La neuropatia da farmaci antineoplastici (CIPN) è una complicanza frequente del trattamento con diversi tipi di chemioterapici, e la sua incidenza è sicuramente

molto superiore rispetto a quella delle sindromi paraneoplastiche [Kannarkat et al., 2007]. La CIPN è un effetto collaterale rilevante di diversi farmaci in uso clinico comune quali i platino-derivati, i taxani ed i derivati della vinca, ma rappresenta anche un importante problema clinico per le due più recenti ed efficaci classi di farmaci antineoplastici in fase di sperimentazione clinica: gli inibitori del proteosoma (bortezomib) e gli eptiloni. Va inoltre considerato che alcuni di questi farmaci vengono comunemente utilizzati in combinazione, aumentando così il rischio della loro neurotossicità. In molti casi la CIPN è la causa dell'interruzione di un trattamento chemioterapico, la cui prosecuzione, al contrario, potrebbe essere alla base di una guarigione del paziente.

Da un punto di vista strettamente clinico, i quadri più frequentemente determinati dalle sostanze antineoplastiche neurotossiche sul sistema nervoso periferico sono due: 1) una neuropatia esclusivamente sensitiva, espressione in realtà di una neuronopatia a carico dei neuroni del ganglio spinale ed associata ad una atassia potenzialmente grave (i maggiori responsabili sono i platino-derivati); 2) una neuropatia di tipo misto sensitivo-motorio, in genere secondario ad una sofferenza delle fibre del nervo periferico e prevalentemente assonale (le due classi implicate sono i taxani e gli alcaloidi della vinca).

## **Taxani**

I taxani sono diterpeni prodotti a partire dalle piante del genere *Taxus* che agiscono quali agenti stabilizzanti dei microtubuli, somministrati per via endovenosa, che interferiscono con i fusi mitotici durante la mitosi cellulare (Fig. 20).



**Figura 20** -*Taxus baccata*

Questa classe include: paclitaxel, docetaxel e una nuova formulazione di paclitaxel legata all'albumina [Kannarkat et al., 2007]. Essi sono largamente usati in alcuni dei più importanti tumori solidi, quali cancro alla prostata, al seno e ai polmoni, spesso in associazione a composti platino-derivati. I sintomi più ricorrenti riportati dai pazienti includono parestesie tipo formicolio e disestesie anche di tipo urente a mani, braccia e gambe. In casi gravi si possono manifestare anche neuropatie periferiche motorie che determinano ipostenia dei settori distali degli arti. I sintomi sono generalmente reversibili, ma possono durare anche diversi mesi o anni prima di scomparire definitivamente.

### **Alcaloidi della vinca**

Gli alcaloidi della vinca sono un sottogruppo di farmaci derivanti dalla *Catharanthus roseus* (o *Lochnera rosea* o *Ammocallis rosea*), detta comunemente pervinca del Madagascar (Fig. 21), che inibiscono la polimerizzazione dei microtubuli. Questa classe include: vincristina, vinblastina e vinorelbina. Vincristina, il più antico e neurotossico di questa classe, è ancora molto utilizzato in leucemie, sarcomi e linfomi. La CIPN è l'effetto tossico dose-dipendente più comune della vincristina. I sintomi si estendono da perdita sensorio-motoria a disfunzioni del Sistema Nervoso Autonomo collegate a ileo

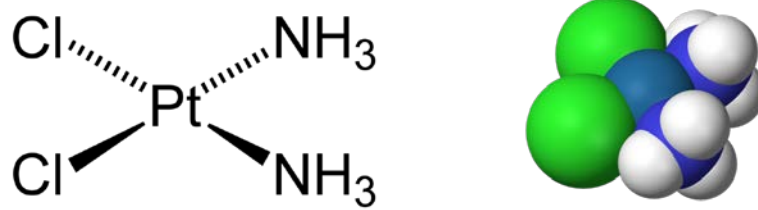
paralitico, ortostasi e problemi agli sfinteri. Il coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale è meno comune ma possono comunque manifestarsi atassia, paralisi dei nervi craniali, cecità corticale e colpi apoplettici. Vinblastina e vinorelbina presentano una minore incidenza di neurotossicità rispetto al predecessore.



**Figura 21** -*Catharanthus roseus*.

### **Composti del platino**

I platino-derivati sono molto utilizzati nel trattamento di tumori solidi. L'azione antitumorale prevede la formazione di addotti nel DNA con conseguente morte cellulare. Il meccanismo tramite il quale il cisplatino induce neuropatie periferiche sembra dovuto ad un suo accumulo nei gangli delle radici dorsali, che risultano la struttura neuronale maggiormente colpita dall'azione tossica del farmaco (Fig. 22).

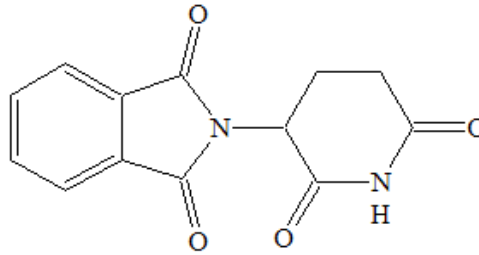


**Figura 22** – Sono illustrate la formula di struttura (sinistra) e quella 3D (destra) del cisplatino [(SP-4-2)-diamminodichloroplatino;  $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}$ ]- Tale molecola è in grado di interferire con il ciclo cellulare in maniera non specifica e il meccanismo d'azione è mediato dal legame del composto con l'azoto in posizione 7 della guanina benché sia anche in grado di legarsi covalentemente alla citosina (azoto 3) e all'adenina (azoto 1 e 3).

La sintomatologia clinica legata al trattamento con platino-derivati, che si manifesta principalmente con areflessia osteo-tendinea precoce, ipopallestesia, riduzione della sensibilità statochinestica ed, in misura clinicamente meno grave, con ipoestesia tatto-puntoria, è dose-dipendente e può essere di entità tale da rendere necessaria la sospensione del trattamento chemioterapico. La neuropatia sensitiva indotta da farmaci platino-derivati presenta inoltre una caratteristica clinica peculiare (definita dagli autori anglosassoni "*coasting*"), che consiste nel fatto che la massima gravità della sintomatologia può essere raggiunta non durante o al momento dell'interruzione della somministrazione del farmaco, ma anche alcuni mesi dopo la sospensione dall'esposizione, rendendo quindi problematica la valutazione corretta della gravità del danno durante il trattamento, vale a dire quando vanno decise eventuali variazioni nella somministrazione del chemioterapico.

### Talidomide

La talidomide, dopo essere stata tolta dal commercio a causa della sua teratogenicità, viene utilizzata come agente chemioterapico per la sua attività immunomodulatoria e angiogenica (Fig. 23). Essa causa una neuropatia periferica distale di tipo sensoria in più della metà dei pazienti se utilizzata per lungo tempo e meno comunemente una neuropatia motoria [Mileshkin et al., 2006].



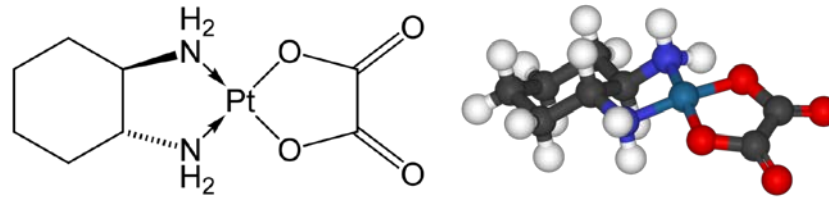
**Figura 23** - La talidomide [2-(2,6-diosso-3-piperidinil)-1H-isoindol-1,3(2H)-dione;  $C_{13}H_{10}N_2O_4$ ] è risultata inibire la proteina chinasi alfa (IKK $\alpha$ ) della proteina I $\kappa$ B, un inibitore endogeno del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. Questo fattore è attivamente coinvolto nella proliferazione delle cellule tumorali e nella sintesi di molte citochine, come l'interleuchina-1, l'interleuchina-6 ed il fattore di necrosi tumorale (TNF- $\alpha$ ). La talidomide, interferendo col fattore NF- $\kappa$ B, semplicemente sopprime la loro produzione.

### Nuovi farmaci

Tra i farmaci più nuovi, è necessario ricordare il bortezomib, membro della classe degli inibitori dell'attività del proteosoma [Richardson et al., 2003; Jagannath et al., 2005], e la capecitabina, una nuova formulazione del 5-fluorouracile [Videnovic et al., 2005; Couch et al., 2003], i quali risultano dare ugualmente la CIPN con atassia, perdita motoria e parestesia.

### Neuropatia indotta da oxaliplatino

L'oxaliplatino è un composto platino-derivato di terza generazione utilizzato come agente antineoplastico di prima linea nel cancro metastatico colon-rettale [Culy et al., 2000] e come agente adiuvante con 5-fluorouracile e leucovorina (Fig. 24). È stato proposto il suo utilizzo anche nel cancro alle ovaie, al pancreas, al seno e ai polmoni e nel linfoma non-Hodgkin [Grothey, 2005]. Per la sua attività caratteristica e il suo profilo di tossicità, l'oxaliplatino differisce da cisplatino e carboplatino. Alle dosi clinicamente raccomandate, infatti, risulta avere una minore tossicità a carico dei sistemi renale, uditivo ed ematologico [Culy et al., 2000]. Nonostante ciò, un numero sempre maggiore di pazienti non è in grado di terminare i cicli dell'intero trattamento a causa dello sviluppo di una neuropatia indotta da chemioterapico e dolore neuropatico.



**Figura 24** - L'oxaliplatino [(R,R)-1,2diaminocicloesano(etandioato)-O,O]platino;  $C_8H_{14}N_2O_4Pt$  è un agente alchilante in grado di legarsi ai filamenti di DNA provocando alterazioni che innescano l'apoptosi. È in grado di interferire con il ciclo cellulare in maniera non specifica e, allo stesso modo del cisplatino, esso lega preferenzialmente l'azoto in posizione 7 della guanina, benché possa legarsi anche con citosina ed adenosina.

Esistono due forme di neurotossicità indotta da oxaliplatino: una acuta e una cronica.

La neuropatia *acuta* è correlata alla quantità individuale di farmaco e si presenta ad alti dosi. È una sindrome transiente acuta che può iniziare durante l'infusione, da alcuni minuti a qualche ora, fino a 1-2 giorni dopo la somministrazione, ma generalmente scompare in alcuni giorni [Gamelin et al., 2002, 2006]. I sintomi includono: parestesia, ipoestesia, disestesia, che inizialmente colpiscono le mani o i piedi, ma possono presentarsi anche alla bocca o nell'esofago. Questa neuropatia è a volte associata a respiri affannosi o difficoltà nella deglutizione, ma senza broncospasmo, laringospasmo e silibo. I pazienti presentano anche una sensazione inusuale alla lingua, spasmi alla mandibola, dolore agli occhi e crampi o spasmi muscolari, che sono spesso descritti come rigidità alle mani o ai piedi o come inability a rilasciare la presa. È riportata anche una sensazione di pressione al torace. La neuropatia acuta indotta da oxaliplatino non è dose-limitante, può essere scatenata dall'esposizione a temperature fredde e spesso ritorna con i trattamenti successivi [Grothey, 2003; Gamelin et al., 2002; Becouarn et al., 1998; Leonard et al., 2003].

La neuropatia *cronica* è cumulativa [Gamelin et al., 2002; Extra et al., 1998; Souglakos et al., 2002; Andre et al., 1999]: è molto comune nei pazienti che ricevono dosi totali  $> 600 \text{ mg/m}^2$ . I sintomi sono simili a quelli della neuropatia acuta e generalmente consistono in parestesia, ipoestesia, disestesia e



cambiamenti nella propriocezione che non si risolvono tra i cicli di trattamento; possono riguardare la coordinazione fine motoria, come lo scrivere, prendere oggetti, recuperare monete, abbottonarsi le maglie o camminare [Cersosimo, 2005]. Non è presente allodinia dovuta al freddo. La tossicità cronica può raramente causare il segno di Lhermitte (segno che frequentemente si presenta nella sclerosi multipla ed è costituito da una sensazione di scossa elettrica che percorre la colonna vertebrale e gli arti inferiori in seguito a flessione o più raramente in estensione del collo), perdita propriocettiva e ritenzione urinaria. Questa neuropatia si risolve gradualmente dopo diversi mesi dall'interruzione della terapia farmacologica [Brienza et al., 1995; Andre et al., 1999; De Gramont et al., 2000]. È stata dimostrata una esacerbazione della malattia immediatamente dopo un intervento chirurgico in circa il 58% dei pazienti trattati con oxaliplatino, 5-fluoro-uracile e leucovorina [Grothey, 2003; Gamelin et al., 2006]. In genere, l'incidenza di neurotossicità severa è del 12-18% [Wang et al., 2007].

Il meccanismo alla base della neurotossicità indotta da oxaliplatino non è conosciuto con certezza. È stato proposto il suo ruolo nel prolungamento della fase di apertura dei canali al sodio in alcuni nervi, che determina uno stato di ipereccitazione [Webster et al., 2005; Adelsberg et al., 2000]. Anche quelli al potassio risultano essere coinvolti [Benoit et al., 2006], indicando un meccanismo comune dell'oxaliplatino a livello dei canali. Comunque, il trattamento della neurotossicità indotta da oxaliplatino con agenti bloccanti i canali al sodio, che sono fondamentali per una corretta funzione del nervo, non produce solidi risultati. Sono stati ipotizzati alcuni possibili meccanismi per alcuni degli effetti dell'oxaliplatino: la modifica delle cariche superficiali intorno ai canali ionici, la chelazione di calcio extracellulare, il binding al canale di prodotti carichi ottenuti dalla biotrasformazione dell'oxaliplatino [Broomand et al., 2009; Prak et al., 2008]. Più recentemente, è stato riportato che la neurotossicità è associata a un trasportatore (CTR1) presente nei gangli delle radici dorsali. CTR1 è preferenzialmente espresso da un tipo di neuroni nei gangli della radice dorsale particolarmente vulnerabili alla tossicità dei composto platino-derivati. È stato

quindi proposto che CTR1 alteri l'uptake e la tossicità di tali farmaci [Liu et al., 2009].

L'oxaliplatino, al pari di cisplatino e carboplatino, ha una attività modesta nei tumori al cervello: questo perché la barriera emato-encefalica limita l'ingresso dei farmaci. Il campionamento diretto della concentrazione nel tessuto cerebrale dopo una dose sistemica non è praticabile, quindi si usa la penetrazione nel fluido cerebrospinale (CSF) come surrogato della penetrazione nella barriera. In modelli predittivi di primati non umani, la penetrazione nel SNC è risultata minore del 5% (2,1% circa sia per l'oxaliplatino attivo che per quello totale) [Jacobs et al., 2005 e 2009].

## Capitolo 5

### La glia

La complessità dei circuiti cellulare che lo compongono rende il sistema nervoso rispetto a qualsiasi altra struttura vivente conosciuta finora. L'omeostasi del sistema nervoso è affidata a una specifica popolazione di cellule neurali, nota come neuroglia. Le cellule della glia sono cellule non conduttive alle quali era stato inizialmente affidato solo un ruolo di supporto; recentemente, un numero sempre maggiore di studi mette in luce proprietà determinanti di questi tipi cellulari.

La neuroglia è apparsa all'inizio dell'evoluzione, quando il primitivo sistema nervoso ha cominciato a definirsi, ed è diventata il tipo cellulare predominante nel cervello dell'*Homo sapiens*. Il concetto di neuroglia come tessuto connettivo in cui tutti gli elementi del sistema nervoso sono incapsulati è stato introdotto da Rudolf Virchow [Virchow, 1856, 1858; Kettenmann e Verkhratsky, 2008]. Nel corso del tardo XIX secolo e all'inizio del XX, la natura e l'eterogeneità morfofunzionale delle cellule della neuroglia sono state fermamente stabilite [Andriezen, 1893; Golgi, 1903; Kölliker, 1889; Retzius, 1894-1916; Schleich, 1894; Weigert, 1895]. Negli ultimi decenni, l'importanza e la versatilità funzionale della neuroglia, che è coinvolta in tutte le attività del sistema nervoso centrale, dall'agire come supporto strutturale e metabolico all'elaborare le informazioni, hanno iniziato ad essere pienamente apprezzate [Haydon e Carmignoto, 2006; Kettenmann e Ransom, 2005; Perea et al, 2009. Ransom et al, 2003; Verkhratsky, 2006b, 2009; Verkhratsky e Toescu, 2006; Volterra e Meldolesi, 2005]. Inoltre, l'unicità evolutiva delle cellule gliali indica il loro ruolo nella formazione dell'intelletto umano [Oberheim et al., 2009, 2006].

Gli elementi cellulari, pur avendo caratteristiche comuni, presentano una profonda eterogeneità funzionale in diverse regioni del cervello e in diversi stadi di sviluppo.

Tuttavia, ogni singola cellula neurogliale ha un aspetto importante nel mantenere l'omeostasi del cervello: infatti, controllano il locale ambiente molecolare, forniscono il sistema di difesa intrinseco del sistema nervoso e sono fondamentali anche come stazioni di segnalazione.

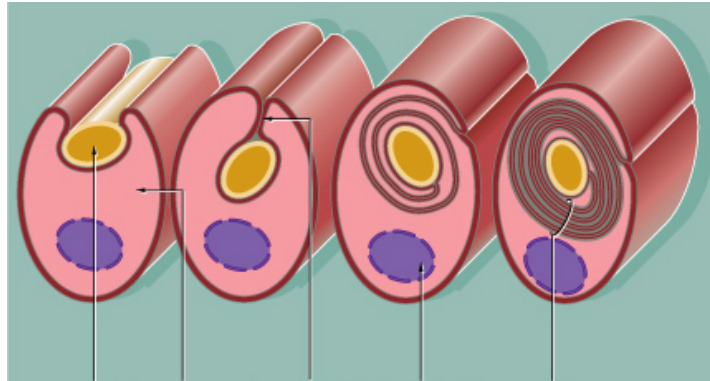
Alterazioni della loro funzione segnalano inevitabilmente la presenza di una patologia. L'induzione e il mantenimento del dolore neuropatico, approfondito in questa tesi, infatti, coinvolgono le cellule di Schwann, le cellule satelliti nei gangli delle corna dorsali (DRG), i componenti del sistema immunitario periferico e i loro principali rappresentanti a livello del sistema nervoso centrale: la microglia e gli astrociti [Scholz and Woolf, 2007].

## **SISTEMA NERVOSO PERIFERICO**

### **Cellule di Schwann**

Le cellule di Schwann sono le cellule gliali del sistema nervoso periferico. La loro principale funzione è quella di rivestire gli assoni con uno strato di mielina, che conferisce ai nervi un aspetto bianco brillante. Grazie alle doti di isolante elettrico, la mielina aumenta la capacità di conduzione degli assoni stessi. Infatti, se gli assoni amielinici hanno una velocità di conduzione da 0,5 a 10 m/s, gli assoni mielinici più veloci possono arrivare a 150 m/s (assoni di categoria A, sottogruppo  $\alpha$ ). Le cellule di Schwann formano la guaina mielinica avvolgendosi attorno agli assoni numerose volte; gli strati più interni sono composti principalmente da mielina, appunto, che forma la membrana cellulare di queste cellule, mentre il citoplasma e il nucleo stanno negli strati più esterni e formano il neurilemma. Siccome le dimensioni di una cellula di Schwann (fino ad 1 mm) sono molto inferiori alla lunghezza di un assone (i più lunghi possono oltrepassare il metro), per mielinizzare completamente un singolo assone sono necessarie numerose cellule di Schwann, disposte lungo la lunghezza dell'assone. Le piccole parti demielinizzate che si trovano tra due cellule di Schwann si chiamano nodi di Ranvier e svolgono una funzione importante: essendo le uniche aree di scambio ionico dell'assone, il potenziale d'azione si propaga (e si

riproduce) solo in corrispondenza di questi nodi, dando vita al fenomeno della conduzione saltatoria. L'analogo delle cellule di Schwann nel sistema nervoso centrale sono gli oligodendrociti, che, come le cellule di Schwann, svolgono principalmente funzioni di mielinizzazione degli assoni (Fig. 25).



**Figura 25** – Le fibre mieliniche sono formate da un assoni circondato da una cellula di Schwann che si avvolge ripetutamente intorno ad esso. La cellula di Schwann è circondata da una lamina basale e il suo nucleo, ovale o semilunare, è dislocato perifericamente, all'esterno della guaina mielinica. Quest'ultima è costituita da un avvolgimento spiraliforme del plasma lemma della cellula di Schwann che si dispone intorno all'assone in un numero variabile di strati.

Durante la degenerazione walleriana, le cellule di Schwann che circondano gli assoni vanno incontro a cambiamenti notevoli, iniziano il lavoro di fagocitosi dei residui mielinici e sintetizzano una serie di potenti molecole biologiche, incluso il fattore di crescita NGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e ATP [Michael et al., 2007]. Le cellule di Schwann esprimono anche un buon numero di canali ionici e recettori per i mediatori, come ATP, glutammato e IL-1 [Moalem et al., 2006]. Nei danni parziali al nervo, che sono spesso associati a dolore neuropatico, gli assoni prossimali alla lesione, che rimangono intatti, sono esposti a nuovi fattori derivanti dalle cellule di Schwann. L'up-regolazione di NGF effettuata dalle cellule di Schwann è guidata in gran parte dal rilascio di IL-1 $\beta$  da parte dei macrofagi nel nervo danneggiato.

Un'ulteriore chiarimento sull'esatto ruolo delle cellule di Schwann nei processi nocicettivi è fornito dal lavoro di Chen et al (2006) su topi transgenici che esprimono un recettore dominante negativo ErbB al fine di stabilire il ruolo di cellule di Schwann mielinizzanti o non mielinizzanti nei processi sensoriali. ErbB è un recettore a tirosin-chinasi che lega la Neuroregulina-1 (NRG-1) ed è

importante nell'interazione tra assone e cellule gliali. Le neuroreguline sono una famiglia di fattori di crescita e di differenziazione associati alla membrana; quattro geni sono presenti nei mammiferi, ma solo NRG-1 è stato caratterizzato in maggior dettaglio. Tutte le isoforme di NRG-1 presentano un dominio di segnale EGF che è necessario e sufficiente per il binding e l'attivazione dei recettori della famiglia ErbB. Nel sistema nervoso periferico, eterodimeri di ErbB2 e ErbB3 sono i principale recettori delle cellule di Schwann che trasmettono il segnale NRG-1 derivante dall'assone. Tra le varie isoforme, NRG-1 tipo III è estremamente importante negli aspetti multipli dello sviluppo della linea delle cellule di Schwann, inclusa la migrazione, la differenziazione e la sopravvivenza. La presenza di NRG-1 tipo III sulla superficie assonale sembra agire da segnale guida che determina se una cellula di Schwann adotterà un fenotipo mielinizzante o non-mielinizzante [Quintes et al., 2009]. Chen et al. (2006) hanno osservato una selettiva perdita di sensibilità termica a stimoli nocivi da caldo e da freddo, quando la segnalazione ErbB viene interrotta in cellule non-mielinizzanti, senza alterazione nelle risposte a stimoli meccanici. Al contrario, topi transgenici con interruzione del segnale ErbB in cellule di Schwann mielinizzanti hanno mostrato marcate risposte a stimoli meccanici a bassa soglia (allodinia meccanica) e nessuna alterazione nelle risposte a stimoli termici. Insieme, questi dati suggeriscono ruoli importanti ed altamente specifici per i diversi fenotipi delle cellule di Schwann nell'elaborazione delle informazioni nocive.

Una volta che le cellule di Schwann hanno stabilito una relazione con gli assoni, l'ottimale velocità di conduzione nel nervo è raggiunta tramite la modifica dello spessore della guaina mielinica al diametro assonale [Quintes et al., 2009]. Analisi su topi mutanti hanno dimostrato che questo processo è controllato da NRG-1 tipo III espresso sulla superficie assonale, che porta le cellule di Schwann a percepire il diametro assonale e ad aggiustare il numero di strati di membrana in modo conforme [French-Constant et al., 2004; Michailov et al., 2004]. Topi eterozigoti per NRG-1 tipo III, che esprimono circa il 50% delle proteine, mostrano una riduzione dello spessore della guaina mielinica, una diminuzione

dei livelli di fattori di trascrizione della mielina e una ridotta velocità di conduzione. Al contrario, topi transgenici con una over-espressione di NRG-1 tipo III nei neuroni sono iper-mielinizzati.

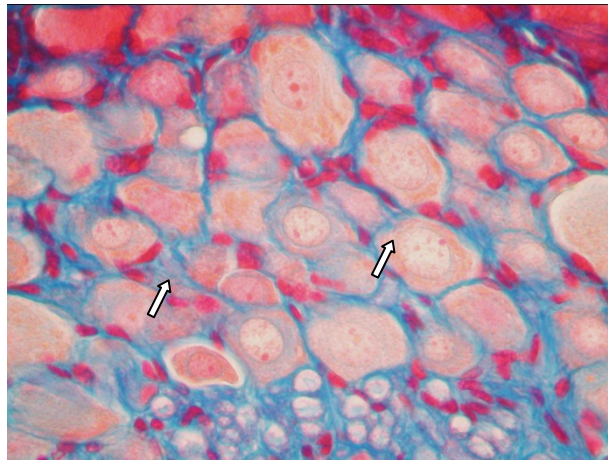
La mielina è molto ricca di lipidi, che raggiungono circa il 70% del suo peso secco, particolarmente di colesterolo e glicosfingolipidi. Le cellule di Schwann mielinizzate affrontano la grande esigenza di lipidi per la formazione di mielina solo attraverso la biosintesi autonoma cellulare [Fu et al., 1998]. Quindi, stimolare la biosintesi lipidica gliale potrebbe essere una via importante per mantenere la biogenesi mielinica. Questa ipotesi è rafforzata da recenti scoperte, per le quali i recettori ErbB sono attivati dalla deplezione del colesterolo in vitro e potrebbero agire da sensori dei livelli di colesterolo sulla membrana plasmatica. È stato inoltre visto, in culture di cellule di Schwann, che NRG-1 può stimolare la trascrizione di 3-idrossi-3-metilglutarilcoenzima A (HMG-Co A) reductasi, l'enzima limitante, a causa della sua velocità, nella biosintesi del colesterolo. Saher et al. (2009) hanno recentemente dimostrato che l'aggiunta di colesterolo esogeno in culture di cellule neuronali di DRG e di cellule di Schwann aumenta in vitro la mielinizzazione di due o tre volte. Questo effetto risulta, comunque, transiente e il numero finale di segmenti mielinizzati dipende anche da altri fattori. Sono stati fatti esperimenti su topi knockout mancanti dell'enzima squalene sintasi, importante nella biosintesi del colesterolo: essi risultano avere una ridotta espressione dei geni per la mielina, con conseguente ipomielinizzazione del nervo sciatico e possibilità di sviluppare una severa neuropatia periferica.

Come già detto, NRG-1 tipo III si lega ai recettori ErbB presenti sulle cellule di Schwann e porta all'attivazione della via di segnale fosfoinositide 3-chinasi (PI3K)/AKT. PI3K catalizza la formazione di fosfatidilinositolo tri-fosfato a partire da fosfatidilinositolo bi-fosfato. PI3K recluta le proteinchinasi B, chiamate anche Akt, alla membrana cellulare, che sono attivate tramite fosforilazione; inoltre, il legame di NRG-1 ai recettori ErbB porta all'espressione a valle di diversi fattori di trascrizione, che hanno un ruolo nella mielinizzazione periferica, come Oct-6 e Krox-20 [Taveggia et al., 2005]. La fosforilazione di Akt-1 influisce

sull'espressione di particolari proteine che legano elementi sensibili agli steroidi (SREBPs), influenzando di conseguenza la biosintesi del colesterolo [Porstmann et al., 2005]. Ciò potrebbe spiegare come alti livelli di NRG-1 tipo III portano ad un'aumentata formazione di lipidi.

### Cellule satelliti

I corpi dei neuroni sensitivi sono densamente impacchettati nei gangli corrispondenti dove ogni soma è strettamente avvolto da uno strato di cellule satelliti gliali (Satellite Glial Cells - SGC) [Pannese et al., 1981], spesso strutturalmente accoppiate mediante gap junctions [Pannese et al., 2003; Huang et al., 2005]. I neuroni e le circostanti cellule satelliti formano un'unità morfologicamente distinta e funzionale [Hanani et al., 2005]. Queste unità sono separate da regioni contenenti tessuto connettivo (Fig. 26).



**Figura 26** - Le cellule satelliti, alcune delle quali sono indicate dalle frecce, sono piccole cellule che delimitano la superficie esterna dei neuroni nei gangli del sistema nervoso periferico ed aiutano a regolare l'ambiente chimico esterno.

Studi quantitativi mostrano che il numero di SGC aumenta proporzionalmente al volume del neurone, in accordo con l'idea che le cellule satelliti supportano metabolicamente i neuroni [Ledda et al., 2004; Pannese et al., 1983]. In passato, si pensava che le cellule satelliti fossero strutturalmente simili agli astrociti,



mentre recentemente è stato visto che presentano una forma laminare. L'involucro delle cellule satelliti consiste di prolungamenti piatti, molto vicini alla membrana plasmatica neuronale: la distanza tra neuroni e cellule gliali è circa 20 nm, quindi lo spazio extracellulare è molto piccolo. I neuroni mandano fini prolungamenti (microvilli), alcuni dei quali entrano in invaginazioni delle SGC [Pannese et al., 2002]. Il ruolo di queste strutture non è ancora ben conosciuto, ma potrebbero sia aumentare l'area superficiale neuronale, sia permettere uno scambio tra questi due tipi di cellule. Le cellule satelliti sono un tipo diverso di cellule gliali, che non è analogo ad astrociti o oligodendrociti. Esse non hanno funzione di barriera, poiché non solo ioni e piccoli neurotrasmettitori, ma anche macromolecole possono attraversare la guaina delle cellule satelliti, e addirittura i macrofagi in certe condizioni possono penetrarla [Hu et al., 2002]. Risultano, però, avere un ruolo protettivo: sono infatti impegnate nel controllo della composizione dello spazio extracellulare dei DRG. Sono presenti, ad esempio, trasportatori per il glutammato e il GABA, ma anche enzimi relativi al glutammato, come la glutammato deidrogenasi e la piruvato carbossilasi, che riforniscono i neuroni non solo di glutammato, ma anche di malato e lattato [Miller et al., 2002]. Inoltre, sono importanti nell'esposizione dei neuroni sensoriali a sostanze tossiche: l'esposizione a sostanze organiche, come il mercurio, porta a proliferazione e ipertrofia delle cellule satelliti [Schionning et al., 1998,1999; Delio et al., 1992]. A differenza dei neuroni, ma come gli astrociti del SNC, le cellule satelliti proliferano conseguentemente ad un insulto a un nervo periferico, come una lesione [Lu et Richardson, 1991, 1993], un'infezione virale neuronale [Elsin et al., 2003] o la scarificazione della pelle [Elsin et al., 2004].

Le cellule satelliti sembrano influenzare anche lo sviluppo embrionale dei neuroni sensitivi. Esercitano, infatti, un effetto trofico, sebbene esso sia negativo [Koninck et al., 1993]: in culture miste di neuroni dei gangli nodosi di ratto e SGC, i neuroni non hanno dendriti; viceversa, in assenza di cellule satelliti, l'NGF incrementa la crescita dei dendriti fino a 17 volte. È stato concluso, quindi, che le SGC controllano in parte la morfologia dei neuroni, ma il meccanismo con cui operano non è stato ancora chiarito.

Poiché le cellule satelliti hanno profondi effetti sull'attività neuronale [Zhang et al., 2007; Chen et al., 2008] è importante capire se la comunicazione tra SGC e neuroni del DRG cambia dopo un danno. In un sistema somato-sensorio, l'infiammazione o il danno a un nervo dà il via a molti cambiamenti nelle cellule gliali, che includono un incremento nell'associazione tra cellule satelliti attraverso le gap junctions nel DRG [Pannese et al., 2003; Cherkas et al., 2004; Hanani, 2005; Dublin and Hanani, 2007; Zhang et al., 2009], una diminuzione delle correnti Kir [Takeda et al., 2008b; Zhang et al., 2009], l'attivazione di chinasi regolate da segnali intracellulari da astociti e microglia [Zhuang et al., 2005], l'upregolazione dei recettori P2X4Rs nella microglia [Tsuda et al., 2003; Trang et al., 2006] e l'induzione del rilascio di BDNF da parte della microglia che riduce il controllo inibitorio del GABA nei neuroni delle corna dorsali [Coull et al., 2005]. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , che in condizioni normali sono presenti in basse concentrazioni nei neuroni del DRG e nelle cellule satelliti, sono upregolate velocemente in entrambi i tipi cellulari [Ohtori et al., 2004; Miyagi et al., 2006; Xu et al., 2006; Takeda et al., 2007] e, similamente, si ha un incremento di espressione dei recettori TNFR<sub>1</sub> e IL<sub>1</sub>R<sub>1</sub> [Ohtori et al., 2004; Inglis et al., 2005; Takeda et al., 2007]. In seguito all'assotomia, le cellule satelliti proliferano, formando diversi strati attorno al neurone, come un bulbo di cipolla [Shinder et al., 1999], e sono capaci di fagocitare le cellule degenerate, come le altre cellule gliali [Pannese et al., 1981]. Un'altra proteina importante, la S100A4 viene upregolata nelle SGC e nelle cellule di Schwann dopo lesione al nervo sciatico [Sandelin et al., 2004]: questi cambiamenti nell'espressione sono stati riferiti alle cellule satelliti attorno ai neuroni i cui assoni erano stati danneggiati, suggerendo un ruolo per questa proteina nella sopravvivenza neuronale. Li e Zhou (2001) scoprono che, in seguito all'assotomia, le SGC esprimono siti di legame per l'isolectina IB4 e formano una stretta associazione con i nuovi dendriti dei piccoli neuroni che maturano. Altri studi mostrano anche che le cellule satelliti esprimono alti livelli di neutrofine [Zhou et al., 1996] e un aumento delle concentrazioni di altri fattori di crescita, come TGF- $\alpha$ , il fattore 2 della crescita dei fibroblasti [Grothe et al., 1997] e GDNF [Hammarberg et al., 1996]. Soares et al. (2001) hanno studiato

l'induzione di geni nelle cellule dei DRG subito dopo l'assotomia e hanno trovato che le cellule satelliti, e non i neuroni, esprimono il c-Fos, che è un marker dell'incrementata attività cellulare: ciò indica che l'informazione del danno neuronale è comunicata alle SGC.

È stato dimostrato che circa il 5% dei neuroni nel DRG di ratti adulti contiene l'enzima NO-sintasi neuronale, mentre molte SGC presentano la guanilato ciclasi, che è attivata dall'NO per catalizzare la formazione di GMP ciclico. Aoki et al (1991) notarono che le cellule satelliti accumulano arginina, il precursore dell'NO e proposero che i neuroni della DRG mandano segnali alle SGC tramite NO e le SGC possono fornire loro arginina per produrre ulteriore NO. Molti ricercatori hanno studiato i cambiamenti mediati da NO dopo un danno al nervo: l'assotomia o la legatura del nervo sciatico porta all'upregolazione di NOS neuronali nei neuroni dei DRG, inducendo un aumento della sintesi di cGMP nelle cellule satelliti [Shi et al., 1998; Thippeswamy et al., 1997, 2001]. Considerando l'intimo contatto tra SGC e neuroni, è ragionevole supporre che la via NO-cGMP che coinvolge le cellule satelliti contribuisca alla nocicezione. In vari studi è, infatti, apparso che NO e cGMP hanno un'azione protettiva contro la morte neuronale e che NO può inibire enzimi associati all'apoptosi [Thippeswamy et al., 2001].

L'ATP è il principale trasmettitore che media la comunicazione tra neuroni e cellule satelliti [Zhang et al., 2007]. L'ATP segnala input sensoriali nei DRG tramite l'attivazione di recettori purinergici: uno ionotropico, P2XRs, e uno metabotropico, P2YRs [Burnstock, 2000; North, 2002; Ruan and Burnstock, 2003; Fields and Burnstock, 2006]. Entrambi i recettori sono presenti nel corpo, negli assoni e nelle terminazioni dei neuroni e nelle circostanti cellule satelliti e di Schwann [Grubb and Evans, 1999; Hanani, 2005; Kobayashi et al., 2005, 2006]. P2X7Rs e P2X4Rs sono i sottotipi recettoriali maggiormente presenti nelle SGC. Un aspetto particolare dei gangli sensoriali è la grande abbondanza di recettori P2X7Rs nelle cellule satelliti e la loro mancanza nei neuroni dei DRG; allo stesso tempo, i recettori P2X3Rs sono altamente espressi nei neuroni, ma non sono stati trovati nelle SGC. A differenza dei neuroni, le SCG non presentano canali al

Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti, ma esprimono quelli al Ca<sup>2+</sup> e al K<sup>+</sup> [Cherkas et al., 2004; Vit et al., 2006; Zhang et al., 2008], quindi le cellule satelliti non sono elettricamente eccitabili. Esse rispondono a stimoli esterni tramite cambiamenti del calcio citosolico, attraverso l'apertura di recettori permeabili al Ca<sup>2+</sup>, come i recettori purinergici ionotropici P2XRs, o mobilizzando il Ca<sup>2+</sup> dai compartimenti intracellulari grazie all'attivazione di recettori metabotropici, come i P2YRs [Weick et al., 2003; Ceruti et al., 2008]. Perciò le cellule satelliti utilizzano il calcio intracellulare per mandare segnali, similmente alle cellule gliali del SNC. In colture trigeminali miste di SGC e neuroni, è stato dimostrato che la stimolazione meccanica di SGC evoca la diffusione di Ca<sup>2+</sup> ai neuroni e alle cellule satelliti vicine. L'attivazione di recettori P2X7Rs è stata direttamente collegata alla maturazione e al rilascio di citochine, quali TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , dalle cellule gliali in seguito a un danno [Colomar et al., 2003; Ferrari et al., 2006; McGaraughty et al., 2007; Zhang et al., 2007; Skaper et al., 2010]. In topi mancanti di questi recettori, l'ipersensibilità meccanica e termica conseguente a infiammazione, legatura del nervo o trattamento con lipopolisaccaride (LPS) sono assenti [Chessell et al., 2005; Clark et al., 2010] e il rilascio di IL-1 $\beta$  è estremamente diminuito [Clark et al., 2010]. Oltre a un effetto eccitatorio, l'attivazione dei recettori P2X7Rs nelle cellule satelliti esercita anche un'azione inibitoria sui neuroni dei DRG: studiando il rilascio basale di ATP, è stato visto che i gangli rilasciano ATP e tale cessione è molto ridotta trattando i DRG con oxATP, un antagonista dei recettori P2X7Rs. Perciò, essi mediano una porzione significativa del rilascio di ATP dalle cellule satelliti. Tali recettori hanno particolari proprietà di canale: sono relativamente poco sensibili all'ATP, per cui sono necessarie elevate concentrazioni di tale trasmettitore per avere l'attivazione; inoltre, una prolungata attivazione rende progressivamente i recettori aspecifici, permettendo il passaggio anche di molecole con dimensioni maggiori [Virginio et al., 1999; Khakh e North, 2006]. Infine, esaminando pazienti con dolore neuropatico, sembra che i recettori P2X7Rs vengono upregolati nelle cellule satelliti di neuroni staccati o danneggiati dei DRG [Chessell et al., 2005].

La bradichinina agisce su due sottotipi recettoriali: B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Dopo lesione al nervo sciatico nel topo, l'espressione dei recettori B<sub>2</sub> decresce, mentre quella dei recettori B<sub>1</sub> incrementa sia nei neuroni dei DRG sia nelle cellule satelliti. Si crede che la bradichinina esercita la sua azione nocicettiva attraverso la sensibilizzazione dei neuroni a vari stimoli e agenti depolarizzanti. England et al. (2001) scoprirono che la bradichinina incrementa la concentrazione di Ca<sup>2+</sup> nelle colture di SGC, che attiva canali al Cl<sup>-</sup>, portando a correnti verso l'interno. Heblich et al. (2001) hanno riportato la sorprendente scoperta che, in assenza di cellule satelliti, la bradichinina non riesce a evocare tali correnti in colture di neuroni dei DRG, sebbene i neuroni conservino la loro sensibilità ad agonisti eccitatori aminoacidici. Inoltre, l'assenza di SGC non altera l'incremento di Ca<sup>2+</sup> intracellulare nei neuroni in risposta alla bradichinina. Sembra quindi che i neuroni abbiano almeno due meccanismi di risposta alla bradichinina: una via indiretta, che passa dalle cellule satelliti, che porta a risposte elettrofisiologiche, e una via diretta, che determina un incremento di calcio intracellulare.

Pomonis et al. (2001) hanno studiato la distribuzione dei recettori ET nei DRG e trovarono che solo le cellule satelliti e le cellule di Schwann non-mielinizzanti esprimono i recettori ET<sub>B</sub>, mentre i neuroni presentano i recettori ET<sub>A</sub>. Poiché i topi ET<sub>B</sub>-mancanti mostrano una ridotta risposta infiammatoria [Griswold et al., 1999], fu proposto che le cellule satelliti avessero un ruolo nella trasmissione di segnali dolorosi.

Sono presenti dati sempre più evidenti che le cellule satelliti prendono parte a processi che riguardano le neurotrofine, quali NGF e BDNF. È stato proposto che il BDNF origina nei neuroni e successivamente viene captato dalle cellule satelliti [Wetmore et al., 1995]; inoltre le SGC presentano l'immunoreattività al BDNF e anche l'mRNA codificante per la forma a tronco del recettore del BDNF. Pannese e Procacci (2002) mostrarono che i recettori NGF permettono che le cellule satelliti siano influenzate dal rilascio di NGF dai neuroni; per di più, dopo il legame e l'internalizzazione di NGF, le cellule satelliti lo possono accumulare ed eventualmente renderlo indietro ai neuroni. Zhou et al. (1999) esaminarono la presenza di neurotrofine nei DRG dopo assotomia e trovarono che le cellule

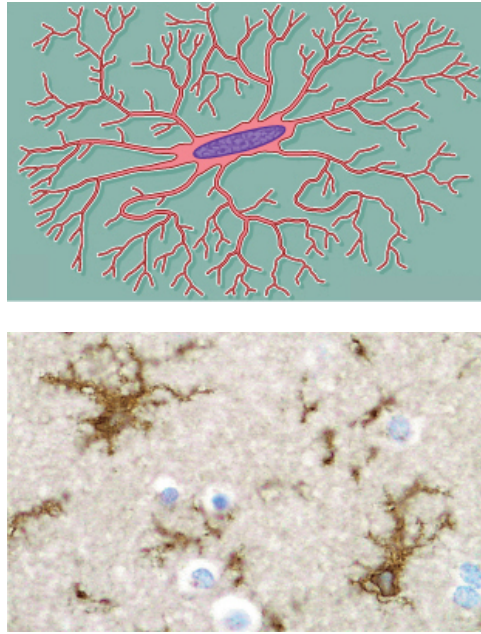
satelliti nella zona ipsi-laterale all'assotomia contenevano una grande quantità di NGF e NT3. NGF va ad aumentare i livelli di ERK fosforilato, che ci mostra l'importanza dell'interazione SGC-neuroni negli stati infiammatori e neuropatici [Averill et al., 2001]. Il blocco del legame di queste neurotrofine tramite specifici anticorpi riduce il sorgere di fibre simpatiche dopo un danno, indicando che i fattori di crescita rilasciati dalle SGC sono i maggiori responsabili di questo fenomeno.

## **SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Le cellule della glia costituiscono il 70% della popolazione cellulare totale nell'encefalo e nel midollo spinale. Possono essere suddivise in due categorie primarie: la *microglia*, che rappresenta il 5-10% della popolazione gliale, e la *macroglia*, che include astrociti ed oligodendrociti.

### **Microglia**

Le cellule della microglia colonizzano il sistema nervoso centrale in sviluppo (SNC) prima della nascita e sono coinvolti in una serie di processi essenziali per la formazione del cervello e del midollo spinale durante lo sviluppo pre- e post-natale. Le cellule progenitrici microgliali embrionali e fetali danno luogo a un gran numero di microglia differenziata (ramificata) che popolano tutto il sistema nervoso centrale adulto. Queste cellule microgliali parenchimali funzionano come una rete disintinelle che aiutano a proteggere il sistema nervoso centrale non solo dall'invasione dei microbi, ma anche dalle conseguenze potenzialmente dannose di trauma e malattia neurale. Ogni volta che l'omeostasi del SNC è turbata da pressioni esterne, le cellule microgliali si mettono in movimento e diventano attive. La presenza di microglia attivata in qualsiasi parte del SNC può essere vista come una risposta cellulare di emergenza, progettata per ridurre al minimo i danni e per ripristinare l'omeostasi del tessuto (Fig. 27).



**Figura 27** – Le cellule di microglia sono le cellule più piccole della glia, hanno origine mesenchimale e funzione fagocitaria.

Le cellule della microglia ramificata sono i discendenti dei macrofagi fetali, cellule che derivano dal mesoderma e che si stabiliscono nel neuroectoderma durante lo sviluppo embrionale. L'ingresso dei macrofagi fetali nel neuroepitelio si verifica a circa metà della gestazione o anche prima nei roditori, mentre inizia in ritardo durante il primo trimestre di gravidanza negli umani [Chan et al., 2007; Monier et al., 2007; Streit, 2001]. Si pensa che i macrofagi fetali derivino da macrofagi primitivi che si formano nelle isole di sangue del sacco vitellino [Alliot et al., 1999; Cuadros et al., 1991; Takahashi et al., 1989] e sono state descritte diverse vie di ingresso dei macrofagi fetali nel cervello embrionale a seconda delle specie studiate, le regioni esaminate, così come l'età embrionale [Cuadros e Navascués 1998; Ling e Wong 1993; Monier et al., 2007]. Nei roditori, i macrofagi fetali persistono attraverso il periodo perinatale e postnatale fino alla seconda settimana nei roditori, momento in cui sono più comunemente chiamate cellule ameboidali microgliali [Kaur et al., 2007; Ling e Wong, 1993]. Sono cellule molto proliferative, altamente mobili e fagocitiche con una morfologia arrotondata che ha dato loro la designazione di ameboidi [Alliot et al., 1991; Brockhaus et al., 1996; Giulian e Ingeman, 1988;

Takahashi et al., 1989]. La microglia ameboide si accumula più visibilmente nei tratti di sostanza bianca e forma gruppi distinti di cellule proliferanti nel corpus callosum sopraventricolare e altrove [Hurley et al., 1999; Kaur e Tu, 2000; Ling e Wong, 1993]. Queste cosiddette “cascate della microglia”, che sono state individuate per la prima volta attraverso metodi di colorazione con l'argento di Rio-Hortega nel 1920 [Theele e Streit, 1993], danno luogo a cellule molto differenziate che vanno a popolare le regioni adiacenti di materia grigia. Le cellule progenitrici ameboidali microgliali possono essere distinte antigenicamente dalla microglia ramificata in quanto solo le prime sono in grado di reagire con l'anticorpo ED1 [Milligan et al., 1991]. Alla nascita, le cellule ED1-positive sono abbondanti nel sistema nervoso centrale, ma scompaiono completamente dalla terza settimana post-natale [Milligan et al., 1991]: ciò indica che la differenziazione delle cellule ameboidali in microglia ramificata è completa. ED1 è un marcatore dei macrofagi che riconosce un antigene lisosomiale intracitoplasmatico, la cui espressione aumenta durante la fagocitosi [Dijkstra et al., 1985], e quindi la scomparsa della immunoreattività per ED1 durante lo sviluppo post-natale dimostra che tutta la microglia ramificata si trova in uno stato fagocitico di quiescenza. Tuttavia, possono essere risvegliate per diventare cellule ED1-positive dopo una lesione traumatica al SNC adulto [Milligan et al., 1991b], così come durante il normale invecchiamento [Kullberg et al., 2001]. In entrambe le situazioni, l'attività fagocitica della microglia è up-regolata ma per ragioni diverse su diverse scale temporali. A seguito di lesioni traumatiche acute, l'antigene ED1 è espresso rapidamente nella microglia, che è impegnata nella fagocitosi di frammenti di tessuto, mentre l'insorgenza graduale di ED1 sulle cellule ramificate durante il normale invecchiamento è più probabile che sia a causa dell'accumulo di materiali di scarto [Stolzinger e Grune, 2003]. Bisogna quindi distinguere tra le cellule attivate che fanno parte di una reazione acuta neuroinfiammatoria e le cellule senescenti che possono acquisire funzioni di attivazione simili, a causa di funzioni cellulari ridotte dovute all'invecchiamento fisiologico. Quest'ultimo non deve essere confuso con la neuroinfiammazione cronica.



La maggior parte di ciò che le cellule microgliali fanno durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale è legato alla loro esistenza come macrofagi del cervello: cioè, essi sono impegnati nella rimozione di cellule apoptotiche e, eventualmente, nell'induzione di morte per apoptosi [Bessis et al., 2007; Streit 2001]; sono impegnati nel rimodellamento esteso del tessuto che si verifica durante lo sviluppo [Pollard, 2009], in particolare nella guida degli assoni nei tratti di sostanza bianca [Milligan et al., 1991], e forse nell'eliminazione di alcune proiezioni [Berbel e Innocenti, 1988]. È stato anche proposto un ruolo informativo e di supporto della microglia durante la neurogenesi [Thored et al., 2009; Walton et al., 2006], ma dato che la neurogenesi è un processo che continua per tutta l'età adulta non è strettamente un problema di sviluppo. Allo stesso modo, è stato suggerito un possibile ruolo della microglia nella sinaptogenesi durante lo sviluppo e, implicitamente, negli adulti [Bessis et al., 2007]. Tuttavia, questa idea rimane piuttosto speculativa, per ora non c'è una diretta prova a sostegno di essa. Al contrario, un ruolo della microglia nell'eliminazione delle sinapsi è stato a lungo sospettato fin dai primi lavori ultrastrutturali che riportano la rimozione sinaptica mediata dalla microglia di motoneuroni facciali assotomizzati [Blinzinger e Kreutzberg, 1968]. Un lavoro molto recente con microscopia a due fotoni conferma che alcune sinapsi scompaiono dopo un contatto prolungato con le cellule microgliali [Wake et al., 2009]. Questi lavori sono solo l'inizio: saranno necessari ulteriori approfondimenti sui meccanismi molecolari che sottendono la loro attività e potranno essere una promettente zona di esplorazione.

L'avvento della microscopia a due fotoni ha reso possibile osservare direttamente la microglia nel cervello vivente [Nimmerjahn et al., 2005], e questo lavoro è importante in quanto fornisce direttamente la conferma visiva di ciò che è stato a lungo sospettato su base istologica, in studi *ex vivo* e su colture cellulari, e cioè che le cellule microgliali sono altamente mobili e che costantemente esaminano il cervello e rispondono in fretta anche alle minime perturbazioni [Brockhaus et al., 1996; Hailer et al., 1997; Heppner et al., 1998; Kreutzberg, 1996; Stence et al., 2001]. Così, la microglia nel normale cervello adulto forma una rete

altamente dinamica di cellule che incessantemente campionano e rilevano il microambiente, attività paragonabile a quella degli immunociti periferici, e così non è un caso che la microglia sia nota come il sistema immunitario del cervello [Graeber e Streit 1990]. In analogia diretta al sistema immunitario periferico, è ragionevole pensare che lo scopo principale del sistema immunitario del cervello è quello di proteggere il sistema nervoso centrale da agenti patogeni ed eventuali danni. Al tempo stesso, si ha la necessità di ricordare che il cervello è già abbastanza protetto dal cranio, le meningi, lo spazio subaracnoideo riempito di liquido cerebrospinale, così come la barriera emato-encefalica e che pertanto il livello di protezione immunologica della microglia potrebbe non essere così importante come il livello di neuroprotezione che è costitutivamente fornito da queste cellule attraverso una varietà di meccanismi, compresa la produzione di fattori di crescita, citochine, e neurotrofine, l'assorbimento del glutammato, la fagocitosi di detriti, e la cattura del ferro [Elkabes et al., 1996; Lamberts et al., 2009; Lopes et al., 2008; Lopez-Redondo et al., 2000; Neumann et al., 2009; Streit 2002]. Concettualmente, si potrebbe quindi vedere la microglia come ibridi di immunociti e cellule gliali che hanno funzioni sia immunologiche sia di supporto ai neuroni.

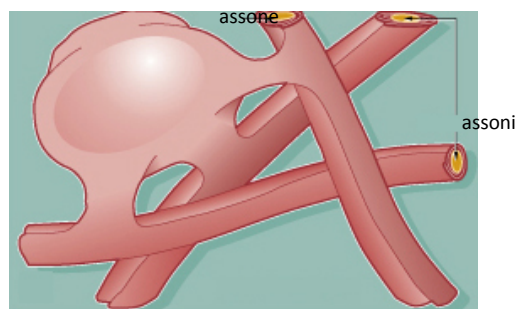
Molto di ciò che sappiamo circa le funzioni delle cellule microgliali a riposo nel sistema nervoso centrale non danneggiato è dedotto da osservazioni della microglia quando diventa attiva, in vivo, in una risposta a un danno. La risposta dei tessuti viventi al danno è conosciuto come infiammazione, e nella neuroinfiammazione del SNC si ha sempre l'attivazione di cellule della microglia [Streit 2002, 2005, 2006; Streit et al., 2008]. La migliore definizione di attivazione della microglia è funzionale e, quindi, una cellula microgliale attivata è quella che sta cercando di ripristinare l'omeostasi parenchimale del SNC [Streit e Xue, 2009].

Durante le normali condizioni omeostatiche, la microglia si trova in uno stato sessile a riposo ed ha un piccolo corpo con sottili prolungamenti ramificati. Queste cellule migrano alle terminazioni centrali dei nervi afferenti periferici rispondendo a uno stimolo doloroso e subiscono l'attivazione. Appena attivata,

la microglia va incontro a una serie di cambiamenti funzionali e morfologici, facilitando l'isolamento delle cellule danneggiate e l'eliminazione dei potenziali patogeni [Davalos et al., 2005]. Questi cambiamenti includono la mobilitazione e la proliferazione ed inducono l'attività fagocitica della microglia [Kreutzberg et al., 1996]. Nel sito del danno la microglia attivata può proiettare i suoi prolungamenti, attraverso l'aiuto dell'ATP, per isolare le cellule danneggiate [Davalos et al., 2005]. Sebbene la microglia abbia una distribuzione omogenea nel SNC, solamente la microglia nel midollo spinale è attivata in conseguenza di un danno a un nervo periferico [Zhang et al., 2008]. Dopo lesione a un nervo periferico, la proliferazione della microglia attivata è stata trovata nel corno dorsale ipsilaterale, mentre la zona contro laterale mostra una debole attivazione [Beggs et al., 2007; Jergova et al., 2007]. Mostra, inoltre, un cambiamento nei marker superficiali, nelle proteine inserite e legate alla membrana, rispetto allo stato a riposo. I marker di superficie attivati comprendono il recettore per il complemento 3 (conosciuto anche come CD11b/CD18, Mac-1, ITGAM o integrina alpha-M) [Coyle, 1998; Eriksson et al., 1993; Liu et al., 1995; Tsuda et al., 2003] che è coinvolto nella fagocitosi [Wieseler-Frank et al., 2005], il recettore Toll-like 4 e il CD14, che sono implicati nella ricognizione fagocitaria [Raghavendra et al., 2004], il CD44, importante nell'adesione e nella migrazione [Sweitzer et al., 2002]; si ha anche l'upregolazione di MHC I e II, che ha un ruolo importante nella presentazione dell'antigene alle cellule T [Sweitzer et al., 2002; Coull et al., 2005]. Questi fattori preparano le cellule gliali ad eliminare i microrganismi e ad aiutare nel processo di fagocitosi. L'attivazione della microglia, inoltre, scatena la secrezione di una varietà di peptidi, come citochine, fattori neutrofici e chemochine. La produzione e il rilascio di citochine proinfiammatorie come IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  portano all'attivazione dei vicini astrociti [Watkins et al., 2003]. La microglia attivata ha, quindi, una doppia funzione regolatoria: rimuove le cellule morte e i residui pericolosi tramite la fagocitosi e la liberazione di fattori tossici, ma ripara anche le cellule danneggiate rilasciando fattori neurotrofici.

## Oligodendrociti

Gli oligodendrociti hanno origine ectodermica, sono piccole (7-8  $\mu\text{m}$  di diametro), con un nucleo rotondo e scuro, scarso citoplasma ricco di microtubuli e prolungamenti brevi, sottili, poco numerosi e poco ramificati (Fig. 28). Sono presenti soprattutto nella sostanza bianca del SNC, dove ciascun oligodendrocita fornisce la guaina mielinica a più fibre nervose contemporaneamente mediante i propri prolungamenti; nella sostanza grigia, fungono da cellule satelliti per i corpi cellulari dei neuroni.



**Figura 28** – Gli oligodendrociti si trovano principalmente nella sostanza bianca del nevrasse, in stretto rapporto con le fibre nervose intorno alle quali costituiscono involucri laminari pluristratificate verso cui svolgono un ruolo trofico.

Nel midollo spinale, molti oligodendrociti derivano da una richiesta specifica della zona ventrale ventricolare, che da origine a precursori di neuroni motori e, dopo un cambiamento neurogenico/gliogenico, alle cellule progenitrici degli oligodendrociti (OPC) [Lu et al., 2002; Su net al., 1998; Takebayashi et al., 2002; Zhou et al., 2002]. Da qui le OPC migrano attraverso il midollo spinale e finalmente si differenziano in oligodendrociti capaci di produrre mielina.

Nel proencefalo, le prime OPC originano nella sporgenza gangliare mediale (MGE) e nell'area entopeduncolare anteriore del proencefalo ventrale. Queste OPC popolano l'intero telencefalo embrionale inclusa la corteccia cerebrale e successivamente si uniscono ad altre OPC provenienti dalle sporgenze gangliari laterale e caudale. Infine, si aggiungono le OPC della corteccia postnatale.

Tre differenti classi di molecole secrete, sembrano essere coinvolti nella migrazione delle OPC i fattori di crescita, come PDGF e FGF [Redwine et al., 1997; Spassky et al., 2001], le molecole chemotropiche, quali netrine e semaforine [Jarjour et al., 2003; Tsai et al., 2003] e le chemochine CXCL1 [De Castro et al., 2005]. Questa migrazione è anche regolata da meccanismi mediati dal contatto che coinvolgono molte proteine della matrice extracellulare, molecole sulla superficie cellulare e N-caderine. Una volta arrivate a destinazione, alcune OPC permangono, mentre la maggior parte si differenziano in oligodendrociti capaci di produrre mielina.

Gli oligodendrociti hanno solo un breve periodo di tempo per la mielinizzazione durante la differenziazione, perché sembra che perdano questa capacità una volta che diventano maturi [Watkins et al., 2008]: infatti, generalmente non agiscono su diversi assoni in momenti diversi, ma in un intervallo ridotto di tempo, tipicamente 12-18 ore. Durante questo processo, gli oligodendrociti devono avvolgere gli assoni strato dopo strato di membrana plasmatica [Barres et al., 2008]: quindi sintetizzano, selezionano e controllano un'enorme quantità di proteine in breve tempo. Le proteine coinvolte in questo meccanismo sono molte: ad esempio, la proteina basica della mielina (MBP) è riconosciuta tramite il trasporto del suo mRNA. La MBP mRNA è assemblata nei granuli del pirenoforo degli oligodendrociti, trasportata lungo i prolungamenti e dopo localizzata sulla membrana mielinica [Aingel et al., 1993,1997]. Un'altra importante proteina è la proteina proteolipidica PLP/DM20, che è trasportata tramite vescicole durante la biosintesi. Due diverse osservazioni suggeriscono che entrambi i sistemi di rilascio sono sotto il controllo neuronale. In primo luogo, colture di oligodendrociti senza neuroni esprimono MBP, PLP e galattosilceramide (GalC): PLP è prevalentemente localizzato a livello cellulare e mostra solo una piccola co-localizzazione con MBP e GalC nella membrana. In co-culture con neuroni, PLP, MBP e GalC sono co-localizzati. Questo riordinamento della membrana plasmatica degli oligodendrociti è estremamente dipendente dalla presenza di MBP: sembra, infatti, agire da accoppiatore di lipidi, portando i diversi strati di mielina a stretto contatto e raggruppando i doppi strati di mielina in senso

laterale. In secondo luogo, in assenza dei neuroni, LPL è prodotto dagli oligodendrociti e subito internalizzato tramite endocitosi; in seguito a segnali neuronali, la velocità di endocitosi è ridotta e PLP è trasportato dalle vescicole alla membrana plasmatica attraverso l'esocitosi. Gli oligodendrociti rivestono gli assoni non solo per isolarli elettricamente, ma inducono anche il raggruppamento dei canali al sodio lungo l'assone al canale di Ranvier, che è un importante prerequisito per la conduzione nervosa saltatoria [Kaplan et al., 1997, 2001]. Anche la sopravvivenza dei neuroni e dei prolungamenti assonali sembra dipendere dal processo di mielinizzazione, poiché assoni con strati modificati di mielina presentano velocità di trasporto assonale alterato e cambiamenti nel numero e nella stabilità dei microtubuli [Edgar et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2001] o sono ingrossati e mostrano segni di degenerazione [Dupree et al., 1999; Garbern et al., 2001; Griffiths et al., 1999; Kassmann et al., 2008, 2009; Lippe-Siefke et al., 2003; Tsai et al., 2003]. La presenza di strati mielinici intatti può anche portare ad un aumento del diametro assonale [Colello et al., 1994; Maso et al., 2001], probabilmente mediato dall'accumulo locale e dalla fosforilazione di neurofilamenti [Sanchez et al., 1996, 2000]. Inoltre, gli oligodendrociti possono provvedere al supporto trofico ai neuroni tramite la produzione di fattori neurotrofici derivanti dalle cellule gliali, quali GDNF, BDNF e IGF-1.

Per mielinizzare correttamente, gli oligodendrociti hanno velocità metaboliche estremamente alte e devono consumare grandi quantità di ATP e ossigeno [McTigue et al., 2008]. La produzione di ATP porta alla formazione di perossido di idrogeno come sottoprodotto tossico e un alto metabolismo cellulare crea anche specie reattive dell'ossigeno, le quali devono essere metabolizzate. Inoltre, la mielinizzazione è sotto il controllo di molti enzimi che richiedono il ferro come cofattore: esso può, in condizioni sfavorevoli, evocare la formazione di radicali liberi e la perossidazione lipidica [Braugher et al., 1986; Juurlink et al., 1997]. Oltre a questo, gli oligodendrociti hanno solo basse concentrazioni di glutazione, che ha un ruolo antiossidante [Thorburne et al., 1997]. Essi esprimono anche un arsenale di molecole che li rendono sensibili alla morte cellulare eccitotossica: portano, infatti, recettori AMPA [Tanaka et al., 2000] e NMDA [Micu et al., 2006;

Salter et al., 2005], che li rendono vulnerabili alla tossicità del glutammato, e i recettori  $P_2X_7$  per l'ATP [Matute et al., 2007], che li predispongono all'azione tossica di livelli elevati di ATP extracellulare. La perdita di oligodendrociti può avvenire anche a causa dell'esposizione a citochine infiammatorie, come il TNF- $\alpha$ , che induce la loro apoptosi legandosi al loro recettore p53 TNF [Jurewicz et al., 2005], o l'interferone  $\gamma$ , che è molto tossico per le cellule OPC in proliferazione, meno per gli oligodendrociti immaturi e non ha quasi effetto su quelli maturi [Horiuchi et al., 2006].

Tutti questi meccanismi non colpiscono, ovviamente, solo gli oligodendrociti, ma queste cellule sono particolarmente sensibili al danno rispetto ad altre cellule, come neuroni o astrociti. La demielinizzazione e la morte degli oligodendrociti sono un aspetto comune delle lesioni infiammatorie della sostanza bianca, in modelli sia sperimentali che umani.

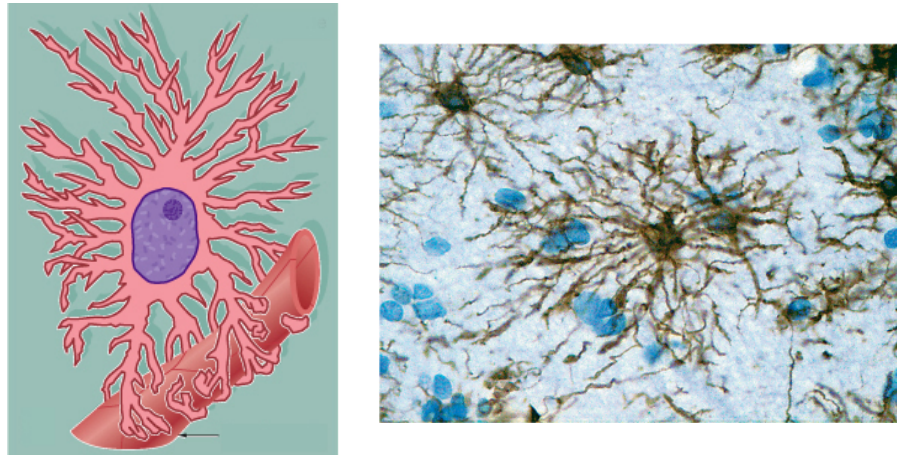
Il ristabilimento di nuovi stati mielinici sugli assoni demielinati non è effettuato dagli oligodendrociti maturi pre-esistenti, ma coinvolge la produzione di nuovi oligodendrociti dal gruppo di OPC: le cellule progenitrici adulte devono passare, quindi, da uno stato quiescente a un fenotipo rigenerativo [Franklin et al., 2008]. Questa transizione sembra essere scatenata da fattori derivanti dalla microglia e dagli astrociti [Glazer et al., 2006; Nait-Oumesmar et al., 2007], e non dalla demielinizzazione di per sé, e porta alla proliferazione e al reclutamento delle OPC verso le aree demielinizzate. A questo punto, la differenziazione delle OPC in oligodendrociti capaci di rimielinizzare comincia. Purtroppo, la correlazione tra diametro dell'assone e spessore della guaina mielinica vista durante il processo di differenziazione è meno apparente nella rimielinizzazione, risultando in segmenti di mielina più corti e più fini [Franklin et al., 2008]; perciò, queste aree risultano essere instabili e possono facilmente andare incontro a nuovi processi di infiammazione e demielinizzazione. Nelle lesioni recenti, la rimielinizzazione può essere facilitata dall'infiammazione e dai macrofagi infiltrati che forniscono al tessuto fattori di crescita [Diemel et al., 1998; Kotter et al., 2001], ma ciò non vale nelle fasi successive. Il fallimento di questo processo può essere dovuto all'età, a cambiamenti associati all'età nella risposta ai fattori di crescita delle

OPC o a una minore capacità di eliminare i detriti mielinici dalla lesione, che sono capaci di inibire questo processo [Kotter et al., 2006; Shield et al., 1999]. Un'estesa rimielinizzazione è prevalentemente vista nelle lesioni del proencefalo localizzate nella sostanza bianca profonda e subcorticale, mentre è più rara nelle aree periventricolari, nel tronco encefalico e nel midollo spinale.

### **Astroцити**

Nel 1895 Santiago Ramón y Cajal propose che gli astroцити, il maggior sottotipo di cellule gliali nell'encefalo, controllasse gli stati di sonno e veglia. Egli propose specificamente che i prolungamenti degli astroцити fossero degli isolanti elettrici che, quando si estendevano tra i neuroni, agissero da interruttori automatici per facilitare il sonno, ma, quando si ritraevano, permettevano ai circuiti neuronali di comunicare, facilitando l'insonnia [Garcia-Marin et al., 2007]. Oggigiorno, più di un secolo dopo la proposta di Cajal, sappiamo che la sua intuizione era, almeno in parte, corretta: gli astroцити hanno un'associazione intima strutturale e funzionale con i neuroni e, grazie alla loro complessa fisiologia, sono capaci di modulare il sonno [Halassa et al., 2009]. Studi di fluorescenza sulla GFAP hanno rivelato solo il 15% del volume degli astroцити e che queste cellule gliali estendono fini prolungamenti che occupano il neuropilo circostante [Bushong et al., 2002]. Gli astroцити occupano zone spaziali non sovrapposte in cui ogni singola cellula ha contatti con centinaia di dendriti e corpi cellulari neuronali e con decine di migliaia di sinapsi, tra cui con più del 50% delle sinapsi eccitatorie ippocampali [Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007; Ventura et al., 2009]. Sono, inoltre, associate intimamente al microcircolo cerebrale, in cui estendono diverse terminazioni [Simard et al., 2003]. Gli astroцити interagiscono con i neuroni in molteplici dimensioni spaziali e temporali: controllando l'ambiente ionico e metabolico possono drammaticamente incidere sull'attività neuronale. Inoltre, gli astroцити, agendo a livello delle sinapsi, regolano le vie di rilascio dei trasmettitori [Haydon et al., 2001; Volterra et al., 2005] (Fig. 29).





**Figura 29** – Gli astrociti sono cellule di origine ectodermica e si distinguono in due tipi: protoplasmatici e fibrosi. I primi sono cellule stellate che si pongono in contatto con i neuroni o con la superficie esterna dei vasi e sono molto importanti per l'organizzazione gliovascolare. Gli astrociti fibrosi, particolarmente numerosi nella sostanza grigia, si ritrovano sia a contatto dei capillari che della pia madre dove costituiscono il cosiddetto strato glioso sottopiale. Entrambi i tipi rappresentano un importante costituente della barriera ematoencefalica.

Gli astrociti possono modulare le proprie caratteristiche elettriche in modo da supportare la normale attività neuronale. Esprimono, infatti, canali  $K_{ir}$  [Butt et al., 2006], che mantengono chiuso il potenziale di membrana astrocitario al potenziale di equilibrio del  $K^+$ . Così, quando il  $K^+$  extracellulare cresce, gli ioni entrano negli astrociti tramite questi canali. Gli astrociti esprimono anche canali al  $K^+$  attivati dal  $Ca^{2+}$  (canali BK), che sono sensibili ai segnali del  $Ca^{2+}$  e rilasciano  $K^+$  dalle terminazioni astrocitarie nei vasi sanguigni [Gordon et al., 2007]. Gli astrociti presentano anche una serie di trasportatori per neurotrasmettitori, quali glutammato [Anderson et al., 2000], GABA [Schousboe et al., 2000] e glicina [Jursky et al., 1996]. Per esempio, quando il glutammato è captato dagli astrociti, l'enzima glutammato sintetasi lo converte in glutammina. Gli astrociti, dopo, rilasciano la glutammina nei terminali sia glutammatergici che GABAergici. Poiché i terminali GABAergici hanno una riserva limitata di glutammina, l'inibizione farmacologica dell'enzima risulta in un fallimento della trasmissione inibitoria sinaptica in condizioni di elevata attività neuronale [Liang et al., 2006]. Una conseguenza può essere lo sviluppo di crisi epilettiche o altri stati psichiatrici [Bernard-Helary et al., 2000,2002]. Quindi, essendo i soli fornitori di glutammina

alle sinapsi, gli astrociti possono potenzialmente modellare l'attività neuronale e l'elaborazione dell'informazione controllando quindi l'inibizione neuronale.

Gli astrociti svolgono un ruolo essenziale nell'omeostasi e nel metabolismo energetico nel SNC [Magistretti et al., 2006]. Queste glialicellule esprimono i trasportatori che mediano l'assorbimento di glucosio dal microcircolo cerebrale. Un importante aspetto strutturale e funzionale degli astrociti è la vasta associazione intercellulare, mediata principalmente dalle gap junctions contenenti connexina 43 e connexina 30, tra astrociti e neuroni [Theis et al., 2005]. Tali giunzioni consentono la diffusione del glucosio [Rouach et al., 2008] e il coinvolgimento di meccanismi postsinaptici nei processi di accoppiamento metabolico. In condizioni di elevata attività neuronale e bassa disponibilità metabolica, l'accoppiamento metabolico è essenziale per il mantenimento della trasmissione sinaptica glutammatergica, con il glucosio che, dopo il suo uptake da parte degli astrociti, viene immagazzinato come glicogeno o metabolizzato a lattato [Tsacopoulos et al., 1996]. Il metabolismo del glicogeno astrocitario è regolato da meccanismi neuronali. Per esempio, in condizioni di aumentato fabbisogno metabolico, la noradrenalina attiva il cAMP degli astrociti, con la conseguente scissione intracellulare del glicogeno. Il glucosio risultante è ulteriormente metabolizzato dagli astrociti in lattato e viene rilasciato nello spazio extracellulare, dove è ricaptato da neuroni. Questo rapporto metabolico tra neuroni ed astrociti, conosciuto come la "navetta del lattato", è un processo altamente dinamico che può essere regolato da una serie di processi fisiologici, tra cui il ciclo sonno/veglia [Magistretti et al., 2006].

Gli astrociti rispondono alle fuoriuscite di trasmettitori dalla vicina sinapsi con un incremento dei livelli di  $Ca^{2+}$ . A livello neuronale, i trasmettitori rilasciati possono legarsi a recettori metabotropici astrocitari, un sottoinsieme dei quali accoppia la proteina Gq alla fosfolipasi C (PLC), con conseguente accumulo di diacilglicerolo (DAG) e IP<sub>3</sub>; l'IP<sub>3</sub> si lega poi al suo recettore e causa il rilascio di  $Ca^{2+}$  dai depositi interni.

Oltre alla normale segnalazione neuronale che prevede il controllo dell'ambiente ionico del neuropilo e il controllo della riserva di

neurotrasmettitorinelle sinapsi, gli astrociti possono direttamente attivare i recettori neuronali tramite il rilascio di gliotrasmettitori.

La gliotrasmissione è un termine che comprende il rilascio di molte sostanze chimiche dagli astrociti, tra cui trasmettitori classici, peptidi, chemochine e citochine, attraverso una serie di diversi meccanismi. L'esocitosi media uno dei percorsi di gliotrasmissione più caratteristici. Essa dipende dall'attracco e dalla fusione delle vescicole alla membrana plasmatica, tramite la formazione di un complesso recettore-proteina sensibile alla N-etilmaleimide (SNARE). Gli astrociti esprimono le proteine coinvolte nella formazione dei complessi SNARE, come sinaptobrevina II [Zhang et al., 2004; Montana et al., 2004], e il suo omologo cellulare sinaptobrevina I [Bezzi et al., 2004], SNAP-23 [Zhang et al., 2004; Montana et al., 2004], e le proteine accessorie a questo complesso, come Munc 18, complessina 2 e sinaptotagmina IV [Zhang et al., 2004]. In colture di astrociti, le proteine SNARE si co-localizzano con un certo numero di organelli vescicolari, comprese le piccole vescicole positive per i trasportatori del glutammato (VGlut 1-3) [Zhang et al., 2004; Montana et al., 2004; Bezzi et al., 2004], vescicole per la conservazione di ATP [Zhang et al., 2007; Coco et al., 2003] e vescicole contenenti D-serina [Mothet et al., 2005], suggerendo il coinvolgimento di meccanismi vescicolari nel rilascio di questi gliotrasmettitori.

Il glutammato è stato il primo gliotrasmettore di cui si è dimostrato il rilascio da parte degli astrociti. La prima prova è stata ottenuta da una cromatografia liquida (HPLC) in colture di astrociti, dove il segnale di  $Ca^{2+}$  evocato dalla bradichinina ha permesso il rilascio di glutammato da queste cellule [Parpura et al., 1994]. Il glutammato astrocitario è stato trovato anche in co-culture con neuroni, dove la bradichinina ha evocato nei neuroni variazioni nei livelli di  $Ca^{2+}$  dipendenti da N-metil-D-aspartato (NMDA) solo in presenza di astrociti. Oltre alla gliotrasmissione vescicolare per il segnale glutammatergico, sono state proposte anche altre vie, tra cui l'inversione dell'uptake da parte dei trasportatori del glutammato [Szatkowski et al., 1990], un efflusso di anioni mediato dal canale [Kimelberg et al., 1990], il rilascio da parte di un antiportore glutammato/cistina [Warr et al., 1999], la diffusione attraverso recettori ionotropici purinergici [Duan

et al., 2003], e un efflusso mediato da emicanali connessina/pannessina [Ye et al., 2003]. Sebbene tutte queste vie possano mediare il rilascio di glutammato, è estremamente importante individuare le condizioni che attivano questi percorsi di rilascio in modo che diventi possibile capire quando sono utilizzati nel sistema nervoso. Come già detto, gli astrociti esprimono un trasportatore cistina/glutammato che è responsabile dell'uptake di cistina, che viene successivamente utilizzata nella sintesi del glutatione. Per esempio, in seguito a una crisi d'astinenza da cocaina, i livelli extracellulari di glutammato nel nucleo accumbens non riescono a ridurre l'attività di questo trasportatore, che scambia il glutammato per la cistina. Per determinare se la ridotta attività di questo trasportatore sia importante per il mantenimento o per il recupero dalla dipendenza da cocaina, Kalivas e collaboratori (2010) hanno sperimentalmente attivato questo trasportatore durante il monitoraggio del comportamento. Sia l'infusione diretta di cistina sia la somministrazione sistemica di N-acetilcisteina, che attiva il trasportatore e aumenta il glutammato extracellulare, impedisce la ricaduta [Baker et al., 2003]. Il gruppo di Sontheimer ha indagato l'importanza del trasporto cistina/glutammato nella crescita di un tumore e ha scoperto che l'inibizione del trasportatore porta ad un rapido esaurimento di glutatione e una riduzione della crescita tumorale [Sontheimer et al., 2008]. Sulla base di questi risultati, studi clinici sono in corso, con l'obiettivo sia di stimolare sia di inibire tale trasportatore.

La gliotrasmissione glutammatergica regolata da  $Ca^{2+}$  agisce su recettori NMDA neuronali extrasinaptici contenenti NR2B, con conseguenti cambiamenti nell'eccitabilità neuronale e nella modulazione della trasmissione sinaptica. Due forme di modulazione sono state osservate, che prevedono, la prima, correnti transitorie lente verso l'interno (SIC) e, la seconda, una modulazione della trasmissione sinaptica mediata dai recettori NMDA. Le SICs sono state osservate in condizioni fisiologiche di  $Mg^{2+}$  extracellulare in fette di cervello isolate dal talamo, ippocampo, corteccia, nucleo accumbens e dal bulbo olfattivo [Fellin et al., 2004, 2006; Parri et al., 2001; D'ascenzo et al., 2007; Angulo et al., 2004; Shigetomi et al., 2008; Navarrete et al., 2008]. Queste correnti hanno

cinetiche distinte che le contraddistinguono da correnti eccitatorie postsinaptiche (EPSCs), e un'azione farmacologica unica, che è coerente con la loro origine non-neuronale (Fellin et al., 2004). Le SICs non sono bloccate da tetrodotossina (TTX) o da perfusione con tossina tetanica (TeNT) a una concentrazione che comporta un'inibizione delle EPSCs [Fellin et al., 2006]. Diversi gruppi hanno dimostrato che, oltre ad un aumento delle SICs, la gliotrasmissione glutammatergica induce un aumento della frequenza delle EPSCs nei neuroni vicini [Jourdain et al., 2007; Fiacco et al., 2004] o può attivare recettori postsinaptici NMDA [Lee et al., 2007]. La modulazione astrocitaria della trasmissione sinaptica dipende da un meccanismo vescicolare, in quanto è attenuato dalla dialisi della catena leggera della TeNT nei singoli astrociti e perché piccole vescicole sono posizionate sulle membrane degli astrociti adiacenti ai recettori presinaptici NR2B che mediano la modulazione sinaptica.

La regolazione dei recettori NMDA è effettuata da diversi segnali. Anche se il glutammato è essenziale per l'attivazione del recettore NMDA, la permeazione di ioni richiede una depolarizzazione simultanea, che dipende dagli ioni  $Mg^{2+}$  che bloccano il poro del recettore a potenziali di membrana negativi. Inoltre, l'attività del recettore è regolamentata da un sito di binding di un coagonista, il sito di legame della glicina [Mothet et al., 2000]. In molte aree del cervello, la D-serina è un ligando endogeno per questo sito. D-serina è sintetizzata dall'enzima serina racemasi, che è espresso prevalentemente negli astrociti [Schell et al., 1995]. Gli astrociti rilasciano vescicole contenenti D-serina in maniera  $Ca^{2+}$  dipendente [Mothet et al., 2005], e questa forma di gliotrasmissione è pensata per regolare la funzione dei recettori NMDA e la plasticità sinaptica [Panatier et al., 2006]. La depressione a lungo termine (LTD) e il potenziamento a lungo termine (LTP) sono due forme opposte di plasticità sinaptica che richiedono gradi diversi di attivazione dei recettori NMDA. L'uso innovativo dell'ipotalamo come modello per l'interazione astrociti-neuroni ha fornito informazioni considerevoli riguardo al ruolo della D-serina nella plasticità sinaptica.

Poco dopo l'osservazione del rilascio di glutammato da parte degli astrociti, diversi gruppi hanno dimostrato che anche l'ATP può essere rilasciato da queste

cellule gliali e che media l'accoppiamento tra astrociti, almeno nelle colture. Nella coltura e in vivo, l'aumento del segnale del  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno di uno degli astrociti può portare ad un'onda di  $\text{Ca}^{2+}$  che si propaga attraverso una rete di cellule gliali accoppiate. In colture cellulari ad alta risoluzione, è stato dimostrato che l'ATP è il segnale di mediazione di questa onda al  $\text{Ca}^{2+}$  [Guthrie et al., 1999]. Elementi di prova notevoli, infatti, dimostrano che l'ATP è un'importante molecola di segnale extracellulare che viene utilizzata dagli astrociti per entrare in contatto sia con altri astrociti, sia con i neuroni.

Esperimenti biochimici hanno dimostrato che i lisosomi sono molto ricchi di ATP. Studi di frazionamento subcellulare hanno rivelato che i livelli più elevati di ATP si trovano nelle frazioni contenenti i marcatori lisosomiali LAMP-1 e  $\beta$ -esosaminidasi. È interessante notare che gli astrociti sembrano essere molto ricchi di Bloc1s1, un gene coinvolto nella biogenesi dei lisosomi [Cahoy et al., 2008], evidenziando la possibilità che gli astrociti richiedono una costante generazione di questi organelli per il rilascio continuo di purine.

Un altro studio ha dimostrato che l'ATP è presente in vescicole astrocitarie con un core denso, che sono positive per la secretogranina II [Coco et al., 2003]. Questo studio ha anche dimostrato che il rilascio di ATP dagli astrociti è dipendente dal  $\text{Ca}^{2+}$  ed è inibito da TeNT. Pertanto, la prova di una via vescicolare  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente del rilascio di ATP dagli astrociti è forte. Tuttavia, se tale emissione è mediata principalmente dai lisosomi o da vescicole con nucleo denso non è ancora chiaro.

In fette di ipotalamo, il rilascio di ATP da parte degli astrociti è necessario e sufficiente per un potenziamento sinaptico noradrenalina-dipendente [Gordon et al., 2005]. Gli astrociti ipotalamici esprimono recettori  $\alpha$ 1-adrenergici, e, in risposta ad input adrenergici, rilasciano ATP nelle vicinanze di neuroni magnocellulari neurosecretori. L'attivazione di recettori P2X7 su questi neuroni, di conseguenza, provoca l'accrescimento dell'espressione del recettore di superficie AMPA e un aumento dell'ampiezza delle correnti eccitatorie postsinaptiche (MEPSC). Al contrario, studi sulla retina dei mammiferi hanno dimostrato il ruolo dei segnali purinergici astrocitari nella repressione dell'attività

neuronale [Newman et al., 2001]. Analizzando fette di retina, Newman ha dimostrato che la stimolazione di fotorecettori utilizzando la luce provoca segnali gliali di  $\text{Ca}^{2+}$  [Newman et al., 2005] e che tali segnali portano al rilascio di ATP da cellule di Muller [Newman, 2005]. Le azioni risultanti sulle cellule gangliari sono mediati dall'adenosina che agisce attraverso i recettori per l'adenosina 1 (A1) per sopprimere l'attività neuronale. Entrambi gli studi hanno dimostrato un rilascio di ATP, ma uno studio ha dimostrato che l'ATP ha azioni dirette, mentre il secondo ha dimostrato che questo gliotrasmettitore agisce attraverso un metabolita, l'adenosina.

Simili azioni repressive dell'adenosina derivata dalla glia sono stati osservati nell'ippocampo [Pascual et al., 2005; Serrano et al., 2006; Zhang et al., 2003]. Gli astrociti ippocampali rilasciano ATP, il quale, dopo la sua degradazione in adenosina da parte delle nucleotidasi extracellulari, provoca un'inibizione presinaptica A1-dipendente della trasmissione sinaptica. Poiché gli astrociti esprimono recettori e utilizzano vie di segnalazione che sono condivise con i neuroni, è difficile usare la manipolazione farmacologica per distinguere il ruolo di queste cellule gliali nella modulazione della fisiologia neuronale. Tuttavia, l'uso di tossine specifiche per la glia [Zhang et al., 2003] e il caricamento selettivo del chelante al  $\text{Ca}^{2+}$  BAPTA negli astrociti [Serrano et al., 2006] hanno mostrato che le azioni soppressive, sopra menzionate, dell'adenosina sulla trasmissione sinaptica ippocampale sono di origine gliale.

Gli astrociti giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo neuronale come nella costituzione e nel mantenimento della barriera emato-encefalica [Cahoy et al., 2008]. Nello stato di riposo, gli astrociti hanno un corpo piccolo con lunghi e fini prolungamenti, isolano i neuroni e gli oligodendrociti per aiutare a mantenere il microambiente del SNC attraverso la regolazione extracellulare delle concentrazioni ioniche di  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e di quelle dei neurotrasmettitori mediante l'uptake. Una volta attivate, queste cellule subiscono ipertrofia, hanno una retrazione dei prolungamenti e proliferano ed aumentano l'espressione dei filamenti intermedi, come la proteina acida fibrillare gliale (GFAP), un marker di attivazione specifico per gli astrociti [Wieseler-Frank et al., 2005; Garrison et al.,

1994]. Infatti, in alcuni modelli di dolore neuropatico, si ha un aumento nella densità di colorazione della GFAP, che è attribuita principalmente all'ipertrofia, piuttosto che alla proliferazione o alla migrazione degli astrociti. Queste funzioni risultano importanti per la presentazione dell'antigene alle cellule T e possono aiutare il passaggio delle cellule T attraverso la barriera emato-encefalica. L'attivazione degli astrociti risulta in un prolungamento dello stato doloroso. A riposo, essi presentano livelli basali dei recettori per le citochine. IL-1 $\beta$ , rilasciata dall'attivazione della microglia, si lega ai recettori IL-1 localizzati sulla membrana degli astrociti, inducendo una serie di eventi intracitoplasmatici che culminano con l'attivazione cellulare. L'attivazione del Toll-like receptor, espresso nelle cellule microgliali, può determinare la sintesi di IL-18, un membro della famiglia delle interleuchine 1, attraverso l'attivazione di una MAP-chinasi (p38-MAPK), nota per indurre l'espressione di citochine proinfiammatorie, come IL-1 $\beta$  e IL-6. Infatti, Miyoshi et al. (2008) hanno riportato che un'iniezione intratecale di IL-18 induce allodinia tattile e attivazione astrocitaria, risultando nella secrezione di IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , come nell'espressione di NO-sintasi, che propaga ulteriormente la risposta infiammatoria e prolunga lo stato di dolore. Un'altra caratteristica degli astrociti è il loro ruolo sia nella deattivazione dell'attività glutammatergica, attraverso l'uptake del glutammato extracellulare, sia nella sintesi di glutammato a partire da glucosio. Il contenuto di glutammato aumenta durante il dolore cronico: esso va ad attivare diversi recettori di membrana ionotropici e metabotropici, in particolare il recettore ionotropico N-metil-D-aspartato, importante per il suo ruolo nella sensibilizzazione centrale dei neuroni nocicettivi del midollo spinale e nell'attivazione degli astrociti attraverso l'influsso di Ca<sup>2+</sup> nelle cellule [Petrenko et al., 2003], che promuove il rilascio di neurotrasmettitori e modula l'eccitabilità di membrana [Hogan et al., 2007]. Gli astrociti presentano, inoltre, due trasportatori per il glutammato: GLT-1 e GLAST. Si ritiene che essi rappresentino il principale meccanismo per la rimozione di glutammato dallo spazio extracellulare [Huang e Bergles, 2004; Tawfik et al., 2006]. Un danno al nervo produce una persistente downregulation di questi trasportatori, dopo un iniziale aumento. Tale diminuzione può portare a una



riduzione dell'uptake del glutammato e un conseguente aumento della trasmissione eccitatoria sinaptica. Ad esempio, il dolore neuropatico è attenuato dal riluzolo, un attivatore dei trasportatori del glutammato somministrato per via intratecale [Sung et al., 2003]. Tuttavia, GLT-1 sembra avere un ruolo opposto in condizioni di dolore acuto: l'iniezione spinale di un inibitore di GLT-1 inibisce, piuttosto che migliorare, il potenziamento a lungo termine (LTP) dei neuroni spinali in seguito a stimolazione tetanica del nervo sciatico [Wang et al., 2006]. Questi studi indicano che i trasportatori per il glutammato potrebbero avere ruoli diversi in condizioni di dolore acuto e cronico. Lesioni del midollo spinale provocano anche un aumento nel plasma e nei tessuti dei livelli di endotelina (ET). ET-1 induce ipertrofia degli astrociti [Rogers et al., 2003]. È interessante notare che i recettori B per l'endotelina (ETB) sono indotti negli astrociti spinali dopo lesioni al midollo spinale [Peters et al., 2003]. Così, le strategie che bloccano i recettori ET seguenti a lesioni del midollo spinale potrebbero ridurre l'ischemia ed anche sopprimere l'astrogliosi e il dolore cronico. Infine, in caso di lesione al nervo, in tutte le cellule gliali spinali, compresi gli astrociti, si ha la fosforilazione delle ERK, proteine che fanno parte della famiglia delle MAPKs e che contribuiscono all'induzione e al mantenimento della sensitizzazione dei neuroni del corno dorsale e all'ipersensibilità [Ji et al., 1999; Ji et al., 2002].

## **Capitolo 6**

## Glia e dolore neuropatico

È stato appurato che la sola attività neuronale fornisce un'incompleta comprensione della creazione e del mantenimento del dolore cronico neuropatico. L'attivazione gliale nel midollo spinale sembra essere un comune meccanismo di fondo in numerose sindromi dolorose con eziologia molto diversa (per esempio, neuropatia diabetica, neuropatia indotta da chemioterapia, l'infiammazione dei nervi periferici e del midollo spinale). Gli astrociti e la microglia hanno ruoli ben documentati nella facilitazione del dolore: essi possono modulare la funzione neuronale sinaptica e l'eccitabilità neuronale tramite vari meccanismi [Halassa et al., 2007; Pocock et al., 2007]. Nel SNC accanto a ruoli caratteristici, presentano alcune azioni sovrapponibili [Haydon, 2001; Kreutzgerb, 1996]. Entrambi i tipi cellulari sono mediatori chiave della risposta immunitaria innata del SNC, che somiglia per molti aspetti alla risposta immunitaria classica [Nguyen et al., 2002].

I fattori che vengono rilasciati in seguito a danno tissutale e che inducono l'attivazione gliale sono vari: specie reattive dell'ossigeno, NO, proteine con difetti di ripiegamento o di aggregazione, fattori nucleari che sono spesso presenti nelle cellule apoptotiche. Inoltre, la glia, nel suo ruolo di struttura immunocompetente, è attivata dall'invasione dei patogeni. Similmente alle classiche cellule del sistema immunitario, compresi i macrofagi e le cellule dendritiche, sia astrociti che microglia vengono attivati da agenti patogeni attraverso il riconoscimento di profili molecolari specifici, da detriti tossici presenti a livello cellulare durante l'infezione o da un danno al tessuto [Nguyen et al., 2002; Medzhitoy et al., 2002]. Astrociti e microglia esprimono una vasta gamma di recettori di riconoscimento, tra cui i recettori Toll-like (TLR) [Olson et al., 2004; Carpentiere et al., 2008]. Dall'attivazione di TLR prendono le mosse processi immunitari, tramite il rilascio di citochine pro-infiammatorie e la fagocitosi [Abdallah et al., 1996; Medzhitoy et al., 1997]. Ad oggi, 13 TLR sono

stati identificati [Carpentier et al., 2008; Beutler, 2004]. Alcuni, come TLR2 e TLR4, sono prevalentemente espressi dalla microglia, ma, in alcune circostanze, possono essere espressi anche dagli astrociti. L'attivazione di TLR2 e TLR4 induce il rilascio di IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 [Allan et al., 2005; Aronica et al., 2005; Hanisch, 2002]. L'attivazione di TLR nel SNC modula la comunicazione neuroni-glia, creando un circuito eccitatorio a feedback-positivo nella via del dolore. Allo stesso modo dei macrofagi e delle cellule dendritiche, gli astrociti e la microglia sono in grado di fagocitare [Husemann et al., 2002; Murphy, 1993] ed eliminare gli agenti patogeni e i detriti tissutali [Faulkner et al., 2004]. Questi processi possono stimolare ulteriormente la liberazione di IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 dalla glia [Hanisch, 2002], mantenendo così l'attivazione gliale.

Diversi studi dimostrano che i recettori TLR hanno un ruolo cruciale nel dolore cronico neuropatico dopo lesione di un nervo periferico: è stato dimostrato che TLR può essere attivato non solo da noti segnali molecolari "non-self", ma anche da segnali endogeni (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6 e NO) prodotti durante gli stati del dolore neuropatico cronico. L'attivazione di TLR2 in astrociti e microglia e l'attivazione di TLR3 nella microglia mediano i processi del dolore neuropatico [Kim et al., 2007; Obata et al., 2008]. TLR4 è anche la chiave per l'attivazione della microglia e lo sviluppo di dolore patologico dopo lesione di un nervo periferico [Tanga et al., 2005]. La fibronectina, un ligando endogeno di TLR4 che viene prodotto in risposta al danno tissutale, porta ad una upregolazione dei purinocettori P2X4, che sono espressi esclusivamente sulla microglia [Nasu-Tada et al., 2006], e sembra che antagonisti di TLR4 nel midollo spinale possano revertire il dolore neuropatico causato da danno al nervo sciatico [Hutchinson et al., 2007, 2008]. È stato recentemente dimostrato che gli oppioidi vadano ad attivare la glia attraverso un recettore che è diverso dal classico recettore oppioide presente sui neuroni [Hutchinson et al., 2007]. Quest'attivazione della glia indotta da oppioidi li induce a liberare citochine pro-infiammatorie neuroeccitatorie, sopprimendo o contro-regolando l'analgesia da oppioidi. L'esposizione ripetuta agli oppioidi porta a un maggiore rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte della glia [Johnson et al., 2004]. L'arresto dell'attivazione gliale indotto dagli

oppioidi migliora l'analgesia acuta da oppiacei e sopprime lo sviluppo di tolleranza. Inoltre, la soppressione dell'attivazione gliale annulla anche lo sviluppo di dipendenza e di crisi d'astinenza e sopprime altri effetti collaterali negativi, come la depressione respiratoria [Hutchinson et al., 2008]. Pertanto, prevenire l'attivazione gliale in risposta agli oppioidi rappresenta un modo promettente per migliorare l'efficacia clinica di farmaci oppioidi.

Anche le proteine da shock termico (HSP) sono implicate nell'attivazione della glia e nel dolore neuropatico [Costigan et al., 1998]. Studi in vitro hanno rivelato che le HSPs possono attivare i TLR nella glia [Ghosh, 2006; Lissitsyn et al., 2007]. Le HSPs sono costitutivamente espresse a livello intracellulare e agiscono da guida, legandosi alle proteine e facilitando il loro ripiegamento dalla conformazione nativa a quella attiva. In risposta allo stress cellulare e all'infiammazione, le HSPs sono up-regolate e proteggono le cellule da alterazioni del ripiegamento e dell'aggregazione proteica [Van Noort, 2008]. Quando le cellule sono danneggiate, stanno morendo o sono morte, le HSPs vengono rilasciate e attivano direttamente le cellule gliali nelle vicinanze, legandosi ai loro TLRs o promuovendo il rilascio di attivatori gliali. HSP60, HSP70 e HSP96 possono indurre liberazione di TNF- $\alpha$  dall'attivazione della glia e delle cellule del sistema immunitario innato attraverso segnali TLR2 e TLR4, mentre è stata dimostrata l'up-regolazione di HSP27 in fibre sensitive danneggiate nelle corna dorsali del midollo spinale e nella circostante sostanza bianca mesi dopo il danno a nervi periferici [Costigan et al., 1998]. Anche se non è ancora stato provato che HSP27 si lega direttamente al TLR, questi risultati supportano l'ipotesi che le HSP scatenano, attraverso i TLR, l'attivazione gliale e i processi pro-infiammatori che contribuiscono al dolore neuropatico [Roelofs, 2006].

Infine, astrociti e microglia esprimono vari recettori per neurotrasmettitori funzionali e sono attivati dai classici neurotrasmettitori e neuromodulatori; quindi, possono ricevere e rispondere ai segnali durante la trasmissione sinaptica. Gli astrociti sono molto noti per il loro ruolo attivo e di integrazione durante la segnalazione sinaptica, e sia microglia che astrociti sono situati in stretto contatto fisico con i neuroni, così come con altri astrociti e microglia, da poter avere

funzioni modulatorie. Quando i neuroni rilasciano ATP, glutammato e sostanza P, essi sono fonte di stimoli per astrociti e microglia. A loro volta, astrociti e microglia rilasciano glutammato e/o ATP, portando a un'ulteriore attivazione neuronale e gliale.

È molto importante porre l'attenzione sui diversi tempi di attivazione della microglia e degli astrociti. La microglia ha un ruolo chiave nella risposta immediata ad un danno del sistema nervoso centrale: in seguito a lesione, infatti, le cellule microgliali si attivano, si raggruppano strettamente intorno ai corpi cellulari dei motoneuroni danneggiati nel corno ventrale del midollo spinale e inducono l'attivazione di vari trasmettitori [Hu et al., 2007]. L'attivazione microgliale spinale nel corno dorsale e ventrale raggiunge il massimo a una settimana dal danno e successivamente presenta un lento declino che perdura alcune settimane [Scholz et al., 2007]. A differenza della risposta microgliale, la proliferazione astrocitaria comincia relativamente più tardi e procede lentamente, ma è mantenuta per un lungo periodo, che può arrivare anche a 5 mesi [Zhang et al., 2006; Zhuang et al., 2005; Echeverry et al., 2007]. I segnali che scatenano e mantengono la proliferazione e l'attivazione astrocitaria non sono ancora ben conosciuti, ma recenti evidenze confermano che la risposta astrocitaria si manifesta secondariamente all'attivazione microgliale nella fase di cronicizzazione del dolore [Scholz et al., 2007].

I neuromodulatori e neurotrasmettitori rilasciati in seguito a lesioni dei nervi periferici attivano gli astrociti e la microglia. In tali condizioni, le successive risposte gliali ai neurotrasmettitori classici e le interazioni glia-neuroni sono alterati. Durante le condizioni di dolore neuropatico, la glia attivata rilascia gli stessi segnali neuroeccitatori che sono rilasciati in condizioni immunogeniche. Per esempio, l'avvio e il mantenimento del dolore neuropatico in modelli animali comporta segnali neuroeccitatori tra cui IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 [Marchand et al., 2005; Watkins et al., 2001]. Inoltre, tutti i segnali neuroeccitatori o neuromodulatori che la glia rilascia (ad esempio sostanza P, aminoacidi eccitatori, NO e ATP) e/o per i quali la glia esprime i recettori sono gli attori fondamentali negli stati di dolore neuropatico. Il lavoro di Coull e colleghi

(2005) ha dimostrato che la microglia, stimolata dall'ATP, segnala ai neuroni nel corno dorsale del midollo spinale. È ormai chiaro che l'ATP derivante dai neuroni attiva recettori purinergici ionotropici (P2X<sub>4</sub>) sulla microglia, che a sua volta conduce al rilascio di ATP microgliale e di BDNF, provocando uno spostamento di depolarizzazione che inverte la polarità della corrente attivata dal neurotrasmettitore inibitorio GABA (acido  $\gamma$ -aminobutirrico) nei neuroni della lamina spinale.

Altri studi hanno dimostrato che il segnale per il dolore neuropatico richiede anche l'attivazione di p38-MAPK microgliali (note anche come MAPK14). Le p38-MAPK sono coinvolte nella cascata di segnali intracellulari sensibili al  $Ca^{2+}$  che portano alla produzione di citochine pro-infiammatorie. È stato ipotizzato che l'attivazione di P2X<sub>4</sub> aumenta il  $Ca^{2+}$  intracellulare e attiva le p38-MAPK [Tsuda et al., 2005]. È stato anche dimostrato che il TNF- $\alpha$  e le MMPs scatenano l'attivazione di p38-MAPK nella microglia nelle corna dorsali del midollo spinale durante il dolore neuropatico periferico. La scissione di pro-IL-1 $\beta$  indotta da MMP9 conduce all'attivazione di p38-MAPK nella microglia durante l'inizio e i primi stadi del dolore neuropatico, mentre la scissione di pro-IL-1 $\beta$  indotta da MMP2 porta all'attivazione degli astrociti durante le fasi successive del dolore neuropatico [Kawasaki et al., 2008].

È emerso anche un ruolo per le chemochine nella segnalazione tra neuroni e glia nel dolore neuropatico. Le chemochine hanno un ruolo nella maturazione e nella circolazione dei leucociti durante malattie infiammatorie [Asensio et al., 1999; Rossi et al., 2000], tali sostanze e i loro recettori sono espressi non solo nelle cellule del sistema immunitario periferico (leucociti) e in diverse popolazioni di cellule gliali, ma anche nei neuroni [Tran et al., 2003]. Diversi studi hanno dimostrato che la chemochina CCL2 e il suo recettore, CCR2, non sono normalmente espressi in condizioni fisiologiche, ma sono drammaticamente upregolati nei DRG e nei neuroni del midollo spinale dopo un danno al nervo periferico [White et al., 2005; Zhang et al., 2006, 2007]. L'espressione di CCL2 e CCR2 sono upregolate in neuroni sensitivi che esprimono TRPV1 dopo lesione del nervo sciatico, e CCL2 viene secreto dai neuroni subito dopo la depolarizzazione

dipendente da capsaicina o  $K^+$  in una maniera  $Ca^{2+}$ -dipendente attività-dipendente [Dansereau et al., 2008; Jung et al., 2008]. L'attivazione di CCR2 aumenta le risposte di neuroni che esprimono sia TRPV1 che TRPA1 al trattamento con capsaicina [Jung et al., 2008]. L'espressione dei CCL2 nell'alamina superficiale del corno dorsale del midollo spinale scatena l'attivazione di astrociti e microglia spinali [Zhang et al., 2005; Thacker et al., 2008]. Mentre l'attivazione della microglia che circonda i neuroni del midollo spinale che esprimono CCL2 raggiunge il picco entro 14 giorni dopo la lesione dei nervi periferici, gli astrociti rimangono efficacemente attivi durante tutto l'interoperiodo del test di 150 giorni dopo il danno al nervo [Zhang et al., 2005]. Questa attivazione sostenuta degli astrociti può essere importante durante la fase persistente di dolore cronico neuropatico.

Anche la chemochina fractalkina (nota anche come CX3CL1) media il dolore patologico [Clark et al., 2007; Lindia et al., 2005; Milligan et al., 2004, 2005]. La fractalkina si lega ad un solo recettore, CX3CR1, ed è espressa dai neuroni del midollo spinale. CX3CR1 è espresso particolarmente nella microglia. La fractalkina esogena è capace di produrre risposte al dolore mediate da IL-1 $\beta$  e IL-6 attraverso l'attivazione della microglia. Lesioni del nervo periferico e l'attivazione dei neuroni nel midollo spinale portano alla scissione della fractalkina indotta da MMP e all'aumento dell'espressione di CX3CR1 nella microglia nelle aree collegate al dolore [Verge et al., 2004]. La microglia attivata nelle corna dorsali esprime anche la catepsina S, una proteasi lisosomiale contenente cisteina che può indurre la scissione della fractalkina durante gli stadi di dolore neuropatico [Clark et al., 2007]. L'espressione di fractalkina e CX3CR1 negli astrociti aumentano il dolore patologico in corso, quindi l'attivazione di CX3CR1 potrebbe essere importante per le fasi croniche del dolore neuropatico, come l'attivazione degli astrociti è fortemente coinvolta nei cambiamenti del dolore in corso. Anche altre chemochine, come RANTES (noto anche come CCL5), IP-10 (conosciuto anche come CXCL10) e SDF1 (noto anche come CXCL12), sono implicate nelle condizioni di dolore neuropatico [White et al., 2007], avvalorando l'ipotesi che le

chemochine sono importanti segnali tra neurone e glia che portano a processi pro-infiammatori e dolore patologico.

Le citochine pro-infiammatorie rilasciate dalle cellule gliali possono condurre al dolore patologico agendo sui loro recettori espressi sui neuroni nelle regioni recettive del dolore del midollo spinale. Ad esempio, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  provenienti dagli astrociti aumentano l'eccitabilità neuronale e la forza sinaptica, aumentando il numero e la conducibilità dei recettori AMPA e NMDA [Beattie et al., 2002; Stellwager et al., 2006]. Altre sostanze neuroeccitatorie che sono rilasciate dalle cellule gliali attivate includono la D-serina, che potenzia notevolmente le funzioni del canale NMDA [Petrenko et al., 2003]. Curiosamente, IL-1 $\beta$  va ad aumentare la conduttanza al Ca<sup>2+</sup> dei recettori NMDA nei neuroni recettivi del dolore nel midollo spinale [Viviani et al., 2003]. Un recente rapporto ha dimostrato che IL-1 $\beta$  induce la fosforilazione di una specifica subunità del recettore NMDA, che porta alla sua attivazione [Zhang et al., 2008]. Inoltre, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 mediano la sensibilizzazione centrale della DRG e delle corna dorsali del midollo spinale e il dolore esagerato, sia autonomamente sia in combinazione [Kawasaki et al., 2008; Ozaktay et al., 2006]. L'apertura del canale del recettore NMDA conduce all'influsso di Ca<sup>2+</sup> e all'aumento della produzione di NO e PGE<sub>2</sub>, che sono coinvolti in amplificazione dell'eccitabilità dei neuroni di proiezione del dolore [Besson, 1999]. L'eccitabilità di tali neuroni è rapidamente aumentata durante l'esposizione a questi prodotti gliali, il che suggerisce che questi esercitano un effetto neuronale diretto. Come discusso in precedenza, uno degli eventi iniziali che si verifica in seguito a lesione del nervo periferico è l'elevazione di Ca<sup>2+</sup> intracellulare, con conseguente attivazione di p38-MAPK e ERK nella microglia. Queste MAPKs possono essere attivate anche da IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ , che portano all'attivazione di diversi fattori di trascrizione (compreso il fattore nucleare  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)) e un'ulteriore secrezione di IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> e BDNF. Tutti questi fattori contribuiscono all'infiltrazione e alla fagocitosi, quindi, agli effetti patologici della glia negli stati di dolore neuropatico. Anche se i meccanismi con cui i prodotti pro-infiammatori gliali aumentano l'eccitabilità neuronale non sono noti, questi dati supportano



l'ipotesi che i tradizionali segnali immunitari come IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 mediano la comunicazione neurone-glia con conseguente dolore patologico [Scholz e Woolf, 2007].

Un numero crescente di studi mirati alla comprensione dei meccanismi coinvolti nelle malattie neurodegenerative forniscono la prova che la microglia e gli astrociti possono essere anche neuroprotettivi [Nguyen et al., 2003; Glezer et al., 2007] attraverso alcuni degli stessi fattori che hanno dimostrato di esercitare effetti sensibilizzanti e/o tossici nel sistema nervoso centrale.

I segnali prodotti da lesioni del nervo periferico o lesioni del midollo spinale che determinano l'attivazione della microglia e degli astrociti possono essere diversi dai segnali che sono indotti in altre circostanze, come nell'invasione dei patogeni o nelle malattie neurodegenerative.

Sia la microglia che gli astrociti sono in grado di riconoscere i segnali di pericolo, che includono frammenti cellulari prodotti da cellule apoptotiche o necrotiche e segnali provenienti da patogeni [Medzhitoy et al., 2002], e li eliminano per fagocitosi. Il potenziale terapeutico di manipolazione di queste funzioni ha portato ad un'intensa ricerca sulle proteine regolatrici neuroimmunitarie: esse sono proteine regolatorie che includono varie proteine di superficie cellulare denominate "profili molecolari associati al self", che sono espresse sulle cellule vitali e funzionano come segnali self per evitare la fagocitosi di cellule sane, e "profili molecolari di self alterati", che innescano la risposta immunitaria [Griffith et al., 2007]. Astrociti e microglia esprimono recettori che riconoscono queste proteine di superficie, con conseguente fagocitosi delle cellule alterate. Questo processo è accompagnato da una down-regulation delle citochine pro-infiammatorie per limitare i danni al vicino tessuto sano [Elward et al., 2003; Tassiulas et al., 2007]. Negli stati di malattie neurodegenerative, in cui i neuroni danneggiati rilasciano le HSPs che legano i TLR, questi processi immunoregolatori spesso diventano disfunzionali. Così, sembra che senza un'adeguata clearance delle cellule morte e detriti cellulari da parte della glia attivata tramite la fagocitosi, la tossicità e il danno cellulare si diffondono nel SNC [Turrin et al., 2006].

Attenzione particolare deve essere data ai recettori Toll-like (TLR). Boivin e colleghi (2007) hanno investigato il coinvolgimento dei TLR nella regolazione del sistema immunitario, nella degenerazione walleriana (WD) e nella rigenerazione del nervo in seguito a lesione del nervo sciatico. Hanno infatti dimostrato che, in topi mutati mancanti di TLR2 e TLR4, solo pochi macrofagi vengono reclutati ed attivati nella radice distale del nervo sciatico, mentre la rigenerazione assonale e il recupero delle funzioni locomotorie sono compromesse. Al contrario, gli animali wild type che ricevono una microiniezione di ligandi dei recettori TLR2 e TLR4 nel sito della lesione del nervo presentano una clearance più veloce della mielina degenerata e recuperano prima rispetto ai ratti trattati con salina. TLR4 ha un ampio spettro di ligandi, compreso il lipopolisaccaride batterico (LPS) e lo zymosan fungino. Alcuni autori [Vallieres et al., 2006] riportano che un'iniezione sistemica di lipopolisaccaride nel topo può accelerare l'eliminazione dei detriti mielinici durante WD nel midollo spinale danneggiato, mentre Boivin e colleghi (2007) confermano che il trattamento con LPS non è sufficiente a promuovere la rigenerazione degli assoni del tratto sensitivo ascendente.

Gli astrociti e la microglia riconoscono i profili molecolari associati a patogeni (PAMPs), con conseguente attivazione di una cascata intracellulare di segnali che è diversa da quella che viene attivata in occasione della clearance di cellule apoptotiche "self" [Tassiulas et al., 2007; Tibrewal et al., 2008]. Per esempio, in caso di uno stimolo patogeno con LPS, le cascate di MAPK, come quelle che coinvolgono ERK, p38 MAPK e JNK, vengono attivate nelle cellule gliali, che portano all'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia NF- $\kappa$ B. L'attivazione della via NF- $\kappa$ B sia negli astrociti che nella microglia porta all'attivazione di una vasta gamma di geni infiammatori (compresi quelli che codificano per TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e chemochine (come CCL2) [DeLeo et al., 2007], oltre a NO e PGE<sub>2</sub>. Inoltre, gli enzimi che tagliano il complemento C3 sono assemblati e formano dei complessi di attacco alla membrana. Tuttavia, le cellule apoptotiche, che sono prontamente fagocitate in assenza dell'attivazione di TLR, inducono l'espressione di una famiglia di proteine regolatrici che sopprimono la via di segnalazione delle citochine (SOCS) [Tassiulas et al., 2007]. Di conseguenza,

le cellule apoptotiche esercitano effetti soppressivi sulla trasduzione del segnale pro-infiammatorio che provoca l'omeostasi tissutale. Dato che gli agenti patogeni sono privi di proteine di superficie associate al "self", che possono agire da inibitori del complemento, la piena attivazione della cascata del complemento può procedere, con conseguente lisi e fagocitosi cellulare.

L'espressione di proteine associate al "self" nel midollo spinale dopo lesione del nervo periferico può essere cruciale per l'attivazione degli astrociti e della microglia e per l'attivazione della risposta immunitaria innata. Questa risposta porta al dolore neuropatico, ma può anche avere un effetto neuroprotettivo. Le proteine che segnalano il "self" agli astrociti ed alla microglia nel midollo spinale possono smorzare e controllare gli eventi immunitari locali che derivano da segnali rilasciati dalle terminazioni nervose afferenti danneggiate. Ad esempio, le chemochine (come CX3CL1 e CCL2) vengono rilasciate dalle terminazioni nervose sensitive del midollo spinale dopo un danno al sistema nervoso periferico e attivano sia astrociti che microglia, con conseguenti modifiche del dolore neuropatico.

È interessante notare che la fagocitosi delle cellule apoptotiche avviene con una down-regulation delle citochine pro-infiammatorie [Tassiulas et al., 2007; Griffith et al., 2007], suggerendo che la fagocitosi e la clearance sono meccanismi protettivi che controllano i processi infiammatori e favoriscono la sopravvivenza. Così, si può ipotizzare che il fine equilibrio tra eventi pro- ed anti-infiammatori nel midollo spinale dopo un danno dei nervi periferici può essere controllato variando l'espressione di pattern molecolari associati al "self" e proteine "self" alterate negli astrociti e nella microglia.

Anche se gli astrociti sono simili alla microglia in alcuni aspetti dei segnali locali immunitari, le funzioni di questi due tipi di cellule probabilmente differiscono nella risposta immunitaria locale quando la lesione al nervo periferico progredisce da una fase acuta a una cronica. Ad esempio, sebbene le cascate intracellulare di MAPK successive all'attivazione di NF- $\kappa$ B si osservano in entrambi i tipi di cellule, solo la microglia attivata risponde a MMP9. Al contrario, l'attivazione prolungata degli astrociti porta alla scissione e all'attivazione di pro-

IL-1 $\beta$  in maniera MMP2-dipendente e provoca anche l'attivazione di p38MAPK. Inoltre, GLT1 e GLAST sono distrutti negli astrociti in caso di danno neuronale, mentre la microglia non esprime questi trasportatori del glutammato. Così, la microglia sembra rispondere a fattori indotti dal danno che vengono rilasciati dai neuroni danneggiati promuovendo la produzione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie e altre sostanze, mentre gli astrociti si attivano in seguito (e per più tempo), quando si verificano alterazioni nella normale attività dei trasportatori del glutammato [Fellin et al., 2006], che riflettono l'esordio precoce e la risposta di lunga durata del dolore neuropatico.

Sia astrociti che microglia possono rilasciare fattori anti-infiammatori che facilitano l'eliminazione di cellule apoptotiche e frammenti di tessuto e che aumentano l'espressione delle proteine associate al "self" per smorzare e fermare le azioni pro-infiammatorie. Ad esempio, nonostante la constatazione che la somministrazione esogena di TNF- $\alpha$  peggiora la neurotossicità indotta da NO in cervelli di topi [Blais et al., 2004], gli studi con gli animali transgenici TNF-knockout hanno dimostrato che il TNF- $\alpha$  microgliale endogeno è importante per la risoluzione di una risposta infiammatoria e la morte di cellule eccitotossiche. Inoltre, anche se la mancanza di TNF- $\alpha$  diminuisce l'attivazione della microglia presto nelle prime 6 ore, un'esagerata attivazione della microglia è stata misurata 4 giorni dopo. Gli autori hanno suggerito che i tempi di azione di TNF- $\alpha$  sono cruciali per la neuroprotezione, e che la mancanza di TNF- $\alpha$  produce un'attivazione incontrollata tardiva della microglia dopo gli eventi neuroeccitotossici. In un studio separato, i recettori purinergici P2RX7, attivati dall'ATP nelle cellule microgliali, diminuiscono la morte delle cellule indotta da glutammato in co-culture neuroni-microglia attraverso le azioni di TNF- $\alpha$  [Suzuki et al., 2004]. Anche se l'attivazione microgliale dei recettori P2X4 dovuta all'ATP media in modo inequivocabile il dolore neuropatico, i P2RX7 della microglia possono esercitare effetti neuroprotettivi attraverso la stessa molecola segnale, il TNF- $\alpha$  [Inoue, 2006].

Diversi fattori microgliali hanno un ruolo protettivo che dipendono dai tempi di rilascio di tali fattori e dalla gravità delle lesioni del SNC. In un modello

neuronale in vitro con diversi livelli di danno ipossico dovuto a glutammato e ATP, la microglia è risultata neuroprotettiva. In un separato studio sui danni prodotti al SNC da parte di LPS in combinazione con un composto surfattante che porta alla lisi cellulare, TLR4 ha mostrato di mediare la neuroprotezione della microglia [Glezer et al., 2007] e di portare ad un aumento della produzione dei livelli di mRNA delle citochine anti-infiammatorie [Hacker et al., 2006]. In particolare, in questi studi sia IL-6 che IL-10 sono fortemente upregulate dopo stimolazione immunitaria [Olson et al., 2004]. IL-10 è una citochina anti-infiammatoria che ha dimostrato di prevenire e revertire il dolore patologico [Milligan et al., 2007], mentre IL-6 è una citochina che ha dimostrato di avere effetti sia nocicettivi che anti-nocicettivi [Flatters et al., 2002]: tuttavia, sembra prevalere un effetto stimolatorio della trasmissione nocicettiva [DeLeo et al., 2007].

Il bilancio tra gli effetti protettivi e nocivi dell'attivazione gliale nel SNC comprende una serie di molecole anti-infiammatorie come pure di risposte immunitarie adattative a stimoli "self", "self alterato" e "non self" che favoriscono la clearance dei frammenti di tessuto e consentono la riparazione [Ozaktay et al., 2006]. Così, la somministrazione di citochine anti-infiammatorie, come IL-10, potrebbe essere un approccio migliore rispetto ad antagonisti delle citochine pro-infiammatorie o a bloccanti dell'intera attivazione gliale.

L'attenuazione farmacologica dell'attivazione gliale può rappresentare un nuovo approccio per il controllo del dolore neuropatico [Watkins et al., 2003]. Attraverso studi su animali, sono stati descritti una serie di composti che inattivano le funzioni gliali, ma la gran parte di essi non sono adatti alla somministrazione sull'uomo: per esempio, il fluorocitrato, che potrebbe andare a inibire l'aconitasi, bloccando così il ciclo dell'acido citrico [Clark et al., 2007], ha effetto sul dolore neuropatico, però risulta essere neurotossico. I composti che sono stati esaminati rientrano in tre grandi categorie: composti che attenuano l'attivazione di astrociti e microglia; composti che inibiscono la produzione di citochine pro-infiammatorie; composti anti-infiammatori.

La *minociclina*, una tetraciclina di seconda generazione, colpisce selettivamente la microglia, senza coinvolgimento di astrociti e neuroni, e può attraversare la barriera emato-encefalica [Wu et al., 2002]. I suoi effetti benefici sono dovuti alla riduzione dell'espressione dell'NO-sintasi e della cicloossigenasi-2 e a una diminuzione nel rilascio di citochine e prostaglandine e all'induzione dell'enzima che attiva l'IL-1 $\beta$  [Yrjanheikki et al., 1998, 1999].

La *propentofillina* è un derivato delle metilxantine ed è in grado di inibire il lipopolisaccaride (LPS), riducendo il rilascio sia di TNF- $\alpha$  che di IL-1 $\beta$  in modo dose-dipendente nelle colture gliali e diminuisce l'allodinia nei modelli animali con resezione di nervo spinale [Tawfik et al., 2007]. Essa riduce l'attivazione degli astrociti, mantenendo però l'uptake astrocitario di glutammato, e inibisce le funzioni potenzialmente tossiche della microglia attivata [Schubert et al., 2000]. Recenti studi hanno inoltre dimostrato che la propentofillina reverte l'allodinia, tale effetto perdura per le successive due settimane dopo l'interruzione del trattamento.

La *pentossifillina* è un inibitore non specifico delle citochine e della fosfodiesterasi: il suo effetto antinocicettivo è legato alla riduzione della produzione di IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , all'inibizione di NF- $\kappa$ B, e alla stimolazione della produzione di IL-10 nel midollo spinale e nell'encefalo [Liu et al., 2007; Vale et al., 2004].

L'*ibudilast* è un inibitore non selettivo delle fosfodiesterasi che sopprime l'attivazione gliale: in cellule gliali attivate in vitro, l'ibudilast blocca in maniera concentrazione-dipendente la produzione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , incrementando invece quella dell'IL-10. Recentemente, Ledebøer et al (2007) hanno dimostrato che, nel ratto, l'ibudilast potrebbe essere efficace nel dolore neuropatico e potrebbe attenuare l'allodinia indotta da danno al nervo sciatico.

Il *plasmide AV333* risulta essere efficace nell'indurre la potente citochina antiinfiammatoria IL-10 dopo iniezione intratecale e sembra revertire il dolore

neuropatico attraverso l'attenuazione dell'attività delle cellule gliali [Mika, 2008].

L'utilizzo di sostanze che inibiscono l'azione della glia può essere utile non solo nel trattamento del dolore, ma anche per aumentare l'efficacia di altri farmaci ed inibire lo sviluppo di tolleranza. Questo è il caso della morfina: alcuni autori, infatti, hanno suggerito che un'incontrollata attivazione delle cellule microgliali può portare ad attività alterate del sistema oppioide [Watkins et al., 2005, 2007] e diminuire la potenza antinocettiva della morfina dopo lesione del nervo [Porreca et al., 1998; Przewlocki et al., 2001, 2005]. Quindi la soppressione dell'attivazione gliale e il risultante blocco nella sintesi di mediatori pro-infiammatori può aumentare l'efficacia della morfina [Watkins, 2007]. Inoltre, il trattamento cronico di morfina attiva le cellule gliali spinali e corticali ed induce lo sviluppo di tolleranza [Song e Zhao, 2001]; il meccanismo su cui si basa non è chiaro: la morfina potrebbe agire direttamente sulle cellule gliali, scatenando alterazioni nella loro morfologia e funzionalità, oppure il responsabile potrebbe essere il glutammato, che viene ricaptato dalle cellule gliali. Alcuni autori pensano che NO, citochine e i prodotti della cicloossigenasi, che influenzano la trasmissione sinaptica, possano indurre lo sviluppo di tolleranza; altri ancora pensano che i fattori scatenanti siano l'attivazione di MAPK e protein-chinasi C (PKC), che hanno un importante ruolo nella cascata segnalatoria intracellulare.

## **Capitolo 7**

### **Scopo della ricerca**

Il dolore cronico, in particolare il dolore neuropatico, spesso non è trattato adeguatamente con farmaci analgesici attualmente in uso.

Lo scopo della ricerca è stato quello di caratterizzare modelli animali di dolore neuropatico per lo studio preclinico del dolore cronico.

Al fine di indagare i meccanismi fisiopatologici responsabili della percezione algica, della sua cronicizzazione e dell'induzione dei fenomeni neuroprotettivi, caratterizzeremo due modelli animali di neuropatia; la neuropatia indotta mediante legatura del nervo sciatico e la neuropatia indotta da oxaliplatino nei suoi aspetti comportamentali, morfologici e molecolari. In entrambi i modelli valuteremo l'iperalgisia, l'allodinia e la coordinazione motoria.

Nel modello della legatura lassa del nervo sciatico di ratto, la legatura viene fatta vicino alla triforcazione del nervo con un filo di sutura. Il dolore acuto si manifesta subito dopo l'operazione con sintomi infiammatori probabilmente causati dal filo di sutura. Per studiare il dolore cronico abbiamo utilizzato un altro modello di dolore indotto da un agente chemioterapico che prevede il trattamento di ratti per 21 giorni con oxaliplatino  $2.4 \text{ mgkg}^{-1}$  per via intraperitoneale [Cavaletti et al., 2001].

L'oxaliplatino è un farmaco antitumorale di prima scelta nella terapia del cancro metastatico colon-rettale [Culy et al., 2000]. Il suo utilizzo in associazione con 5-fluoro-uracile e leucovorina, è stato proposto anche nel cancro alle ovaie, al pancreas, al seno e ai polmoni e nei linfomi non-Hodgkin [Grothey, 2005]. Alle dosi clinicamente raccomandate, l'oxaliplatino ha un profilo di tossicità migliore rispetto ai suoi congeneri platino-derivati: infatti, risulta avere minori effetti collaterali a carico dei sistemi renale, uditivo ed ematologico [Culy et al., 2000]. Nonostante ciò, un numero sempre maggiore di pazienti non è in grado di



terminare i cicli dell'intero trattamento a causa dello sviluppo di una neuropatia e dolore neuropatico indotti proprio dal chemioterapico. Ad oggi, i farmaci disponibili per la cura del dolore neuropatico, quali antiepilettici e antidepressivi, riescono a controllare, almeno in parte, il fenomeno doloroso, ma nessuno di questi riesce ad intervenire direttamente sul danno tissutale nervoso alla base dell'insorgenza della sintomatologia dolorosa. D'altra parte la sovrapposizione esistente tra le vie segnalatorie del dolore e quelle dei processi neuroconservativi rende difficile raggiungere il duplice obiettivo di curare lo stato doloroso e riparare il danno tissutale. Tra i meccanismi fisiopatologici responsabili del dolore, crescenti evidenze vanno a favore del ruolo della glia: la glia risulta implicata sia nell'induzione e nel mantenimento del dolore neuropatico che nella rigenerazione del danno tissutale [Scholz e Woolf, 2007; Mika, 2008; Vallejo et al., 2010].

Nei tessuti degli animali trattati analizzeremo le alterazioni a carico del sistema nervoso periferico e centrale mediante l'analisi istologica ed immunistochemica in microscopia ottica e immunofluorescente in microscopia confocale. In particolare si cercherà di misurare i livelli di espressione di antigeni, quali CD68, NF200 e ATF3 i quali entrano in gioco in caso di danno. Infatti il Cluster di Differenziazione 68 (CD68) è una glicoproteina che si lega a lipoproteine di bassa densità ed è espressa specificamente nei monociti e nei macrofagi pertanto ci darà indicazioni. Il Neurofilamento 200 (NF200) è un filamento intermedio specificamente espresso nei neuroni dove durante la crescita neuronale sembra controllare direttamente il diametro assonico. Il fattore di attivazione della trascrizione 3 (ATF3) è una proteina che presenta due isoforme: una più corta (deltaZip2) che non è in grado di interagire col DNA e stimola la trascrizione presumibilmente sequestrando dei cofattori inibitori del promotore, e una più lunga che ha l'effetto contrario, ovvero reprime piuttosto la trascrizione a partire dai medesimi promotori. In diversi studi, ATF3 è utilizzato come marker di danno nervoso in quanto la sua espressione sembra aumentare nel danno nervoso periferico [Hubbard et al., 2008].

La componente gliale verrà valutata prendendo in considerazione i vari tipi cellulari che caratterizzano sia il SNP che il SNC. Quindi verranno considerate le cellule satelliti dei gangli spinali, la microglia e gli astrociti nel midollo spinale e in alcune aree cerebrali maggiormente implicate nella trasmissione algica. La glia sarà identificata mediante l'espressione della glutamina sintetasi (GS) presente nelle cellule satelliti gangliari, mediante l'utilizzo della proteina gliale fibrillare acida (GFAP) espressa negli astrociti e della molecola 1 legante calcio ionizzato (Iba1) espressa nelle cellule microgliali.

La GS (glutamina sintetasi) catalizza la conversione dell'ammoniaca e del glutamato in glutamina. E' un ottamero formato da subunità di 45 kDa la cui funzione è quella di detossificare il cervello dall'ammoniaca. Questo enzima presenta un importante ruolo nella regolazione metabolica del neurotrasmettitore glutamato e la sua attività è regolata dalla adenilazione.

La GFAP (proteina gliale fibrillare acida) è uno dei filamenti intermedi che si pensava fosse specifica per gli astrociti. Più tardi è stato dimostrato che la GFAP è localizzata nei fibroblasti glomerulari e peritubulari del rene di ratto, nelle cellule di Leydig dei testicoli, nei cheratinociti cutanei, negli osteociti, nei condrociti (in particolare delle epiglottidi, nei bronchi e cartilagini di epiglottide e bronchi) e nelle cellule stellate di pancreas e fegato. Nonostante il numero di studi effettuati utilizzando come cellula marker, si pensa che la GFAP aiuti a mantenere la struttura e la forma degli astrociti ma la loro funzione primaria rimane tuttora non compresa pienamente.

L'Iba1 (molecola 1 legante calcio ionizzato) è una proteina della famiglia EF di 17 kDa specifica dei macrofagi e della microglia, i cui livelli di espressione aumentano durante l'attivazione di queste cellule. La proteina è il prodotto del gene *Aif1*, altamente espressa nel testicolo e nella milza, ma debolmente espressa anche nel cervello, nel polmone e nel rene. Tra i tipi cellulari del SNC, il gene *Iba1* è stato visto essere specificamente espresso nella microglia.

## Capitolo 8

### Materiali e metodi

#### Animali utilizzati

Negli esperimenti sono stati impiegati ratti di sesso maschile di razza Sprague-Dawley, della ditta Harlan-Italia (Udine, Italia), con il peso di circa 200g (Fig. 30) e mantenuti in un ambiente controllato a temperatura di  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Durante il periodo di stabulazione, di almeno tre giorni, gli animali sono tenuti in gabbie di plastica con lettiera di trucioli di legno; in ogni gabbia sono posti 10-15 ratti. L'illuminazione della camera di stabulazione segue il normale ciclo giorno-notte: la luce resta accesa dalle 7:00 alle 19:00.

Il mangime standard è fornito in forma di pellets mentre l'acqua viene messa in biberon collocati, insieme al cibo, sul coperchio della gabbia.

L'animale può accedere liberamente al cibo e all'acqua ad eccezione del periodo in cui si svolge l'esperimento.

In accordo con quanto stabilito dal codice etico di sperimentazione tutti gli animali sono "naive" e vengono utilizzati una sola volta.



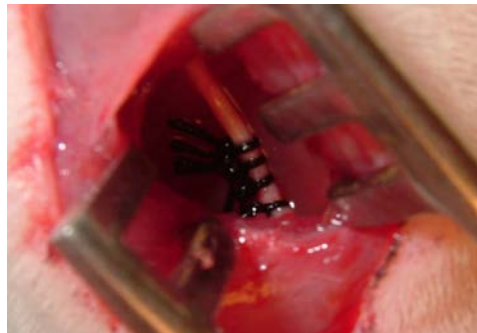
**Figura 30** – Ratto di sesso maschile di razza Sprague- Dawley

## Modelli di iperalgesia

### Iperalgesia indotta mediante legatura del nervo sciatico

Il modello di dolore neuropatico ottenuto mediante legatura del nervo sciatico, causa una sindrome dolorosa, caratterizzata da iperalgesia.

La legatura del nervo sciatico viene fatta aprendo la zampa circa a metà della coscia per mettere in evidenza il nervo vicino alla sua triforcazione. Qui vengono fatte 4 blande legature con un filo da sutura, alla distanza di circa mezzo centimetro l'una dall'altra, come mostrato nell'immagine sottostante (Fig. 31).



**Figura 31** – Legatura lassa del nervo sciatico (CCI)

L'iperalgesia si manifesta tre giorni dopo l'operazione, ha un picco massimo dopo 15 giorni e inizia a diminuire spontaneamente dopo 30 giorni dall'intervento. Durante tutta la prima settimana post-intervento si manifestano sintomi infiammatori probabilmente causati dal filo da sutura.

### Iperalgesia indotta da oxaliplatino

La riduzione della soglia algica viene indotta dalla somministrazione di oxaliplatino 2.4 mg kg<sup>-1</sup> precedentemente disciolto in soluzione glucosata al 5% per 5 giorni consecutivi alla settimana per 3 settimane (15 somministrazioni). Al termine del trattamento la soglia di percezione al dolore dei ratti risulta essere statisticamente ridotta rispetto ai controlli [Cavaletti et al., 2001].

## Via di somministrazione

Le iniezioni intraperitoneali (i.p.), sono state eseguite secondo la pratica di Lane-Petter (1972). Tale tecnica prevede che l'ago venga inserito nell'addome in modo da formare un angolo di circa 15 gradi con il piano costituito dall'addome stesso, indifferentemente a destra o a sinistra della linea mediana, non troppo in alto, per non lesionare il fegato, ma neanche troppo in basso, per evitare di perforare la vescica.

Le concentrazioni dei farmaci sono state preparate in modo tale da somministrare un volume di liquido non superiore a 10 mL per Kg di peso corporeo.

## Test per la valutazione degli effetti anti-iperalgici

### Test Paw pressure

E' stato utilizzato un analgesimetro (Ugo Basile, Varese). Sulla zampa posteriore dell'animale viene applicata una pressione crescente a velocità costante (32 g/s) mediante un supporto conico non appuntito (Fig. 32). La soglia nocicettiva del ratto viene espressa come quella forza a cui l'animale reagisce retraendo la zampa o vocalizzando [Leighton et al., 1988].



**Figura 32** – Apparecchiatura per effettuare il test del paw pressure.

### Test von Frey

Gli animali sono stati posti in una gabbia di plexiglas di 20cm x 20cm x 15cm il cui pavimento è costituito da una griglia metallica e lasciati ambientare per 15 minuti. Sotto la griglia metallica è stato posto un apparecchio di Von Frey elettronico (Ugo Basile, Italia) montante uno specillo metallico flessibile con il quale è stata stimolata la faccia volare della zampa anteriore dell'animale. La pressione esercitata incrementava progressivamente fino a un massimo di 50 g con un'accuratezza di 0.2 g (Fig. 33). La soglia di sensibilità della zampa è stata definita come la minima pressione richiesta per ottenere un riflesso di retrazione della zampa chiaro e immediato. I movimenti volontari associati alla locomozione non sono stati considerati come risposta. Lo stimolo è stato applicato cinque volte su ciascuna delle zampe anteriori e ogni valore riportato come soglia di sensibilità è la media di 10 misurazioni consecutive [Sakurai et al., 2009].



**Figura 33** – Apparecchiatura per il test von Frey

### Test della piastra fredda

E' stato eseguito impiegando un contenitore di acciaio inossidabile nel cui fondo è presente un pavimento di ghiaccio. La temperatura di 4 °C viene mantenuta costante mettendo la base e le pareti esterne del contenitore a contatto con un bagno di ghiaccio (Fig. 34). La soglia di sensibilità è stata ottenuta misurando il tempo che intercorre tra quando l'animale viene posto sulla piastra ed il momento in cui reagisce alla bassa temperatura leccandosi le zampe.



Figura 34 – Piastra fredda.

### Test rota-rod

L'integrità delle capacità di coordinazione motoria dell'animale e quindi eventuali effetti tossici capaci di indurre atassia è stata analizzata con l'ausilio dello strumento Rota Rod (Ugo Basile, Varese, Italia) utilizzato alla velocità di 10 rivoluzioni per minuto (Fig. 35).

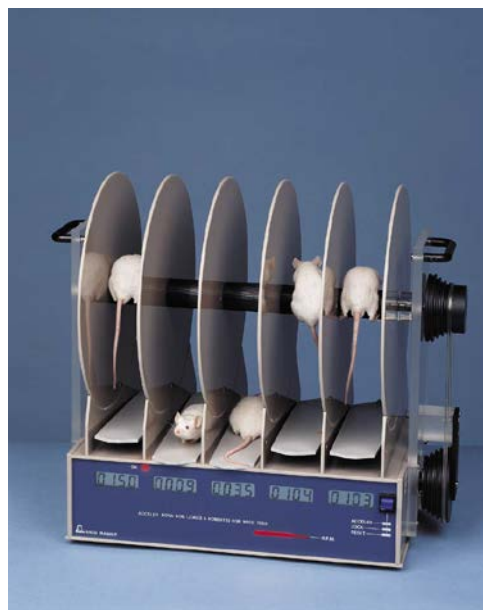


Figura 35-Rota rod.

L'animale è stato posto sull'asta rotante per 10 minuti nei quali vengono contati il numero di cadute e il tempo complessivo di permanenza in equilibrio. Il test è stato eseguito in accordo al metodo descritto da Vaught et al., [1985].

## **Analisi dei dati**

Tutti i risultati sperimentali sono espressi come media  $\pm$  S.E.M.. E' stata condotta un'analisi della varianza (ANOVA) *one way*, seguita dal test di Bonferroni per verificare la significatività tra due medie. L'analisi della varianza e il test di Bonferroni sono stati eseguiti con il programma statistico OriginPro 8.1. Sono stati considerati significativi valori di  $P < 0.05$  o  $P < 0.01$ .

## **Prelievi dei tessuti**

### **Prelievi da ratti con legatura del nervo sciatico**

Dopo decapitazione si è proceduto al prelievo della porzione di nervo destro che si estende a partire da un centimetro dopo la legatura fino alla triforcazione. Lo stesso tipo di prelievo è stato effettuato sul nervo sinistro utilizzato come nervo di controllo. Appena prelevati i nervi, alcuni sono stati fissati in formalina tamponata al 4%, disidratati, inclusi in paraffina e colorati con la metodica Azan-Mallory in modo da distinguere le cellule della matrice extracellulare e le fibre del collagene del tessuto connettivo mentre altri campioni sono stati pre-fissati in glutaraldeide al 4% in tampone cacodilato e poi fissati in tetrossido di osmio all'1% e infine inclusi in paraffina; sono state ottenute sezioni di 7  $\mu\text{m}$  di spessore per ogni campione.

### **Prelievi da ratti trattati con oxaliplatino**

Dopo decapitazione si è proceduto al prelievo per ogni ratto dei gangli, dei nervi sciatici, del midollo e dell'encefalo.

I nervi e alcuni gangli sono stati immersi in una soluzione di formalina tamponata neutra al 4% per 12h, disidratati e inclusi in paraffina; sono state poi eseguite sezioni di 7  $\mu\text{m}$  di spessore.



Il midollo spinale, l'encefalo e alcuni gangli sono stati fissati in una soluzione di paraformaldeide al 4%, immersi in gradienti di saccarosio al 10 e al 20% e congelati in vapori di azoto liquido; sono state poi eseguite sezioni di 25 µm di spessore.

## **Colorazioni**

### **Azan – Mallory**

Le fette di 7 µm vengono sparaffinate e portate fino all'acqua distillata. Si effettua quindi una prima colorazione in azocarminio per 60' a 56 C°. Dopo averle raffreddate per 10' a temperatura ambiente si lavano in acqua distillata. Segue una differenziazione in olio di anilina allo 0,1% in etanolo a 90°. La differenziazione si deve protrarre fino a che i nuclei non appaiono distinti. Successivamente le fette devono essere lavate in alcool acidulato (100 ml di alcool 96° e 1 ml di acido acetico) e fissate in una soluzione di acido fosfotungstico al 5% per 1 ora. Dopo un rapido lavaggio in acqua distillata le fette vengono messe in un altro colorante composto da 0,50 g di blu di anilina e 2 g di orange G in 100 ml d'acqua e 8 ml di acido acetico. In fine i vetrini vengono disidratati nuovamente e montati con balsamo sintetico.

### **Tetrossido di osmio.**

Una volta prelevati i campioni sono stati pre-fissati in glutaraldeide al 4% in tampone cacodilato per 2 ore a temperatura ambiente. Segue un lavaggio in tampone cacodilato 0,2 M e saccarosio al 15% per 30' a temperatura ambiente. Successivamente i campioni vengono fissati in tetrossido di osmio all'1% in tampone millonig ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,135% +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.42%) per 1 ora sempre a temperatura ambiente. Infine i campioni vengono disidratati e inclusi in paraffina.

## **Immunoistochimica**

Le sezioni sono state trattate con la tecnica immunistochemica per la rivelazione di CD68, NF200, ATF3. Le perossidasi endogene sono state bloccate incubando le sezioni in perossido di idrogeno allo 0.3%. I campioni sono stati incubati con un “blocking serum” per ridurre le reazioni non specifiche e poi incubati con l’anticorpo primario overnight a 4°C. Sono stati usati i seguenti anticorpi: l’anticorpo monoclonale di topo anti-CD68, l’anticorpo monoclonale di topo anti-NF-H e l’anticorpo policlonale di coniglio anti-ATF3 diluiti 1:50 in PBS (Santa Cruz.).

Le successive tappe della procedura sono state eseguite usando il “kit staining system ABC” (Santa Cruz. California.USA), seguendo le istruzioni dei produttori.

L’immunoreattività di CD68, ATF3 e NF200 è stata messa in evidenza mediante l’incubazione delle sezioni in 0.7 mg/mL<sup>-1</sup> di 3,3’ diaminobenzidina e 0.7 mg/mL<sup>-1</sup> di perossido di idrogeno in 0.06 M di TBS (Tris-Buffered Saline) e in Vector VIP Substrate kit (Vector Laboratories).

Dopo lavaggio in PBS i vetrini sono stati montati con il Micromount (DiaPath).

I controlli sono stati eseguiti omettendo l’anticorpo primario o incubando le sezioni con una IgG non specifica alla stessa concentrazione dell’anticorpo primario.

Tutte le sezioni sono state trattate con la tecnica immunistochemica, per ciascun anticorpo, nella stessa batteria per eliminare variazioni inter-batteria.

## **Immunofluorescenza**

Le sezioni sono state trattate con la tecnica immunofluorescenza per la rivelazione di GFAP e di Iba1. Le cellule sono state permeabilizzate in Triton allo 0,5% per 30 minuti e i nuclei sono stati marcati con propidium iodium iodide diluito 1:30 in PBS per 4 minuti. Le fette sono state incubate con il “blocking serum” per ridurre le reazioni non specifiche e poi con l’anticorpo primario. Sono stati usati i seguenti anticorpi: l’anticorpo monoclonale di topo anti-CD68 (Santa-Cruz), l’anticorpo monoclonale anti-glutamina sintetasi (Millipore), l’anticorpo policlonale di coniglio anti-GFAP (DakoCytomation) e l’anticorpo policlonale di coniglio anti-Iba1 (Wako) diluiti 1:500 in blocking.

Dopo incubazione overnight a 4°C, le fette sono state incubate con l'anticorpo secondario fluorescente Alexa 488 anti-rabbit diluito 1:200 per 1h a temperatura ambiente. Dopo lavaggio in PBS, i vetrini sono stati montati in balsamo acquoso ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen).

I controlli sono stati eseguiti omettendo l'anticorpo primario o incubando le sezioni con una IgG non specifica alla stessa concentrazione dell'anticorpo primario. Tutte le sezioni sono state trattate con la tecnica immunistochemica, per ciascun anticorpo, nella stessa batteria per eliminare variazioni inter-batteria.

## Western blot

Il tessuto è stato omogenato in un buffer di lisi contenente Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 allo 0.5% e inibitori delle proteasi (Complete, Roche). L'omogenato è stato incubato in ghiaccio per 30 minuti e successivamente sonicato, sempre in ghiaccio, alla massima potenza per 10 secondi, per tre volte, intervallate da 10 secondi in ghiaccio. Infine è stato centrifugato per 15 minuti a 13.000 x g a 4°C. Le proteine, presenti nel supernatante sono state prelevate e sottoposte a dosaggio spettrofotometrico con il metodo dell'acido bicinconinico (BCA; Sigma-Aldrich, Italia). I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel poliacrilammide in presenza di SDS, per separare l'estratto proteico (30µg) e successivamente trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Biorad, Italia). I siti aspecifici della nitrocellulosa sono stati bloccati mediante una soluzione di latte in polvere senza grassi al 5% in tampone salino fosfato (PBS), contenente lo di Tween 20 allo 0,1% (TPBS), per 1 ora. Dopo aver incubato le membrane con lo specifico anticorpo primario in TPBS per tutta la notte a 4°C le membrane sono state lavate in TPBS e incubate con l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi, diluito 1:5.000 in TPBS. Dopo svariati lavaggi le bande sono state visualizzate mediante ECL (Pierce, USA). L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata mediante il programma "Scion Image". Ogni risultato è stato normalizzato con quello ottenuto per la  $\beta$ -actina.

## Valutazioni morfometriche

Per la morfometria sono state utilizzate per i nervi le sezioni trattate con tetrossido di osmio mentre per i gangli le sezioni colorate con Azan-Mallory. Le sezioni sono state analizzate con un microscopio Zeiss EM 109. I parametri morfometrici sono stati valutati, utilizzando Pro Plus Imaging System (Immagini e Computer, Rho, Italy). Per ogni nervo sono state valutate, almeno 50 fibre mieliniche. Per ogni fibra è stata tracciata la circonferenza esterna e il perimetro dell'assone; l'area della fibra e dell'assone sono state ricavate comparandole a quella di due cerchi di area equivalente. Inoltre sono stati calcolati lo spessore della mielina, *g-ratio* (diametro dell'assone/diametro della fibra) e indice di circolarità. Per ogni ganglio sono stati valutati l'area del neurone e il numero dei nucleoli di almeno 30 corpi neuronali. La media di ogni animale è stata comparata per l'analisi statistica.

## Valutazioni dell'intensità di reattività

E' stata eseguita anche un'analisi quantitativa per valutare l'intensità della reattività di CD68, ATF3 e NF200 nei gangli e nel midollo spinale e l'intensità di reattività della glia nelle aree cerebrali. A tale scopo è stata misurata la densità ottica utilizzando Pro Plus Imaging System (Immagini e Computer, Rho, Italy). L'intensità di reattività è stata espressa in unità arbitrarie standardizzate da 0 a 250, essendo 0 il massimo di reattività e 250 l'assenza di reattività.

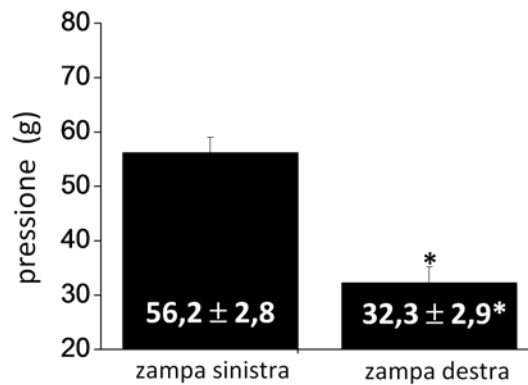
## Analisi Statistica

E' stato usato il t-test per campioni appaiati per confrontare i controlli con i trattati. Una probabilità inferiore a 0,05% ( $p < 0,05$ ) è stata considerata statisticamente significativa.

## **Capitolo 9**

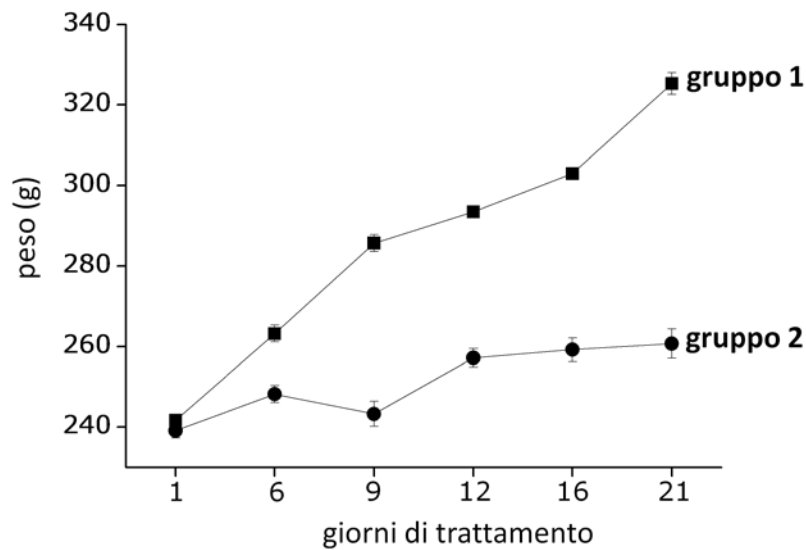
### **Risultati**

Nel modello di neuropatia indotta dalla legatura del nervo sciatico, la sindrome dolorosa caratterizzata da iperalgesia inizia circa 3 giorni dopo la legatura del nervo e raggiunge un plateau fra 7 e 30 giorni. Dopo 15 giorni dall'operazione, i risultati del Paw-pressure test (Figura 36) mostrano che la zampa destra dei ratti con la legatura sono in grado di sopportare una pressione minore ( $32.3 \pm 2.9\text{g}$ ) rispetto alla zampa controlaterale non legata ( $56.2 \pm 2.8\text{g}$ ).



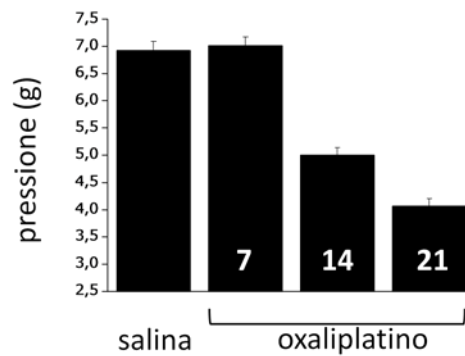
**Figura 36** – Neuropatia indotta dalla legatura lassa del nervo di ratto. Comportamento. Induzione di dolore neuropatico al 15 giorno dalla legatura. Valutazione dell'iperalgia meccanica mediante Paw-pressure test. L'apparecchio è stato fornito dalla ditta ugo basile, Varese, Italia. \*P<0,01 rispetto ai controlli trattati con soluzione fisiologica.

La somministrazione quotidiana di oxaliplatino alla dose di  $2.4 \text{ mgkg}^{-1}$  i.p. induce al 21 giorno una neuropatia caratterizzata da evidenti alterazioni comportamentali. In Figura 37 sono riportati i cambiamenti di peso corporeo dei ratti durante il periodo di trattamento.

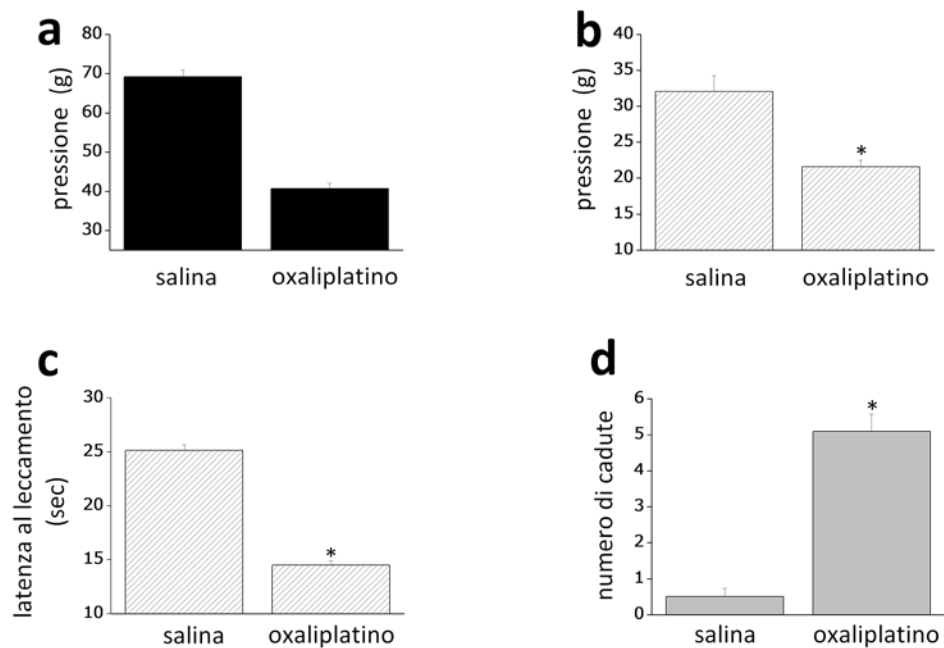


**Figura 37** – Neuropatia indotta da oxaliplatino nel ratto. cambiamenti del peso corporeo durante il periodo di trattamento. Diminuzione del peso corporeo nei ratti trattati con oxaliplatino (gruppo 2) rispetto ai ratti di controllo (gruppo 1).

Alla fine del trattamento, considerando l'aumento di peso dovuto all'accrescimento corporeo dell'animale, si riscontra una significativa riduzione del peso negli animali sottoposti a trattamento rispetto ai controlli (animali trattati con soluzione fisiologica). In Figura 38 sono riportati i risultati del Paw-pressure test effettuato dopo 7, 14, 21 giorni dal trattamento: l'iperalgisia si manifesta significativamente a 21 giorni tanto che la zampa posteriore dell'animale trattato sopporta una pressione minore di  $40.7 \pm 1.3$  g rispetto a  $69.2 \pm 1.7$ g della zampa posteriore dei ratti di controllo (Figura 39a). Tali animali manifestano un'accresciuta sensibilità anche alla stimolazione meccanica non dolorosa come quella indotta dal filamento di Von Frey (da  $31.1 \pm 2.15$  g del controllo a  $21.62 \pm 0.86$  g del trattato; Figura 39b), così come alla stimolazione termica valutata nel test della piastra fredda dove la latenza al leccamento dell'animale trattato è  $14.5 \pm 0.4$  s rispetto ai  $25.1 \pm 0.5$  s del controllo (Figura 39c). Il test del Rota-rod permette di evidenziare anche un'alterata coordinazione motoria dal momento che il numero di cadute da un'asta rotante in 10 minuti aumenta da  $0.50 \pm 0.22$  a  $5.1 \pm 0.48$  (Figura 39d).



**Figura 38** – Neuropatia indotta da oxaliplatino nel ratto. Comportamento. Induzione di dolore neuropatico a 7, 14 e 21 giorni dalla legatura. Valutazione dell'iperalgisia meccanica mediante paw-pressure test.



**Figura 39** – Neuropatia indotta da oxaliplatino nel ratto. Comportamento. a) Induzione di dolore neuropatico al 21 giorno di trattamento con oxaliplatino 2,4 mg/kg i.p., valutazione dell'iperalgisia meccanica mediante paw-pressure test. b) Allodinia meccanica misurata con l'apparecchio di von Frey. c) Riduzione del tempo di permanenza su di una superficie a 4°C (piastra fredda) segno di allodinia termica. d) Coordinazione motoria misurata nel test del Rota rod e riportata come numero di cadute in 10 minuti da un'asta rotante (10 rivoluzioni per minuto). Tutti gli apparecchi sono stati forniti dalla dita Ugo Basile. \*P<0,01 rispetto ai controlli trattati con soluzione fisiologica.



## **Sistema nervoso periferico**

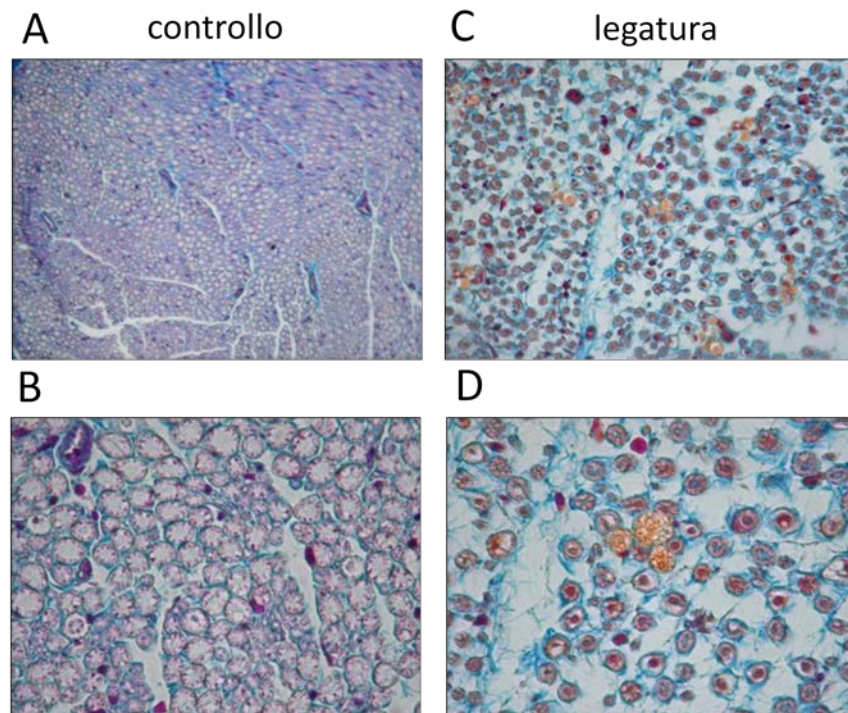
### **Osservazioni morfologiche e valutazioni morfometriche**

L'esame istologico è stato effettuato sia sul nervo sciatico che a livello del ganglio corrispondente annesso alle radici posteriori (DRG, Dorsal Root Ganglia). Allo scopo sono state ricavate fette di 7  $\mu\text{m}$  successivamente colorate con la metodica Azan-Mallory, mediante la quale è possibile distinguere le cellule dalla matrice extracellulare ed evidenziare le fibre collagene del tessuto connettivo. In particolare l'Azocarminio evidenzia in rosso acceso sia i nuclei che le neurofibrille, mentre in rosso pallido il citoplasma; successivamente la miscela policroma di Mallory colora in blu le fibre collagene. Mediante tale indagine si è cercato di individuare alcuni tipi di alterazione quali la presenza di infiltrato infiammatorio, di fibrosi, di fibre nervose e/o assoni danneggiati oppure altri tipi di alterazioni che fossero comunque visibili con il trattamento suddetto.

## **Legatura lassa del nervo sciatico**

### **Nervo sciatico**

L'analisi morfologica del nervo legato è stata confrontata con quella effettuata nel nervo controlaterale non legato, valutando alcuni parametri istologici. In primo luogo abbiamo potuto osservare l'instaurarsi di edema nella zona vicino alla legatura, visubilizzabile come rarefazione delle fibre. Questa rarefazione comporta anche l'instaurarsi di una fibrosi e il conseguente aumento del collagene. Durante la prima settimana la zona operata manifesta anche i sintomi di un infiammazione, dovuta al filo di sutura. Ciò si mette in evidenza come infiltrato leucocitario nell'endonevrio. In questi nervi è stato possibile riscontrare anche una degenerazione degli assoni, che risultano più piccoli e meno compatti e con mielina alterata. Abbiamo infine valutato la presenza di strutture caratteristiche della degenerazione delle fibre nervose, detti ovoidi, presenti principalmente nella zona vicino alla legatura (Figura 40).

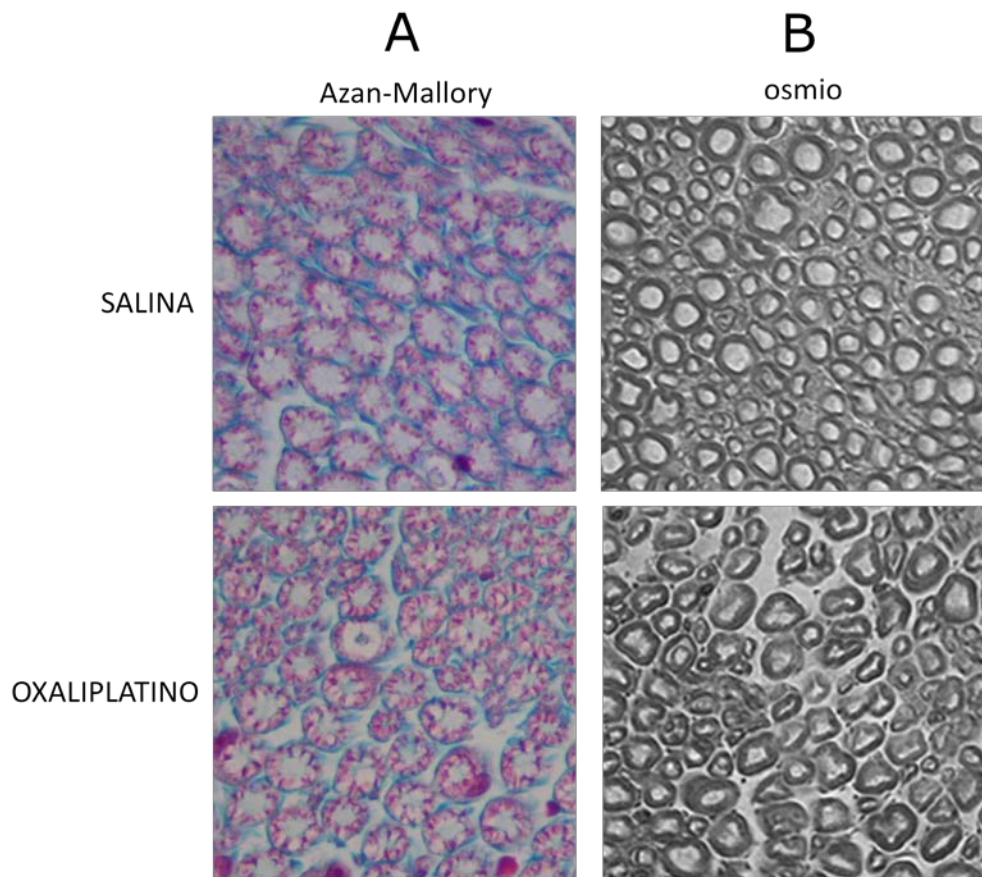


**Figura 40** – Caratterizzazione morfologica. nervo sciatico. Il nervo legato è stato prelevato al 15 giorno dalla legatura ed è stato analizzato in confronto al nervo contro laterale. Le valutazioni morfologiche e le misure morfometriche sono state effettuate su sezioni di 10  $\mu\text{m}$  colorate secondo la metodica Azan-Mallory. Le immagini sono state assunte a un ingrandimento di 10X e 40X. Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni nervo e 5 campi per sezione.

## Somministrazione intraperitoneale di oxaliplatino

### Nervo sciatico

L'analisi ha permesso di rilevare che la struttura del nervo sciatico di ratti trattati con oxaliplatino non mostrava alterazioni morfologiche di rilievo rispetto agli stessi nervi provenienti da ratti trattati con soluzione fisiologica (controlli). Infatti sia l'epinevrio che il perinevrio apparivano costituiti da connettivo lasso di spessore normale. Nell'ambito del nervo erano visibili fibre nervose di diverso calibro, provviste di guaina mielinica variabile proporzionalmente alla dimensione assonica. Nei preparati non si sono evidenziate alterazioni neppure a carico delle cellule di Schwann (Figura 41).



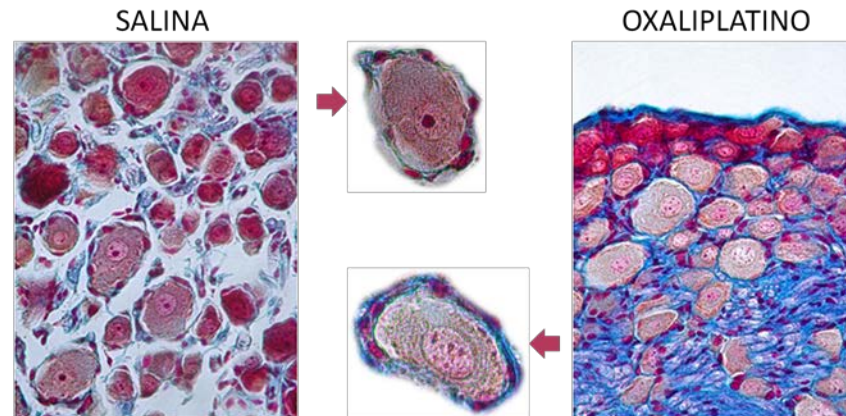
**Figura 41** – Caratterizzazione morfologica: nervo sciatico. Il nervo sciatico è stato prelevato al 21 giorno di trattamento con oxaliplatino ed è stato analizzato in confronto al nervo prelevato da ratti trattati con soluzione fisiologica. Le valutazioni morfologiche sono state effettuate su sezioni di nervo di 10  $\mu\text{m}$  colorate secondo la metodica Azan-Mallory (A), mentre le misure morfometriche sono state condotte su sezioni fissate in osmio (B). Ciascuna immagine è stata assunta ad ingrandimento 20X. Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni nervo e 5 campi per sezione.

A questa prima valutazione è seguita l'analisi morfometrica mediante la quale sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: numero totale delle fibre, densità delle fibre normali rispetto a quelle danneggiate, diametro delle fibre, area occupata dalle fibre, diametro assonico e area mielinica espressi dal loro rapporto (G ratio). Per effettuare questo tipo di quantificazione ci siamo avvalsi di fette di nervo sciatico trattate con osmio e tagliate allo spessore di 7  $\mu\text{m}$ . I risultati dimostrano che i ratti trattati con oxaliplatino non presentavano variazioni significative di tutti i parametri considerati rispetto ai ratti controllo (dati non mostrati).

**DRG**

Le valutazioni istologiche effettuate sui gangli annessi alle radici posteriori corrispondenti ai mielomeri L4-L5 non hanno evidenziato alcuna alterazione a carico della capsula che appariva costituita da connettivo fibroso di spessore normale. Per quanto riguarda i neuroni principali, mentre i pirenofori mostravano un contorno regolarmente circolare, alcune differenze significative sono state messe in evidenza relativamente alla loro dimensione. Infatti, proprio in base a tale parametro, i corpi dei neuroni gangliari possono essere raggruppati in tre categorie: pirenofori di piccole dimensioni, con un'area inferiore a  $600 \mu\text{m}^2$ , di medio calibro, con un soma di area compresa tra  $600$  e  $1200 \mu\text{m}^2$  e pirenofori grandi con una superficie superiore a  $1200 \mu\text{m}^2$ . Nei ratti trattati con oxaliplatino per 21 giorni si è riscontrata una lieve ma significativa diminuzione dei corpi dei neuroni di medio e piccolo calibro (Tabella III). L'esame ultrastrutturale ci ha consentito di evidenziare ulteriori differenze a carico dei nucleoli, sia per quanto riguarda il numero che la loro posizione all'interno del nucleo. Infatti solitamente nel soma è presente un voluminoso nucleolo che occupa una posizione centrale all'interno del nucleo; la Figura 42 mostra che il trattamento con oxaliplatino induce un aumento significativo del numero dei nucleoli e una variazione della posizione del nucleolo che appare disposto eccentricamente all'interno del nucleo (la Tabella III riassume i dati ottenuti). Dal punto di vista della sofferenza cellulare non erano presenti segni particolari, né tantomeno alterazioni indicative della presenza di un fenomeno infiammatorio in atto (presenza di infiltrato, di edema o di fibrosi).

Infine, per quanto riguarda le cellule satelliti non si sono evidenziate alterazioni di rilievo circa la loro morfologia; il loro aspetto risultava infatti normalmente appiattito ed erano strettamente aderenti ai pirenofori dei neuroni principali a formare un involucro continuo (Figura 42).



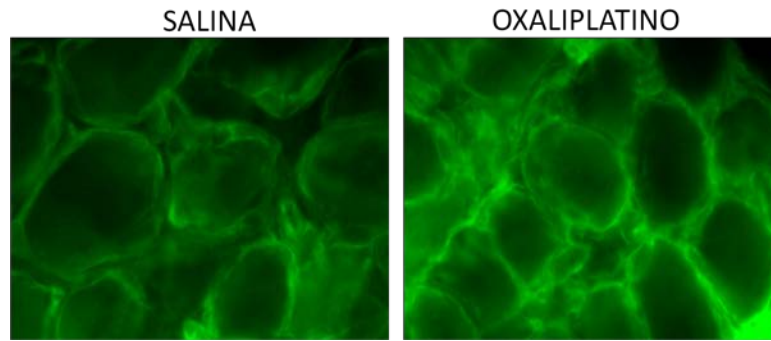
**Figura 42** – Caratterizzazione morfologica: ganglio spinale L4-L5. Sono stati analizzati i gangli spinali L4 e L5 in sezioni di 10  $\mu\text{m}$  colorate secondo la metodica Azan-Mallory. Ciascuna immagine è stata assunta a un ingrandimento 20X.

**Tabella III**

|        | area soma            |                          |                       | n° nucleoli      | posizione nucleoli |
|--------|----------------------|--------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|
|        | <600 $\mu\text{m}^2$ | 600-1200 $\mu\text{m}^2$ | >1200 $\mu\text{m}^2$ | %                | %                  |
| salina | 423.7 $\pm$ 9.3      | 939.9 $\pm$ 26.0         | 1324,2 $\pm$ 9.6      | 6.3 $\pm$ 1.5    | 11.7 $\pm$ 2.7     |
| OXA    | 358.6 $\pm$ 18.1*    | 826.8 $\pm$ 25.3*        | 1328.3 $\pm$ 23.7     | 34.1 $\pm$ 2.5** | 23.9 $\pm$ 2.6**   |

**Tabella III** – Sono riportate le misure dell'area del soma dei neuroni gangliari, raggruppati in tre categorie: pironofori di piccole dimensioni, con un'area inferiore a 600  $\mu\text{m}^2$ , di medio calibro, con un soma di area compresa tra 600 e 1200  $\mu\text{m}^2$  e pironofori grande con una superficie superiore a 1200  $\mu\text{m}^2$ . Sono inoltre descritte la percentuale di nuclei multinucleolati e la percentuale di nuclei in posizione eccentrica. per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni ganglio e 5 campioni per sezione. \*P< 0.05; \*\*P< 0.01.

Tuttavia, la valutazione del loro grado di attivazione mediante tecniche di immunostochimica utilizzando un anticorpo diretto contro la glutamina sintetasi, ha messo in luce un significativo aumento di tale enzima (Figura 43).



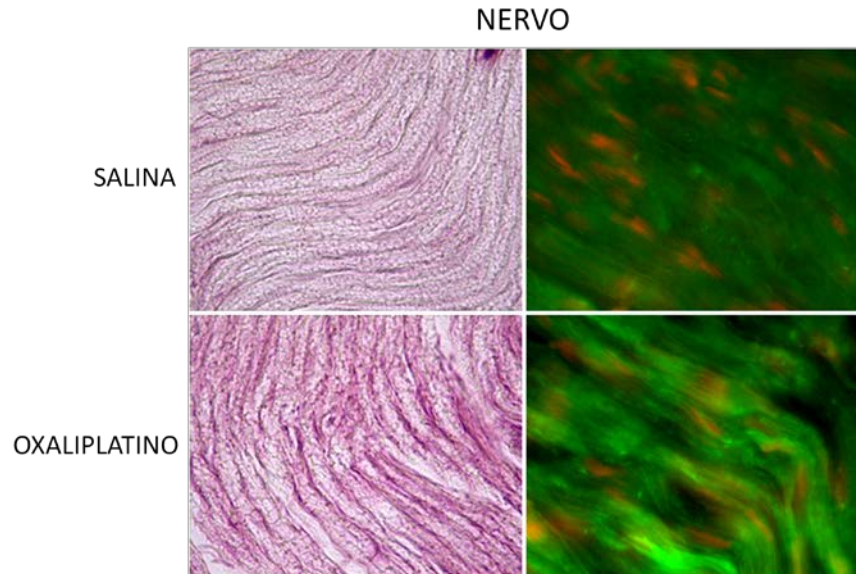
**Figura 43** – Cellule satelliti dei gangli L4-L5, glutamina sintetasi. Sezioni di ganglio di 10  $\mu\text{m}$  sono state incubate con un anticorpo primario specifico per la glutamina sintetasi (1:200) e osservate al microscopio a fluorescenza dopo reazione con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). Ciascuna immagine è stata assunta a un ingrandimento 20X. Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni ganglio e 5 campi per sezione.

#### **Livelli di espressione di ATF3 e NF200: immunoistochimica e Western blot**

Dal momento che un'analisi di tipo prettamente morfologico ci consentiva di evidenziare soltanto modeste alterazioni, abbiamo voluto indagare lo stato di salute dei nervi e dei gangli valutando parametri molecolari noti per entrare in azione a seguito di danno. Per tale ragione, mediante tecniche di immunistochimica e Western blot, sono stati misurati i livelli di espressione di ATF3 (Activating Transcription Factor 3), un fattore di trascrizione noto per la sua entrata in gioco a seguito di lesione, e di NF200 (NeuroFilament 200), uno dei filamenti intermedi la cui espressione è nota variare in numerose condizioni sperimentali.

I risultati di tali misurazioni effettuate sui nervi sciatici di ratti trattati con oxaliplatino e su ratti di controllo sono mostrati nelle Figure 44, 45, 46 e 47.

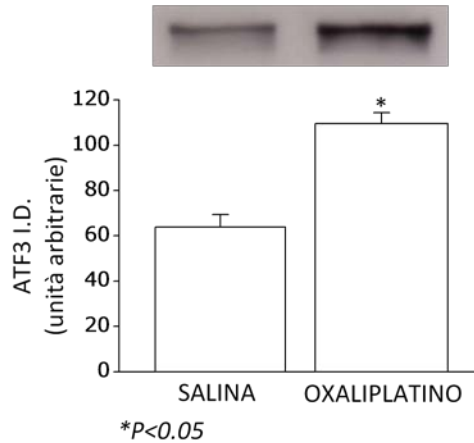




**Figura 44** – Nervo sciatico, ATF3. Sezioni di nervo di 10  $\mu\text{m}$  sono state incubate con un anticorpo primario specifico per ATF3 (1:50) e osservate al microscopio ottico dopo reazione colorimetrica con VIP e al microscopio a fluorescenza dopo reazione con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). I nuclei sono evidenziate mediante colorazione con ioduro di propidio. Ciascuna immagine è stata assunta a un ingrandimento 40X. Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni nervo e 5 campi per sezione.

La valutazione semiquantitativa dei livelli di espressione di ATF3 ha consentito di evidenziare un aumento significativo di tale fattore nei ratti sottoposti a trattamento rispetto a quelli di controllo. In particolare la valutazione effettuata mediante tecniche di immunoistochimica ha messo in evidenza un aumento significativo di tale fattore (Fig. 44). La sua misurazione mediante western blotting ha confermato i suddetti risultati (Fig. 45).

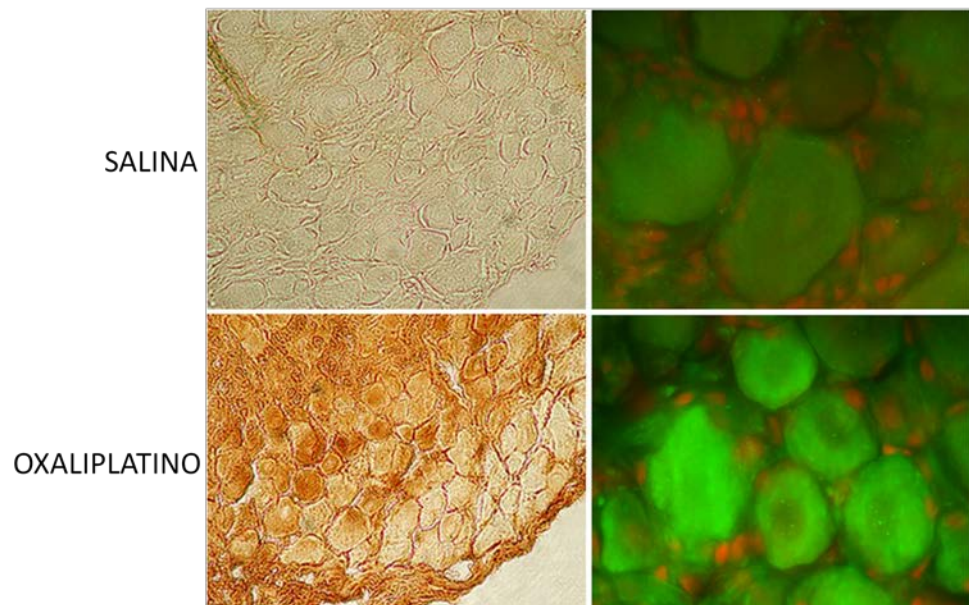
Un'attenta analisi morfologica ci ha inoltre consentito di affermare che tale aumento ha interessato sia i prolungamenti che le cellule di Schwann delle fibre mielinizzate, mentre non ha riguardato gli assoni amielinici appartenenti alle fibre sensitive di piccolo calibro.



**Figura 35** – Nervo sciatico, ATF3. Tale antigenè è stato valutato anche mediante western blotting, è riportata un'immagine rappresentativa e la valutazione semiquantitativa effettuata mediante analisi densitometrica. I valori sono espressi come media  $\pm$  s.e.m.; sono stati considerati significativi i valori con  $*P<0.05$ , rispetto ai trattati con salina.

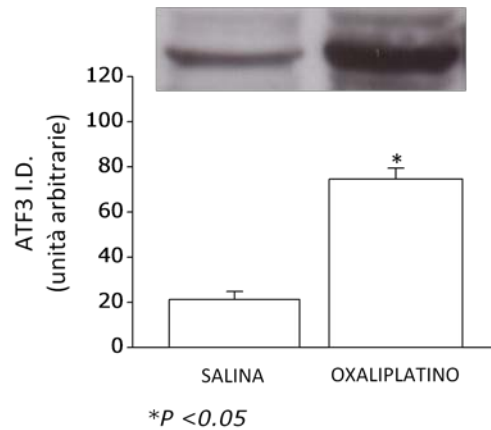
I dati ottenuti sui gangli (Figure 46 e 47) confermano a tutti gli effetti quelli del nervo: i ratti trattati con oxaliplatino presentano un aumento nei livelli di espressione di ATF3, misurato sia mediante tecniche morfologiche (Figura 46) che biochimiche (Figura 47). Tuttavia tale aumento non riguarda i neuroni di piccolo calibro (eccetto rari casi) ma soltanto quelli di medio e grosso calibro.

#### L4-L5 DRG



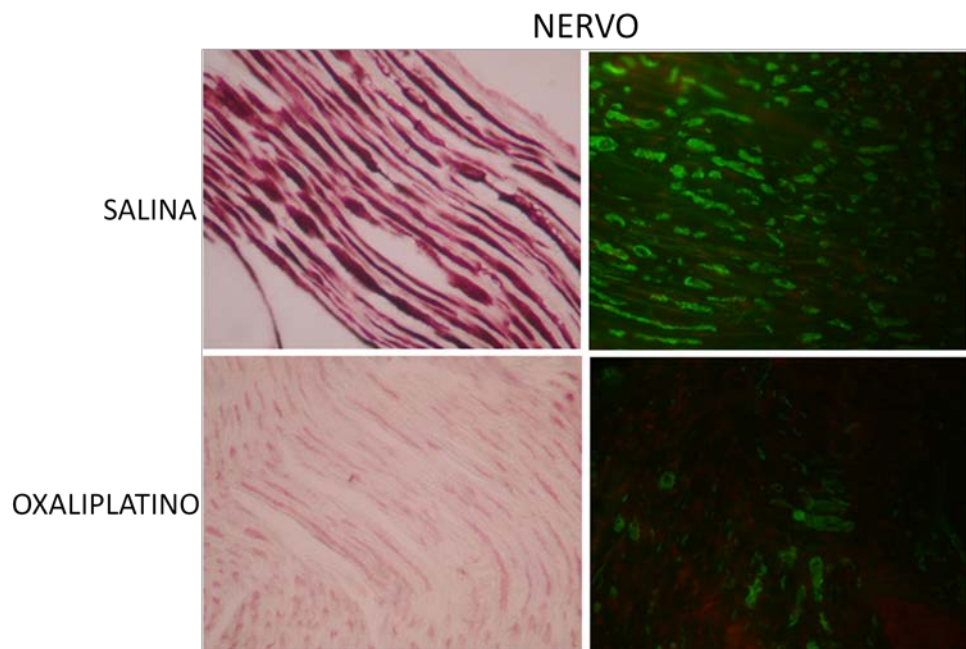
**Figura 46** – Gangli dorsali L4-L5, ATF3. Sezioni di ganglio di 10  $\mu$ m sono state trattate come riportato in Fig. 44 ed osservate sia al microscopio ottico (mediante DAB) che a fluorescenza.



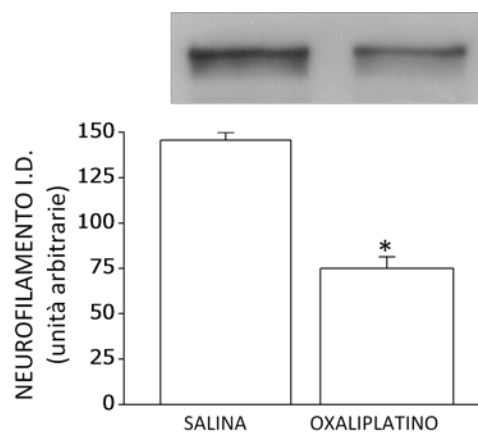


**Figura 47** – Gangli dorsali L4-L5, ATF3. Valutazione semiquantitativa di ATF3 effettuata mediante misurazione densitometrica delle bande ottenute tramite western blotting (vedi Fig. 45).

Per ciò che concerne le variazioni nei livelli di espressione di NF200 nei nervi di animali trattati con oxaliplatino abbiamo riscontrato che tale proteina risulta notevolmente espressa nei nervi di controllo (Figure 48 e 49). Infatti in questo gruppo di animali quasi tutti gli assoni mostrano alti livelli di espressione di NF200, mentre i nervi degli animali trattati con il chemioterapico mostrano una sua significativa riduzione.



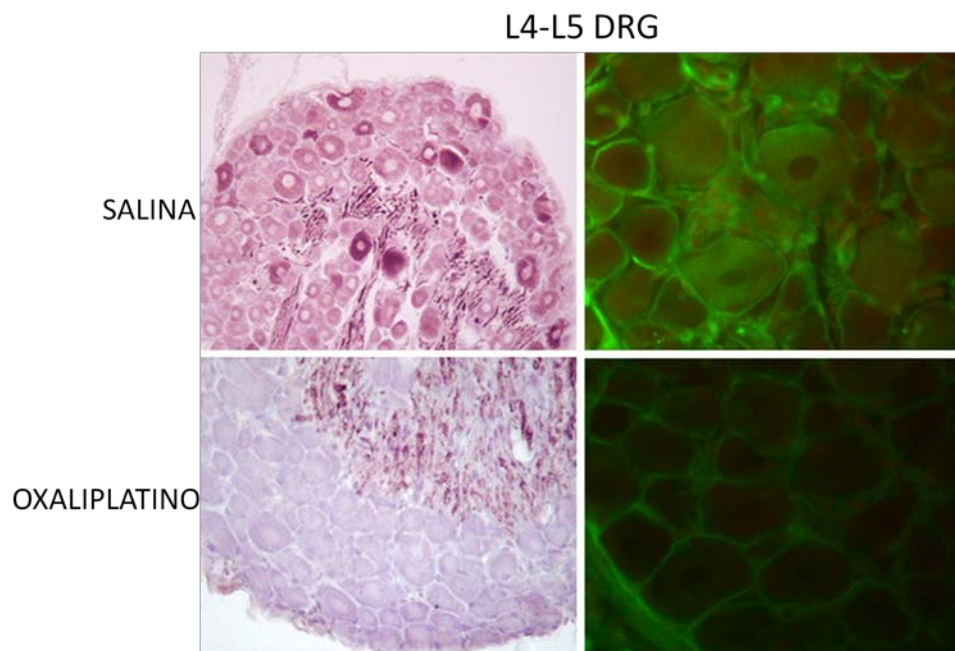
**Figura 48** – Nervo sciatico, neuro filamento (NF200). Sezioni di nervo di 10  $\mu\text{m}$  sono state incubate con un anticorpo primario specifico per NF200 (1:50) e osservate al microscopio ottico dopo reazione colorimetrica con VIP. Al microscopio a fluorescenza dopo reazione con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). Ciascuna immagine è stata assunta a un ingrandimento 20X. Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni nervo e 5 campi per sezione.



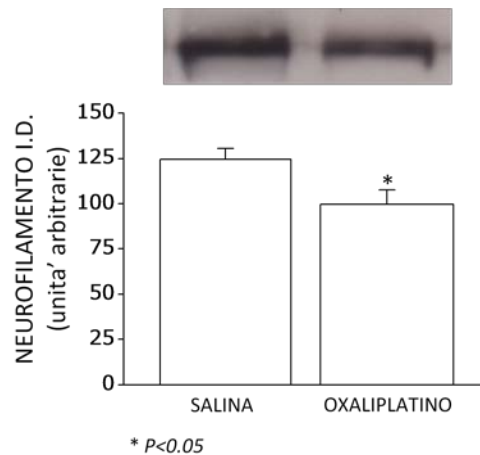
**Figura 49** – Nervo sciatico, neuro filamento (NF200). NF200 è stato valutato anche mediante western blot; è riportata un'immagine rappresentativa e la quantificazione mediante analisi densitometrica. i valori sono espressi come media  $\pm$  s.e.m.; sono stati considerati significativi i valori con  $*P < 0.05$  rispetto ai trattati con salina.

Le stesse valutazioni effettuate nei DRG (Figure 50 e 51) hanno messo in evidenza sia che questo tipo di neurofilamento è espresso ad alti livelli anche dai neuroni gangliari, ma anche che esso è particolarmente presente nei neuroni di medio calibro (area compresa tra 600 e 1200  $\mu\text{m}^2$ ), mentre i neuroni di maggiori

dimensioni presentano dei livelli di espressione minore. Il trattamento con oxaliplatino induce una drastica e significativa diminuzione dei livelli di espressione sia nei neuroni di medio che di grande calibro, mentre i neuroni di piccolo calibro che esprimono la proteina a valori bassi anche nei controlli, non subiscono significative variazioni.



**Figura 50** – Gangli dorsali L4-L5, neuro filamento (NF200). Sezioni di ganglio di 10  $\mu\text{m}$  sono state incubate con un anticorpo primario specifico per NF200 (1:50) e osservate al microscopio ottico dopo reazione colorimetrica con VIP (ingrandimento 20X); al microscopio a fluorescenza dopo reazione con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200) (ingrandimento 40X). Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse per ogni ganglio e 5 campi per sezione.



**Figura 54** – Gangli dorsali L4-L5, neuro filamento (NF200). Valutazione di NF200 mediante western blot: è riportata un'immagine rappresentativa e la quantificazione mediante analisi densitometrica. I valori sono espressi come media  $\pm$  s.e.m.; sono stati considerati significativi i valori con \*P<0.05 rispetto ai trattati con salina.

Tali evidenze dimostrano come sia possibile, a livello molecolare, rilevare variazioni dovute ad effetti tossici dell'oxaliplatino nel sistema nervoso periferico. D'altra parte è noto che ATF3 è una proteina originalmente identificata per la sua abilità di legare il sito degli elementi di risposta al cAMP (CRE) e recenti pubblicazioni mostrano come la sua espressione sia indotta in condizioni patologiche, quali ipossia, stress metabolico, danno al DNA, danno nervoso e danno da UV, condizioni nelle quali esercita un ruolo di mantenimento dell'integrità genomica [Carlton et al., 2009]. Analogamente, una diminuzione dell'espressione di NF200, normalmente incorporato lungo tutto l'assone tanto da regolarne il diametro, è indice di danno nervoso [Hubbard et al., 2008].

## Sistema nervoso centrale

### Midollo spinale

I risultati ottenuti a livello dei gangli avevano evidenziato una forte gliosi a carico delle cellule satelliti dimostrando una induzione dei meccanismi di difesa del sistema nervoso. Al fine di valutare se il trattamento con oxaliplatino fosse in grado di determinare alterazioni neurochimiche in grado di scatenare una risposta da parte delle cellule gliali anche a livello del sistema nervoso centrale,

abbiamo valutato lo stato di attivazione della microglia e degli astrociti sia nel midollo spinale che nell'encefalo. Allo scopo abbiamo utilizzato tecniche di immunohistochimica con anticorpi diretti contro antigeni specifici di questi tipi cellulari, cercando di valutare sia i livelli di espressione che la morfologia cellulare in quanto indicativa dello stato di attivazione di queste cellule.

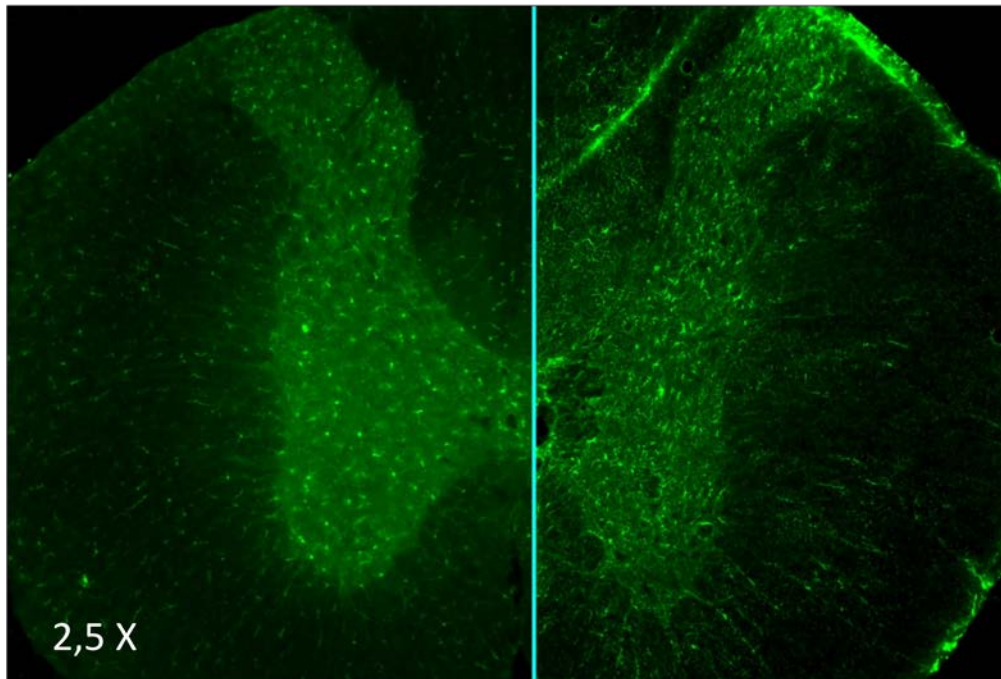
## **Microglia**

La valutazione di questo tipo cellulare è stata effettuata utilizzando un anticorpo diretto contro Iba-1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1), una proteina di 17-kDa legante il calcio, specificamente espressa dai macrofagi e dalla microglia, che viene upregolata proprio durante i processi che conducono all'attivazione di tali cellule [Boivin et al., 2007].

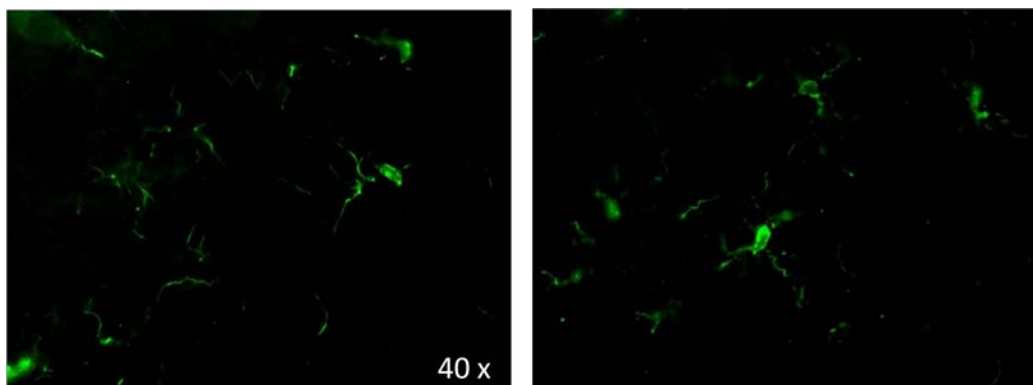
L'attivazione microgliale è stata misurata in termini di aumento di intensità della reazione e di area midollare coinvolta. La Figura 52 mostra contemporaneamente i due antimeri di una sezione di midollo spinale effettuata a livello lombare. A sinistra è mostrato il midollo di animali di controllo, a destra quello di ratti trattati con oxaliplatino. Nel midollo dei ratti trattati con soluzione salina la densità microgliale appare uniformemente distribuita in tutta la sostanza grigia del midollo spinale, mentre l'immunoreattività del midollo proveniente da ratti trattati con oxaliplatino dimostra un aumento significativo nei livelli di espressione di Iba-1 principalmente a livello della testa del corno posteriore e, in particolare nelle lamine I-III che ospitano il secondo neurone del percorso della sensibilità dolorosa; al contrario lamine più profonde non sembrano essere coinvolte in tali meccanismi.

Per quanto riguarda la morfologia delle cellule, la Figura 53, ad ingrandimento 40X, mostra cellule con scarsi prolungamenti e di breve lunghezza che depongono a favore di uno stato inattivo; le dimensioni del corpo cellulare, piuttosto grandi e di tipo sferoidale lasciano tuttavia pensare a una morfologia di tipo macrofagico, indice di una attività pregressa.

## MIDOLLO SPINALE



**Figura 52** – Midollo spinale, microglia. La porzione lombare del midollo spinale è stata tagliata al criostato in sezioni di 20  $\mu\text{m}$ . La marcatura specifica è stata ottenuta utilizzando un anticorpo diretto contro l'antigene Iba1 alla concentrazione di 1:500 con il quale le sezioni sono state incubate per una notte; ha fatto seguito l'incubazione con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse.



SALINA

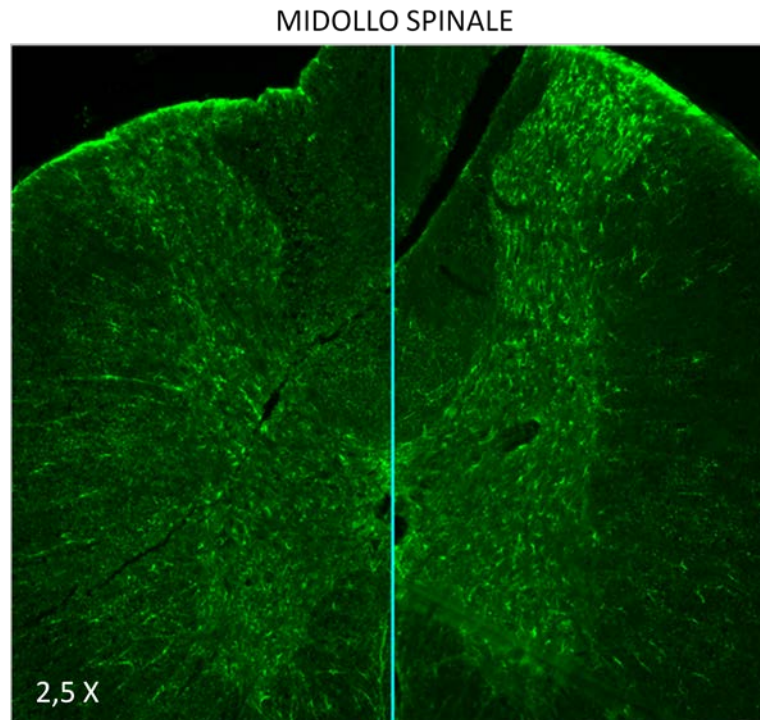
OXALIPLATINO

**Figura 53** – Midollo spinale, microglia. La figura rappresenta gli ingrandimenti 40X effettuati sugli stessi campioni della Fig. 52. L'ingrandimento consente di evidenziare la morfologia cellulare dalla quale si evidenziano cellule con corpo piuttosto voluminoso e di forma globosa con scarsi e corti prolungamenti.

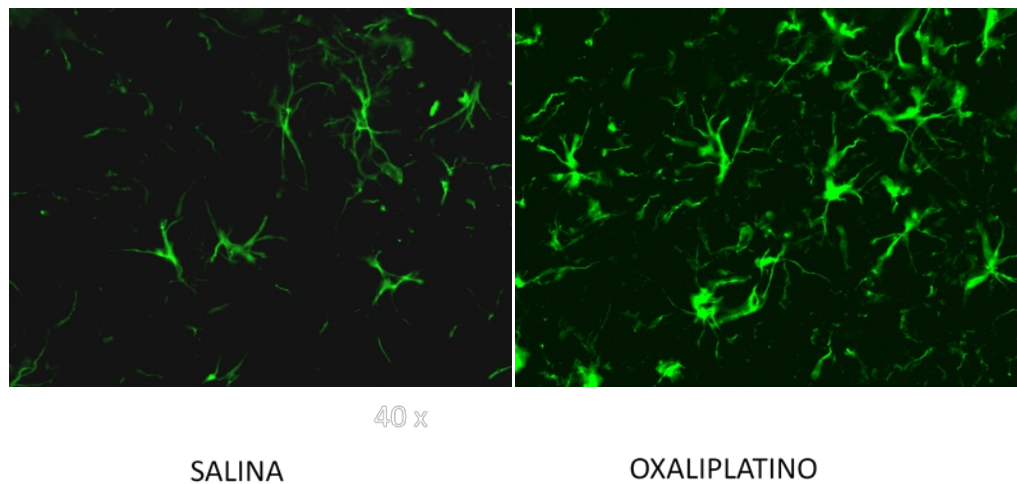
## **Astrociti**

L'attivazione astrocitaria è stata valutata in termini di aumento di intensità e di area occupata dalla GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), una proteina appartenente ai filamenti intermedi che nel sistema nervoso centrale viene espressa sia dagli astrociti che dalle cellule ependimali. Sebbene venga ampiamente utilizzata per l'identificazioni di tali tipi cellulari, la sua funzione precisa è a tutt'oggi sconosciuta, anche se appare coinvolta nel mantenimento della forma della cellula. L'aumento dei livelli di espressione di questa proteina si realizza conseguentemente a vari meccanismi ma generalmente si parla di attivazione astrocitaria [Watkins et al., 2007]. La Figura 54, mostrante in contemporanea i due antimeri di una sezione di midollo spinale ricavata a livello dei mielomeri lombari, dimostra come dopo 21 giorni di trattamento con oxaliplatino l'immunoreattività della GFAP è aumentata in maniera significativa rispetto ai controlli. Come nel caso della microglia, anche per gli astrociti tale aumento interessa prevalentemente la testa del corno posteriore e, in particolare, le lamine I-III. Inoltre la Figura 55 illustra un ingrandimento 40X che, nei midolli dei ratti trattati con oxaliplatino rispetto a quella di astrociti di controllo, ci consente di mettere in evidenza una morfologia cellulare ipertrofica che interessa sia il corpo cellulare sia i prolungamenti e che è un chiaro indice di attivazione.





**Figura 54 – Midollo spinale, astrociti.** La porzione lombare del midollo spinale è stata tagliata al criostato in sezioni di 20  $\mu\text{m}$ . La marcatura specifica è stata ottenuta utilizzando un anticorpo diretto contro l'antigene GFAP alla concentrazione di 1:500 con il quale le sezioni sono state incubate per una notte; ha fatto seguito l'incubazione con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali, considerando 5 sezioni diverse.



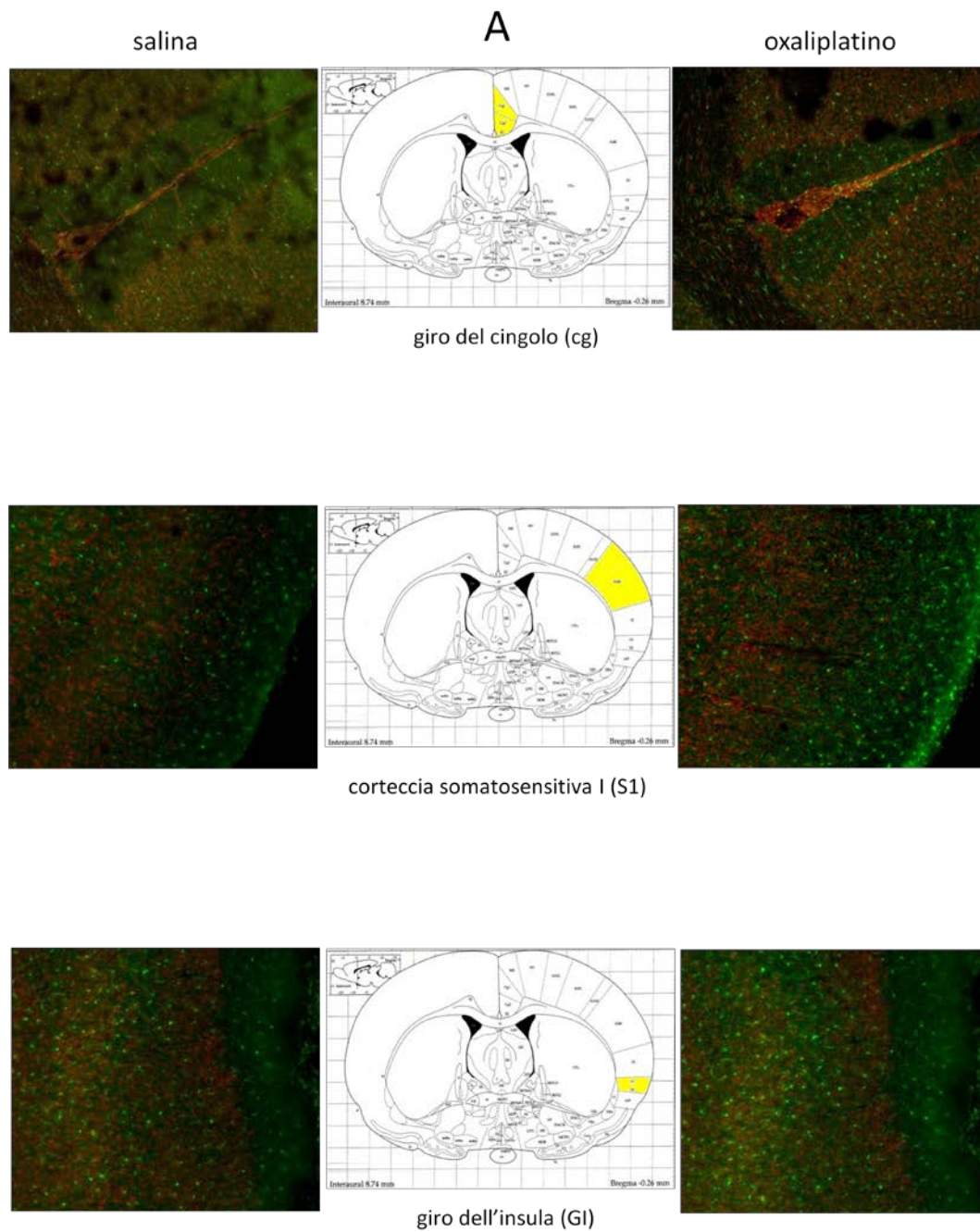
**Figura 55 – Midollo spinale, astrociti.** La figura rappresenta gli ingrandimenti 40X effettuati sugli stessi campioni della Fig. 54. L'ingrandimento consente di evidenziare la morfologia cellulare dalla quale nelle sezioni effettuate sui midolli trattati con oxaliplatino si evidenziano cellule con un corpo più voluminoso dal quale si dipartono numerosi prolungamenti che appaiono generalmente più corti rispetto alle sezioni provenienti dai ratti controllo.



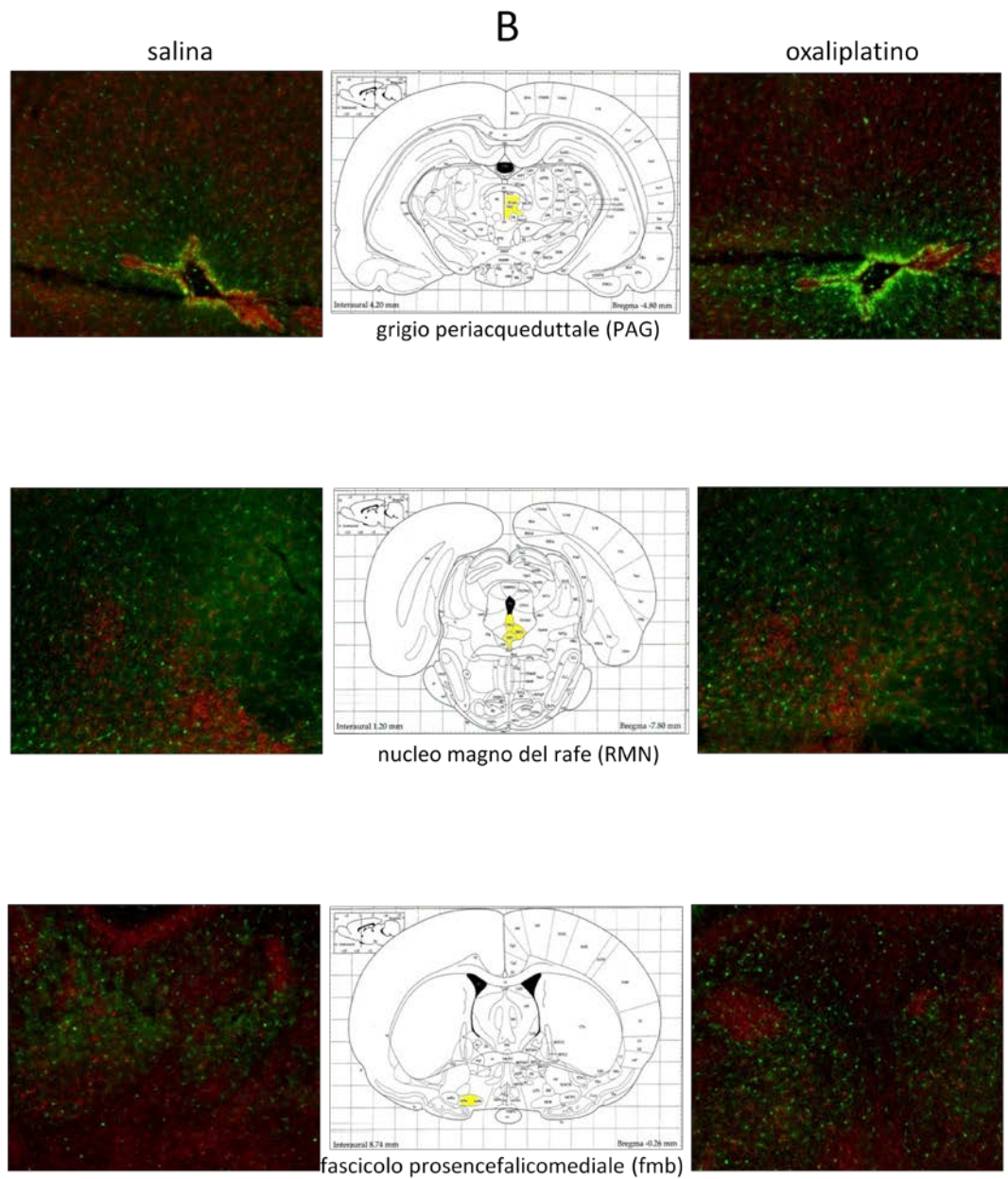
## Encefalo

Dal momento che i risultati sul midollo spinale indicavano abbastanza chiaramente un chiaro coinvolgimento della glia nell'innescamento e/o nel mantenimento di questi meccanismi di dolore, abbiamo voluto valutare lo stato di attivazione di queste cellule in varie aree dell'encefalo già note per essere coinvolte nel processamento degli stimoli dolorosi. Allo scopo abbiamo effettuato degli esperimenti di immunohistochimica su fette di encefalo ricavate da ratti di controllo e dopo 7, 14 e 21 giorni di trattamento con il chemioterapico. Le Figure 56 e 57 illustrano i risultati: in generale, nei ratti trattati, è possibile evidenziare un aumento della reattività sia microgliale che astrocitaria in tutte le zone corticali prese in considerazione: corteccia del cingolo (CG), aree somatosensitive primaria (S1) e secondaria (S2), e lobo dell'insula (GI); per quanto riguarda i nuclei di sostanza grigia, hanno mostrato un forte aumento nei livelli di espressione il talamo, il grigio periacqueduttale (PAG) e il nucleo magno del rafe (NMR).

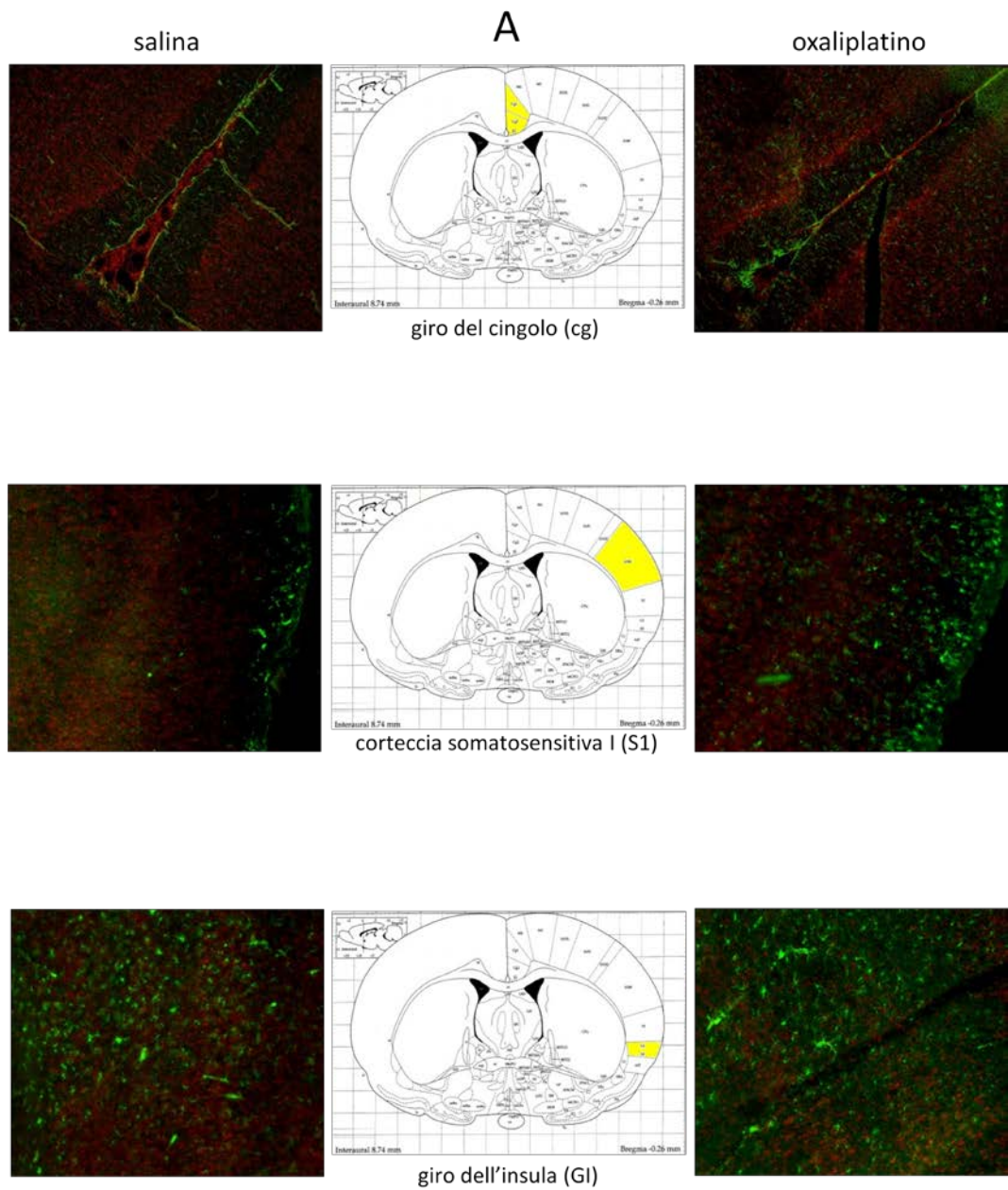
Nel presente lavoro è mostrato come al 21 giorno di trattamento, quando la sintomatologia dolorosa è pienamente manifesta, vi sia un significativo aumento numerico sia della microglia che degli astrociti nel sistema nervoso centrale. Nelle varie aree cerebrali, analogamente a quanto riscontrato nel midollo spinale, la valutazione della morfologia cellulare permette di osservare il loro stato di attivazione: la microglia presenta un aspetto macrofagico, mentre gli astrociti appaiono in uno stato di piena attivazione. Quindi, l'aumento numerico da un lato e la morfologia cellulare dall'altro, lasciano pensare che entrambi i tipi cellulari siano coinvolti in questi meccanismi anche se con tempi diversi. D'altra parte è noto come l'attivazione microgliale sia stata associata agli stadi precoci del fenomeno neuropatico evidenziando la sua responsabilità nelle fasi di innescamento e come invece gli astrociti siano responsabili della cronicizzazione dello stato doloroso [Marchand et al., 2005; Scholz e Woolf, 2007].



**Figura 56 A** – Encefalo, microglia. Sezioni criostatate di encefalo (20  $\mu$ m) sono state marcate con un anticorpo specifico per l'antigene Iba1 alla concentrazione di 1:500 e rivelate con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali. Sono mostrate le seguenti aree: giro del cingolo (cg), corteccia somatosensitiva primaria (S1) e giro dell'insula (GI). Ingrandimento 20X.

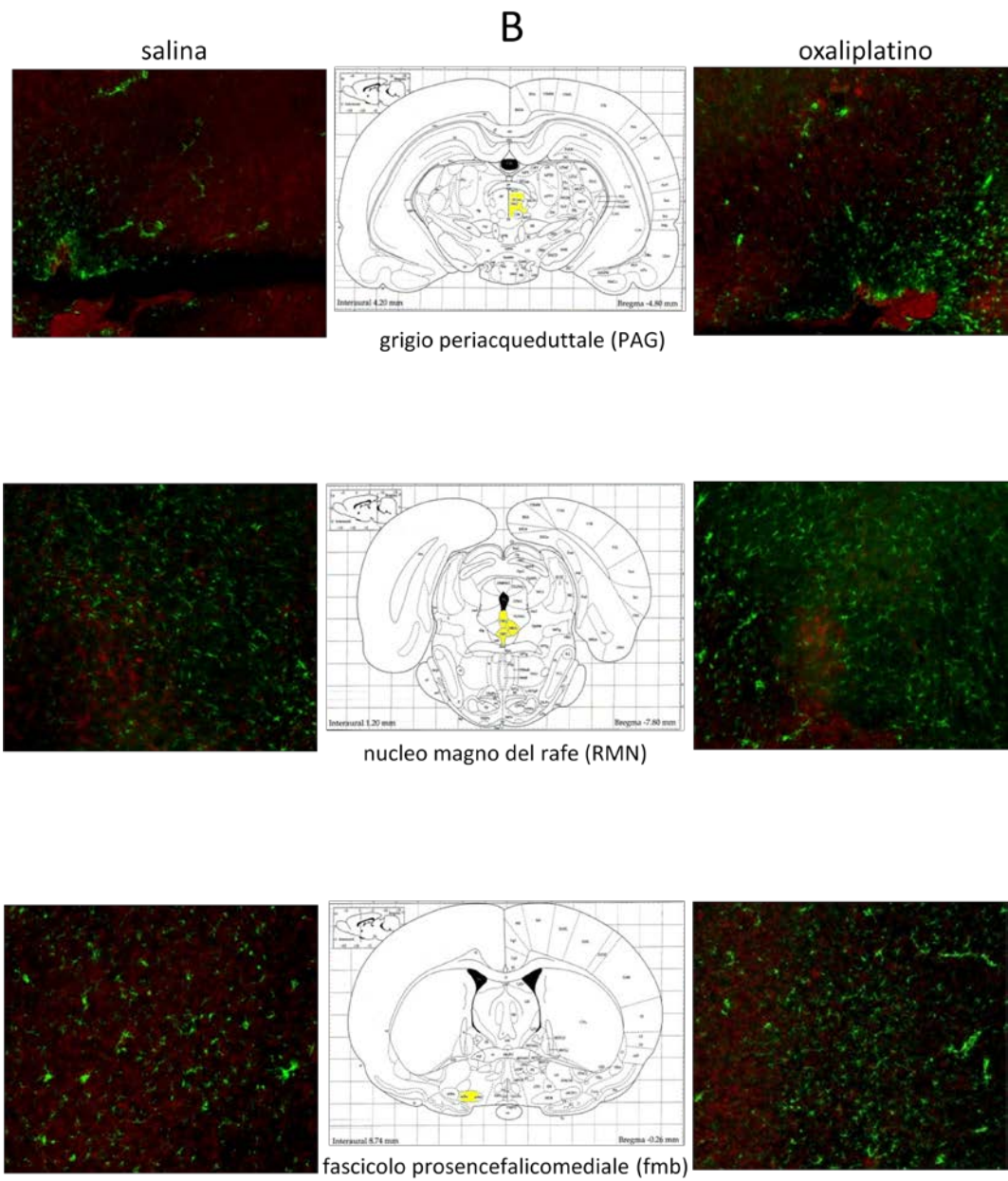


**Figura 56 B** – Encefalo, microglia. Sono mostrate le seguenti aree: grigio periacqueduttale (PAG), nucleo magno del rafe (RMN) e fascicolo prosencefalico mediale (fmb). Ingrandimento 20X.



**Figura 57 A – Encefalo astrociti.** Sezioni criostatate di encefalo (20  $\mu\text{m}$ ) sono state marcate con un anticorpo specifico per l'antigene GFAP alla concentrazione di 1:500 e rivelate con un anticorpo secondario Alexafluor 488 (1:200). Per ciascun trattamento l'esame è stato condotto su 5 animali. Sono mostrate le seguenti aree: giro del cingolo (cg), corteccia somatosensitiva primaria (S1) e giro dell'insula (GI). Ingrandimento 20X.





**Figura 57 B** - Encefalo, astrociti. Sono mostrate le seguenti aree: grigio periacqueduttale (PAG), nucleo magno del rafe (RMN) e fascicolo prosencefalico mediale (fmb). Ingrandimento 20X.

## Capitolo 10

### Discussione

Il presente lavoro sperimentale ha permesso di descrivere le caratteristiche comportamentali e le alterazioni morfologiche in modelli capaci di indurre dolore neuropatico nel ratto. La legatura lassa del nervo sciatico è capace di indurre una forma di neuropatia periferica ben caratterizzata dal punto di vista morfologico. La degenerazione del nervo è evidenziata dalla scarsa compattezza del tessuto, dalla presenza di edema e infiltrato leucocitario. Un segno caratteristico della degenerazione walleriana è la presenza di ovoidi. Dopo 15 giorni dalla legatura, nel citoplasma della cellula di Schwann si osserva la distruzione estensiva della mielina che assume la forma di grandi ovoidi mentre i detriti mielinici sono asportati da macrofagi provenienti dai vasi sanguigni.

Nell'iperalgia indotta da chemioterapico (oxaliplatino), la sintomatologia neuropatica è evidente a 21 giorni nella sua componente dolorosa e nella perdita della coordinazione motoria. Il tessuto nervoso è scervo da segni eclatanti di infiammazione, evidenza che caratterizza questo modello. Segni della neurotossicità del chemioterapico sono altresì rilevabili a livello morfologico nei gangli spinali, mentre alterazioni molecolari sono state qui dimostrate anche nel nervo e nel sistema nervoso centrale. La compromissione delle cellule gliali, satelliti, microgliali e astrocitarie, dà ragione dell'importanza di questi tipi cellulari nella neuropatia. A 21 giorni è pienamente manifesto l'aumento numerico sia della microglia che degli astrociti nel sistema nervoso centrale. Nelle varie aree cerebrali, analogamente a quanto riscontrato nel midollo spinale, la valutazione della morfologia cellulare permette di osservare il loro stato di attivazione: la microglia presenta un aspetto inattivo anche se la morfologia macrofagica depone a favore di una sua attivazione pregressa, mentre gli astrociti appaiono in uno stato di piena attivazione. Tuttavia

l'aumento numerico lascia pensare che entrambi i tipi cellulari siano coinvolti in questi meccanismi anche se con tempi diversi. D'altra parte è noto come l'attivazione microgliale sia stata associata agli stadi precoci del fenomeno neuropatico evidenziando la sua responsabilità nelle fasi di innesco e come invece gli astrociti siano responsabili della cronicizzazione dello stato doloroso [Marchand et al., 2005; Scholz e Woolf, 2007].

L'evidenza che dopo 21 giorni di trattamento, in corrispondenza della presenza di dolore, vi sia una particolare attivazione astrocitaria, sovrastante quella microgliale, indica negli astrociti una determinante componente della meccanica neuropatica.

Negli ultimi anni sono stati compiuti molti sforzi volti alla delucidazione del processamento centrale del dolore. Quest'ultimo è una sensazione molto complessa che ha un'importanza fondamentale nel mantenimento dell'integrità corporea e nella sopravvivenza degli individui; si tratta di un fenomeno multidimensionale in quanto caratterizzato da svariati aspetti che interessano la sfera discriminativa, quella affettiva e quella vegetativa [Treede et al., 1999]. Mediante alcune tecniche di "imaging" funzionale è stato possibile evidenziare alcune delle aree che sembrano coinvolte in queste meccanismi e che costituiscono la cosiddetta neuromatrice del dolore, ovvero le aree nocicettive primarie di elaborazione di tale sensazione [Melzack, 1999]. Svariate evidenze suggeriscono che tali aree, analizzate nel presente studio, siano implicate nel processamento di aspetti diversi della sensazione dolorosa [Coghill et al., 1999; Rainville et al., 1997; Hofbauer et al., 2001].

Il fatto che le aree cerebrali maggiormente implicate nella sensibilità algica mostrino un'elevata attivazione gliale sottolinea l'importanza di questo fenomeno nel dolore neuropatico: tale evidenza accomuna le neuropatie indipendentemente dalla loro eziopatogenesi. La gliosi è infatti riscontrabile sia in modelli di dolore indotto da trauma, caratterizzati da un'importante componente infiammatoria [Scholtz et al., 2007; Pacini et al., 2010], che, come dimostrato dai presenti dati, in modelli indotti da chemioterapico dove non è rilevabile nessun segno infiammatorio o di evidente alterazione morfologica. Il

dolore non è semplicemente il prodotto dell'attività delle fibre afferenti nocicettive, ma viene anche regolato dall'attività di altre fibre afferenti mieliniche che non sono direttamente implicate nella trasmissione delle informazioni nocicettive. L'ipotesi che il dolore dipenda dal rapporto fra l'attività delle fibre afferenti nocicettive e non nocicettive prende il nome di teoria del controllo a cancello. In base a tale teoria le afferenze non nocicettive "chiudono" il cancello attraverso il quale avviene la ritrasmissione centrale delle informazioni relative agli stimoli dolorifici, mentre le afferenze nocicettive lo "aprono". In condizioni di stress o di adattamento a condizioni ambientali estreme, le normali reazioni al dolore, quali i riflessi di retrazione, le reazioni di fuga, l'immobilità e altre forme del comportamento di difesa, possono essere svantaggiose e possono essere soppresse per favorire forme di comportamento più vantaggiose.

La conoscenza delle possibili aree encefaliche coinvolte nel dolore fornisce la base anatomico-fisiologica per studiare nuovi trattamenti per alleviare la sensazione dolorosa. L'approfondimento dello studio dell'attivazione gliale sia in un sistema integrato come quello offerto dall'animale, sia in coltura potrebbe offrire importanti informazioni riguardo la fisiopatologia del dolore. In ultimo, uno studio dei segnali scambiati tra neuroni e glia favorirebbe l'individuazione di nuovi bersagli farmacologici la cui modulazione potrebbe consentire il controllo del dolore tramite il ripristino delle funzionalità tissutale.



## Bibliografia

Abdin M.J., Morioka M., Morita K., Kitayama T., Kitayama S., Nakashima T., Dohi T. Analgesic nicotine action on tibial nerve transection (TNT)-induced mechanical allodynia through enhancement of the glycinergic inhibitory system in spinal cord. *Life Science* 2006.

Albe-Fessard D., Berkley K.J, Kruger L., Ralston H.J, Willis W.D. Diencephalic mechanisms of pain sensation. *Brain* 1985; **356**: 217-96.

Akopian A.N., Silviotti L., Wood J.N. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 1996; **379**: 257-62.

Ali Z., Ringkamp M., Hartke T.V., Chien H.F., Flavahan N.A., Campbell J.N., Meyer R.A. Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in the monkey. *J Neurophysiol* 1999; **81**: 455-466.

Allen B.J., Li J., Menning P.M., Rogers S.D., Ghilardi J., Mantyh P.W., Simone D.A. Primary afferent fibers that contribute to increase SP receptor internalization in the spinal cord after injury. *J Neurophysiol* 1999; **81**: 1379-1390.

Apkarian A.V., Bushnell M.C., Treede R.D., Zubieta J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur.J.Pain* 2005; **9**:463-84.

Amaya F., Decosterd I., Samad T.A., Plumpton C., Tate S., Mannion R.J., Costigan M., Woolf C.J. *Mol Cell Neurosci* 2000; **15**: 331-342.

Amir R., Devor M. Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 2000; **95**: 189-95.

Amir R., Devor M. Chemically mediated cross-excitation in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci* 1996; **16**: 4733-4741.

Anand P., Terenghi G., Birch R., Wellmer A., Cedarbaum J.M., Lindsay R.M., Williams-Chestnut R.E., Sinicropi D.V. Endogenous NGF and CNTF levels in human peripheral nerve injury. *Neuroreport*. 1997; **8**: 1935–1938.

Apkarian A.V., Shi T. Squirrel monkey lateral thalamus. I. Somatic nociceptive neurons and their relation to spino-thalamic terminals. *J Neurosci* 1994; **14**: 6779-6795.

Arner S., Lindblom U., Meyerson B.A., Molander C. Prolonged relieve of neuralgia after regional anesthetic blocks. A call for further experimental and systematic clinical studies. *Pain* 1990; **43**: 287-297.

Au E., Louprinzi C.L., Dhodiapkar M., Nelson T., Novotny P., Hammack J., O'Fallon J. Regular use of a verbal pain scale improves the understanding of oncology in patient pain intensity. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 2751-2755.

Azkue J.J., Liu X.G., Zimmermann M., Sandkühler J. Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain* 2003; **106**: 373-379.

Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 1994; **25**: 1386-1403.

Bardoni R., Magherini P.C., MacDermott A.B. NMDA EPSCs at glutamatergic synapses in the spinal cord dorsal horn of the postnatal rat. *J Neurosci* 1998; **18**: 6558-6567.

Baron R., BaronY., Disbrow E., Roberts T.P. Brain processing of capsaicin-induced secondary hyperalgesia: a functional MRI study. *Neurology* 1999; **53**: 548-557.

Basbaum A.I. Distinct neurochemical features of acute and persistent pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7739-7743.

Bennett G., al Rashed S., Hoult J. R., Brain S. D. Nerve growth factor induced hyperalgesia in the rat hind paw is dependent on circulating neutrophils. *Pain* 1998; **77**: 315– 322.

Bennett G. J., Xie Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorder of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; **33**: 87-107.

Bian F., Li Z., Offord J., Davis M.D., McCormick J., Taylor C.P, Walzer L.C. Calcium channel alpha2-delta type 1 is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res* 2006; **1075**: 68-80.

Bitner R.S., Nikkek A.L., Curzon P., Arneric S.P., Bannon A.W., decker M.W. Role of the nucleus raphe magnus in the antinociception produced by ABT-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. *J Neurosci* 1998; **18**: 5426-5432.

Black J.A., Cummins T.R., Plumpton C., Chen Y.H., Hormuzdiar W., Clare J.J., Waxman S.G. Upregulation of a silente sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* 1999; **82**: 2776-2785.

Bliss T.V., Collindridge G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; **361**: 31-39.

Boehm J., Kang M.G., Johnson R.C., Esteban J., Huganir R.L., Malinow R. Synaptic Incorporation of AMPA Receptors during LTP Is Controlled by a PKC Phosphorylation Site on GluR1. *Neuron*. 2006; **51**: 213–225.

Bonica J.J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In Bonica J.J. et al. (Eds). *“The management of pain”*. Lea & Febiger, Philadelphia, London 1990g, pp.**28-94**.

Boucher T.J., Okuse K., Bennett D.L., Munson J.B., Wood J.N., McMahon S.B. Potent analgesic effect of GDNF in neuropathic pain states. *Science* 2000; **290**: 124-127.

Bradbury E.J., Burnstock G., McMahon S.B. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosc* 1998;**12**; 256–268.

Brooks J., Tracey I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J Anat* 2005; **207**: 19-33.

Burchiel K.J., Johans T.J., Ochoa J. The surgical treatment of painful traumatic neuromas. *J Neurosurg* 1993; **78**: 714-719.

Burgess S.E., Gardell L.R., Ossipov M.H. et al. Time descending facilitation from the rostral ventromedial medulla, mantains but not initiate, neuropathic pain. *J Neurosci* 2002; **22**: 5129-5136.

Bushnell M., Duncan G., Hofbauer R., Ha B., Chen J., Carrier B. Pain perception: is there a role for primary somato-sensory cortex? *Proc Natl Acad Sci USA*1999; **96**: 7705-7709.

Calejasan A.A., Chang M.H., Zhuo M. Spinal serotonergic receptors mediate facilitation of a nociceptive reflex by subcutaneous formalin injection into the hindpaw in rats. *Brain Res* 1998; **798**(1-2): 46-54.

Campbell J.N., Meyer R.A. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006; **52**: 77-92.

Campbell J.N., Raja S.N., Meyer R.A., Mackinnon S.E. Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. *Pain* 1988; **32**: 89-94.

Campero M., Serra J., Ochoa J.L. C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J of Physiology* 1996; **497**: 565-572.

Casey K.L., Svensson P., Morrow T.J., Raz J., Jone C., Minoshima S. Selective opiate modulation of nociceptive processing in the human brain. *J Neurophysiol* 2000; **84**: 525-533.

Cavaletti G., Tredici G., Petruccioli M.G., Dondè E., Tedici P., Minoia C., Ronchi A., Bayssas M., Etienne G.G. Effects of different Schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur J Cancer* 2001; **37**: 2457-2463.

Chao M.V., Bothwell M.A., Ross A.H., Koprowski H., Lanahan A.A., Buck C.R., Sehgal A. Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 1986; **232**: 518–521.

Chao M.V., Hempstead B.L. p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci* 199; **18**: 321–326.

Cho H.J., Kim S.Y., Park M.J., Kim D.S., Kim J.K., Chu M.Y. Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res.* 1997; **749**: 358–362.

Corradetti R., Lo Conte G., Moroni F., Passani M.B., Pepeu G. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1984; **104**: 19-26.

Cortright D.N., Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update *Eur J Biochem* 2004; **271**: 1814-1819.

Coward K., Jowett A., Plumpton C., Powell A., Birch R., Tate S., Bountra C., Anand P. *Neuro Report* 2001; **12**: 483-488.

Craig A.D. An ascending general homeostatic afferent pathway originating in lamina I. *Prog Brain Res* 1996; **107**: 225-242.

Cucchiario G., Chaijale N., Commons K.G. The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioural effects of the  $\alpha 4$  nicotinic receptor agonist epibatidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; **313**: 389-394.

Cui J.G., Holmin S., Mathiesen T., Meyerson B.A., Linderoth B. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of neuropathy. *Pain* 2000; **88**: 239-248.

Curzon P., Nikkel A.L., Bannon A.W., Arneric S.P., Decker M.W. Differences between the antinociceptive effects of the cholinergic channel activators A-85380 and (+/-)-epibatidine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **287**: 847-853.

Dajas-Bailador F.A., Lima P.A., Wonnacott S. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca<sup>2+</sup> dependent mechanism. *Neuropharmacology* 2000; **39**: 2799-2807.

Damaj M.I., Glassco W., Aceto M.D., Martin B.R. Antinociceptive and pharmacological effects of metanicotine, a selective nicotinic agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **291**: 390-398.

Dani J.A. Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 2001; **49**: 166-174.

Davar G., Hama A., Deykin A., Vos B., Maciewicz R. MK-801 blocks the development of thermal hyperalgesia in a rat model of experimental painful neuropathy. *Brain Res* 1991; **553**: 327-30.

De Vries G.H. Schwann cell proliferation. In "*Peripheral neuropathy*", 3<sup>rd</sup> edn (ed. Dyck P.J., Thomas P.H., Griffin J.W., Low P.D., Poduslo J.) 1993 ; pp. **290-298**. Philadelphia: W. B. Saunders.

Devor M. Sodium channel and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 2006; **7**: S3-S12.

Di Stefano P.S., Friedman B., Radziejewski C., Alexander C., Boland P., Schick C.M., Lindsay R.M., Wiegand S.J. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 1992; **8**: 983-993.

Dib Hajj S.D., Fjell J., Cummins T.R. et al. Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 1999; **83**: 591-600.

Djoughri L., Koutsikou S., Fang X., McMullan S., Lawson S.N. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci* 2006; **26**: 1281-1292.

Djoughri L., Lawson S.N. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res Rev* 2004; **46**:131-145.

Dong W.K., Salonen L.D., Kawakami Y., Shiwaku T., Kaukoranta E.M., Martin R.F. Nociceptive responses of trigeminal neurons in SII-7b cortex of awake monkeys. *Brain Res* 1989; **484**: 314-324.

Dong W.K., Chudler E.H., Sugiyama K., Roberts V.J., Hayashi T. Somatosensory, multisensory, and task-related neurons in cortical area 7b (PF) of unanesthetized monkeys. *J Neurophysiol* 1994; **72**: 541-564.

Doubell T.P., Mannion R.J., Woolf C.J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Wall PD, Melzack R., eds. *Textbook of Pain*, 4<sup>th</sup> edn. London: Churchill Livingstone, 1999; pp. **165-82**.

Eschenfelder S., Habler H.J., Janing W. Dorsal root section elicit signs of neuropathic pain rather than reversing them in rats with L5 spinal nerve injury. *Pain* 2000; **87**: 213-219.

Fernihough J., Gentry C., Malcangio M., Fox A., Rediske J., Pellas T., Kidd B., Bevan S., Winter J. Pain related behaviour in two models of osteoarthritis in the rat knee. *Pain* 2004; **112**: 83-93.

Ferrell B.R., Jacox A., Miaskowski C., Paice J.A., Hester N.O. Cancer pain guidelines: now that we have them, what do we do? *Oncol Nurs Forum* 1994; **21**: 1229-1231.

Ferrington D.G., Sorkin L.S., Willis W.D. Responses of spinothalamic tract cells in the superficial dorsal horn of the primate lumbar spinal cord. *Physiol.* 1987; **388**: 681-703.

Fields H.L. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci* 2004; **5**: 565-575.

Fields H.L., Bausbaum et al. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R.(Eds). *Textbook of pain* 1999. Edinburgh: Churchill, Livingstone, pp. **309-329**.

Fields H.L., Heinricher M.M., Mason P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1991; **14**: 219-45.

Fields H.L., Malick A., Burstein R. Dorsal horn projection targets of On and Off cell in the rostral ventromedial medulla. *J. Neurophysiol* 1995; **74**: 1742-1759.

Freyhagen R., Strojek K., Griesing T., Whalen E., Balkenohl M. Efficacy of pregabalin in neuropathic pain evaluated in a 12-week, randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled trial of flexible- and fixed-dose regimens. *Pain* 2005; **115**: 254-263.

Fujii S., Sumikawa K. Acute and chronic nicotine exposure reverse age-related declines in the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Brain Res.* 2001; **894**: 347-353.

Fukuoka T., Kondo E., Dai Y., Hashimoto N., Noguchi K. Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci* 2001; **21**: 4891-4900.

Fukuoka T., Tokunaga A., Kondo E., Miki K., Tachinaba T., Noguchi K. Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA (a) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain* 1998; **78**: 13-26.

Funakoshi H., Frisén J., Barbany G., Timmusk T., Zachrisson O., Verge V.M., Persson H. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 1993; **123**: 455–465.

Gardell L.R., Ibrahim M., Wang R. et al. Mouse strain that lack spinal dynorphine upregulation after peripheral nerve injury do not develop neuropathic pain. *Neuroscience* 2004; **123**: 43-52.

Gargano N., Levi A., Alema S. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and TrkA receptors. *J Neurosci Res.* 1997; **50**: 1–12.

Geha P.Y., Baliki M.N., Chialvo D.R., Harden R.N., Paice J.A., Apkarian A.V. Brain activity for spontaneous pain of postherpetic neuralgia and its modulation by lidocaine patch therapy. *Pain* 2007; **128**: 88-100.

Gilbert S.D., Clark T.M., Flores C.M. Antihyperalgesic activity of epibatidine in the formalin model of facial pain. *Pain* 2001; **89**: 159-165.

Gilroni., Coderre T.J. Emerging drugs in neuropathic pain. *Expert Opin. Emerg Drug* 2007; **12**: 113-126.

Glass D.J., Yancopoulos G.D. The neurotrophins and their receptors. *Trends Cell Biol.* 1993; **3**: 262–268.

Gold M.S. Spinal nerve ligation: What to blame for the pain and Why. *Pain* 2000; **84**: 117-20.

Gracely R.H., Lynch S.A., Bennett G.J. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain* 1992; **51**: 175-194.

Griffin J.W. The roles of growth factor in painful length-dependent axonal neuropathies. In *Emerging Strategies for the Treatment of Neuropathic Pain*. In: Campbell J.N., Basbaum A.I., Dray A., Dubner R., Dworkin R.H., Sang C.N., editors. *Pain*. Seattle, WA: IASP Press; 2006. pp. **271-290**.

Gu J.G., Albuquerque C., Lee C.J., MacDermott A.B. Synaptic strengthening through activation of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors. *Nature* 1996; **381**: 793-796.

Guingamp C., Gegout-Pottie P., Philippe L., Terlain B., Netter P., Gillet P. Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis : a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Reum* 1997; **40**: 1670-1679.

Hanani M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain* 2010; **64**: 304-327.

Harris J.A., Corsi M., Quartaroli M., Arban R., Bentivoglio M. Upregulation of spinal glutamate receptors in chronic pain. *Neuroscience* 1996; **74**: 7-12.

Heumann R., Korsching S., Bandtlow C., Thoenen H. Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol.* 1987; **104**: 1623–1631.

Heumann R., Lindholm D., Bandtlow C., Meyer M., Radeke M.J., Misko T.P., Shooter E., Thoenen H. Differential regulation of mRNA encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: Role of macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 8735-8739.

Horigome K., Pryor J.C., Bullock E.D., Johnson E.M. Jr. Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J Biol Chem* 1993; **268**: 14881-14887.

Hosobushi Y., Adams J.E., Linchitz R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science* 1977; **197**: 183-186.

Hunt S.P. and Mantyh P. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev* 2001; **2**: 83-91.

Hwang J.H., Yaksh T.L. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 1997; **70**: 281-90.

Ibrahim M.M., Deng H., Zvonok A., Cockayne D.A., Kwan J., Mata H.P., Vanderah T.W., Lai J., Porreca F., Makriyannis A., Malan T.P. Jr. Activation of CB2 cannabinoid receptors by Am1241 inhibits experimental neuropathic pain : pain inhibition by receptors not present in the CNS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 10529-10533.

Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jäger T, et al. Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science* 2006; **312**: 1659–1662.



Ikeda H., Heinke B., Ruscheweyh R., Sandkühler J. Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science* 2003; **299**: 1237–1240.

James R., Tonra J.R., Curtis R., Wong V., Cliffer K.D., Park J.S. et al. Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain derived neurotrophic factor in sensory neurons. *Journal of Neuroscience* 1998; **18**: 4371–4383.

Jarvis M.F., Honore P., Shieh C-C., et al. A-803467, a potent and selective Na<sub>v</sub> 1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**: 8520-8525.

Ji R.R., Kohno T., Moore K.A., Woolf C.J. Central sensitization and LTP: Do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 2003; **26**: 696-705.

Ji R.R., Woolf C.J. Neuronal plasticity and signal trasduction in nociceptive neurons: implication for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 2001; **8**: 1-10.

Joseph E.K., Chen X., Khasar S.G., Levine J.D. Novel mechanism of enhanced nociception in a model of AIDS therapy-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Pain* 2004; **107**: 147-158.

Joshi S.K., Mikusa J.P., Hernandez G, et al. *Pain* 2006; **123**: 75-82.

Kanda M., Nagamine T., Ikeda A., et al. Primary somatosensory cortex is actively involved in pain processing in human. *Brain Res* 2000; **853**: 282-289.

Kaplan D.R., Hempstead B.L., Martin-Zanca D., Chao M.V., Parada L.F. The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 1991; **252**: 554–558.

Katsura H., Obata K., Mizushima T., Yamanaka H., Kobayashi K., Dai Y., Fukuoka T., Tokunaga A., Sakagami M., Noguchi K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol* 2006; **200**: 112-123.

Klein R., Lamballe F., Bryant S., Barbacid M. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. *Neuron*. 1992; **8**: 947–956.

Klein R., Parada L.F., Coulier F., Barbacid M. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J*. 1989; **8**: 3701–3709.

Kohno T., Ji R.R., Ito N., Allchorne A.J., Beford K., Karchewski L.A., Woolf C.J. Peripheral axonal injury results in reduced  $\mu$  opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 2005; **117**: 77-87.

Koltzemburg M., Handwerker H.O., Torebjork H.E. The ability of humans to localise noxious stimuli. *Neurosci Lett* 1993; **150**: 219-22.

Koltzemburg M., Torebjork H.E., Wahren L.K.. Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain* 1994; **117**: 579-591.

Kral M.G., Xiong Z., Study RE. Alteration of  $\text{Na}^+$  currents in dorsal root ganglion neurons from rats with painful neuropathy. *Pain* 1999; **81**: 15-24.

Krishnan A.V., Goldstein D., Friedlander M., Kiernan M.C. Oxaliplatin-induced neurotoxicity and the development of neuropathy. *Muscle Nerve* 2005; **32**: 51-60.

Krishnan A.V., Goldstein D., Friedlander M., Kiernan M.C. Oxaliplatin and axonal  $\text{Na}^+$  channel function in vivo. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 4481-4484.

Kuribara H., Higuchi Y., Tadokoro S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. *Jpn J Pharmacol* 1977; **27**: 117-126.

Lamballe F., Klein R., Barbacid M. trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 1991; **66**: 967-979.

Lamour Y., Willer J.C., Guilbaud G. Rat somatosensory (Sml) cortex: I. Characteristics of neuronal responses to noxious stimulation and comparison with responses to non-noxious stimulation. *Exp Brain Res*. 1983; **49**: 35-45.

Lawand N.B., Lu Y., Westlund K.N. Nicotinic cholinergic receptor: potential target for inflammatory pain relief. *Pain* 1999; **80**: 291-299.

Lee H.K., Takamiya K., Han J.S. et al. Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell* 2003; **112**: 631-643.

Leighton G., Rodriguez R., Hill R., Hughes J.  $\kappa$ -Opioid agonists produce antinociception after i.v. and i.c.v. but not intrathecal administration in the rat. *Br J Pharmacol* 1988; **93**: 553-560.

Leonard G.D., Wright M.A., Quinn M.G., Fioravanti S., Harold N., Schuler B., Thomas R.R., Grem J.L. Survey of oxaliplatin-associated neurotoxicity using an interview-based questionnaire in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2005; **5**: 116.

Lewin G.R., Barde Y.A. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci.* 1996; **19**: 289–317.

Li C.Y., Song Y. H., Higuera E.S., Luo S.D. Spinal dorsal horn calcium channel alpha-2-delta-1 subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 2004; **24**: 8494-8499.

Li P., Wilding T.J., Kim S.J., Calejesan A.A., Huettner J.E, Zhuo M. Kainate-receptor-mediated sensory synaptic transmission in mammalian spinal cord. *Nature* 1999; **397**: 161-164.

Li P., Zhuo M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. *Nature* 1998; **393**: 695-698.

Li P., Zhuo M. Substance P and neurokinin A mediate sensory synaptic transmission in young rat dorsal horn neurons. *Brain Res Bull* 2001; **55**: 521-531.

Li Y., Dorsi M.J., Meyer R.A., Belzberg A.J. Mechanical hyperalgesia after anL5 spinal nerve ligation in rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain* 2000; **85**: 493-502.

Lieberman D.N., Mody I. Substance P enhances NMDA channel function in hippocampal dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol.* 1998; **80**: 113–119.

Lin L.F., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S., Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; **260**: 1130–1132.

Liu C.N., Amir R., Devor M. Effect of age and nerve injury on cross-excitation among sensory neurons in rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 1999; **259**: 95-8.

Liu C.N., Wall P.D., Ben Dor E., Michaelis M., Amir R., Devor M. Tactile allodynia in the absence of C- fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 2000; **85**: 503-521.

Liu T., Van Rooijen N., Tracey D.J. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain* 2000; **86**: 25-32.

Liu X.G., Sandkühler J. Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. *J Neurophysiol* 1997; **78**: 1973–1982.

Liu X.G., Sandkühler J. Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. *Neurosci Lett* 1995; **191**: 43–46.

Lynch J.J., Wade C.L., Mikusa J.P., Decker M.W., Honore P. ABT-594 (a nicotinic acetylcholine agonist): anti-allodynia in a rat chemotherapy-induced pain. *Eur J Pharmacol* 2005; **509**: 43-48.

Maihofner C., Handwerker H.O., Bircklein F. Functional imaging of allodynia in complex regional pain syndrome. *Neurology* 2006; **66**: 711-717.

Maihofner C., Schmelz M., Forster C., Neundorfer B., Handwerker H.O. Neural activation during experimental allodynia: a functional magnetic resonance imaging study. *Eur J Neurosci* 2004; **19**: 3211-3218.

Malcangio M., Ramer M.S., Jones M.G., McMahon S.B. Abnormal substance P release from the spinal cord following injury to primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 2000; **12**: 397-399.

Malenka R.C., Bear M.F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004; **44**: 5-21.

Malenka R.C., Nicoll R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 1993; **16**: 521-527.

Malinow R. AMPA receptor trafficking and long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; **358**: 707-714.

Maness L.M., Kastin A.J., Weber J.T., Banks W.A., Beckman B.S., Zadina J.E. The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 1994; **18**: 143-159.

Mao J., Price D.D., Mayer D.J., Lu J., Hayes R.L. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviours in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res* 1992; **576**: 254-62.

Margaria E., Gollo E. AISD, Associazione Italiana per lo Studio del Dolore. XIII Congresso Nazionale Torino 2001. Springer-Editore, 2001.

Margel W., Wilk S.H., Treede R.D. Secondary hyperalgesia and perceptual wind-up following intradermal injection of capsaicin in human. *Pain* 1998; **74**: 257-268.

Marshall J. Sensory disturbances in cortical wounds with special reference to pain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1951; **14**: 187-204.

Mayer D.G., Liebkeskid J.C. Pain reduction by focal stimulation of the brain: anatomical and behavioral analysis. *Brain Res* 1974; **68**: 73-93.

McMahon S.B., Armanini M.P., Ling L.H., Phillips H.S. Expression and coexpression of Trk receptors in subpopulations of adult primary sensory

neurons projecting to identified peripheral targets. *Neuron*. 1994; **12**: 1161–1171.

Mellor J., Nicoll R.A., Schmitz D. Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic  $I_h$  channels. *Science* 2002; **295**: 143–147.

Merskey H., Bogduk N. Classification of Chronic Pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2<sup>nd</sup> edn. Seattle: *IASP Press* 1994.

Meyer M., Matsuoka I., Wetmore C., Olson L., Thoenen H. Enhanced synthesis of brain derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol*. 1992; **119**: 45–54.

Michael G.J., Averill S., Nitkunan A., Rattray M., Bennett D.L., Yan Q., Priestley J.V. Nerve growth factor treatment increases brain-derived neurotrophic factor selectively in TrkA-expressing dorsal root ganglion cells and in their central terminations within the spinal cord. *J Neurosci*. 1997; **17**: 8476–8490.

Moore K.A., Kohno T., Karchewski L.A., Scholz J., Baba H., Woolf C.J. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 2002; **22**: 6724-6731.

Mudo G., Belluardo N., Fuxe K. Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. *J. Neural Transm* 2007; **114**: 135-147.

Myers R.R., Heckman H.M., Rodriguez M. Reduced hyperalgesia in nerve injured WLD mice: Relationship to nerve fiber phagocytosis, axonal degeneration, and regeneration in normal mice. *Exp Neurol* **141**: 94-101.

Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002; **420**: 846-852.

Nicoll R.A. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003; **358**: 721–726.

Noguchi K., Dubner R., De Leon M., Senba E., Ruda M.A. Axotomy induces preprotachykinin gene expression in a sub-population of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci Res* 1994; **37**: 596-603.

Nordin M., Nystrom B., Wallin U., Hagbarth K.E. Ectopic sensory discharges and paresthesiae in patients with disorders of peripheral nerves, dorsal roots and dorsal column. *Pain* 1984; **20**: 231-45.

Obata K., Katsura H., Mizushima T., Yamanaka H., Kobayashi K., Dai Y., Fukuoka T., Tokunaga A., Tominaga M., Noguchi K. TPRA1 induced in sensory neurons

contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2393-2401.

Ossipov M.H., Sun H., Malan T.P. et al. Mediation of spinal nerve injury induced tactile allodynia by descending facilitatory pathways in the dorsal lateral funiculus in rats. *Neurosci Lett* 2000; **290**: 129-132.

Perkins N.M., Tracey D.J. Hyperalgesia due to nerve injury: Role of neutrophils. *Neuroscience* 2000; **101**: 745-757.

Pertens E., Urshel-Gysbers B.A., Holmes M. et al. Intraspinal and behavioural consequences of nerve growth factor-induced hyperalgesia compared in adult rat. *J Comp Neurol* 1999; **410**: 73-89.

Porreca F., Lai J., Bian D. et al. A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels. PN3/SNS and NaN/SNS2 in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7640-7644.

Porreca F., Ossipov M.H., Gebhart G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci* 2002; **25**: 319-325.

Price D.D., Bush F.M., Long S., Harkins S.W. A comparison of pain measurement characteristics of mechanical, visual analogue and simple numerical rating scales. *Pain* 1994; **56**: 217-226.

Proudfit H.K., Clark F.M. The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. *Prog Brain Res* 1991; **88**: 123-141.

Raja S.N., Meyer R.A., Ringkamp M., Campbell J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall PD, Melzack R., editors. *Textbook of Pain*. 4. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999. pp. 11–57.

Rainville P., Duncan G., Price D., Carrier B., Bushnell M. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science* 1997; **277**: 968-971.

Ramer M.S., Bisby M.A. Adrenergic innervation of rat sensory ganglia following proximal or distal painful sciatic neuropathy: distinct mechanisms revealed by anti-NGF treatment. *Eur J Neurosci* 1999; **11**: 837-846.

Ramer M.S., French G.D., Fahnstock M. et al. Strain difference in neuropathic pain behaviour in mice following chronic constriction injury: correlation with NGF production in injured nerve. *Soc Neurosci Abstr* 1995; **21**: 897.

Rashid M.H., Ueda H. Neuropathy-specific analgesic action of intrathecal nicotinic agonists and its spinal GABA-mediated mechanism. *Brain Res* 2002; **953**: 53-62.

Redex B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 1952; **96**: 414–495.

Ren K., Hilden J.L., Williams G.M., Ruda M.A. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain Sep* 1992; **50**: 331-440.

Renganathan M., Cummins T.R., Waxman S.G. Contribution of Na<sub>v</sub>1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol* 2001; **86**: 629-640.

Reynolds ML, Woolf CJ. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol* 1993; **3**: 683–689.

Ripamonti C., Zecca E., Brunelli C., Groff L., Boffi R., Caraceni A., Galeazzi G., Martini C., Panzeri C., Saita L., Viggiano V., De Conno F. Pain experienced by patients hospitalized at the National Cancer Institute of Milan : research project towards a pain-free hospital. *Tumori* 2000; **86**: 412-418.

Ro L.S., Chen S.T., Tang L.M. et al. Effect of NGF and anti-NGF on neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Pain* 1999; **79**: 265-274.

Robinson D.A., Calejesan A.A., Wei F., Gebhart G.F., Zhuo M. Endogenous facilitation: from molecular mechanisms to persistent pain. *Curr Neurovasc Res* 2004; **1**: 11-20.

Robinson D.A., Wei F., Wang G.D., Li P., Kim S.J., Vogt S.K., Muglia L.J., Zhuo M. Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice. *J Physiol* 2002; **540**: 593-606.

Rodríguez-Tébar A., Dechant G., Barde Y.A. Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor. *Neuron*. 1990; **4**: 487–492.

Rodríguez-Tébar A., Dechant G., Götz R., Barde Y.A. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J*. 1992; **11**: 917–922.

Rogers R., Wise R.G., Painter D.J., Longe S.E., Tracey I. An investigation to dissociate the analgesic and anesthetic properties of ketamine using functional magnetic resonance imaging. *Anesthesiology* 2004; **100**: 292-301.

Salter M.W. Signaling pathways in pain neuroplasticity in the spinal dorsal horn. In: Campbell J.N., Basbaum A.I., Dray A., Dubner R., Dworkin R.H., Sang C.N.,

editors. *Emerging Strategies for the Treatment of neuropathic Pain*. Seattle, WA: IASP Press 2006. pp. **193-209**.

Santicioli P., Del Bianco E., Tramontana M., Maggi C.A. Adenosine inhibits action potential-dependent release of calcitonin gene-related peptide and substance P-like immunoreactivities from primary afferents in rats spinal cord. *Neurosci Lett* 1992; **144**: 211-4.

Serlin R.C., Mendoza T.R., Nakamura Y., Edwards K.R., Cleland C.S. When is cancer pain mild, moderate or severe? Grading pain severity by its interference with function. *Pain* 1995; **61**: 277-284.

Schafers M., Geis C., Bors D., Yaksh T.L., Sommer C. Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve. *J Neurosci* 2002; **22**: 536-545.

Schafers M., Svensson C.I., Sommer C., Sorkin L.S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 Mapk in primary sensory neurons. *J Neurosci* 2003; **23**: 2517-2521.

Scholz J. and Woolf C.J. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002; **5**: 1062-1065.

Scholz J., Broom D.C., Youn D.H., Mills C.D., Kohno T., Suter M.R., Moore K.A., Decosterd I., Coggeshall R.E., Woolf C.J. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in the lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 2005; **25**: 7317-7323.

Schweinhart P., Glynn C., Brooks J., McQuay H., Jack T., Chessel I., Bountra C., Tracey I. An fMRI study of cerebral processing of brush-evoked allodynia in neuropathic pain patients. *Neuroimage* 2006; **32**: 256-265.

Sheth R.N., Dorsi M.J., Li Y., Murinson B.B., Belzberg A.J., Griffin J.W., Meyer R.A. Mechanical hyperalgesia after an L5 ventral rhizotomy or an L5 ganglionectomy in the rat. *Pain* 2002; **96**: 63-72.

Sherrington C. *The integrative Action of the Nervous System*. Oxford: Oxford University Press 1906.

Shytle R.D., Mori T., Townsend K., Vendrame M., Sun N., Zeng J., Ehrhart J., Silver A.A., Sanberg P.R., Tan J. Cholinergic modulation of microglial activation by  $\alpha 7$  nicotinic receptor. *J Neurochem* 2004; **89**: 337-343.

Silviotti L., Woolf C.J.. The contribution of GABA-a and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in spinal cord. *J Neurophysiol* 1994; **72**: 167-79.



Simone D.A., Kajander K.C. Responses of cutaneous A fiber nociceptors to noxious cold. *J Neurophysiol* 1997; **77**: 2049-2060.

Skaper S.D. Nerve growth factor; a neurokinin orchestrating neuroimmune-endocrine functions. *Mol Neurobiol* 2001; **24**: 183-199.

Schmidt R., Schmelz M., Weidner C., Handwerker H.O., Torebjork H.E. Innervation territories of mechano-insensitive C nociceptors in human skin. *J Neurophysiol* 2002; **88**: 1859-1866.

Snider W. D. e McMahon S.B. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 1998; **20**: 629– 632.

Sommer C., Shafers M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed Wallerian degeneration: Differential effect of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 1998; **784**: 154-162.

Stiller C.O., Cui J.G., O'Connor W.T., Brodin E., Meyerson B.A., Linderoth B. Release of gamma-aminobutyric acid in the dorsal horn and suppression of tactile allodynia by spinal cord stimulation in mononeuropathic rats. *Neurosurgery* 1996; **39**: 367-74.

Streppel M., Azzolin N., Dohm S. et al. Focal application of neutralizing antibodies to soluble neurotrophic factor reduces collateral axonal branching after peripheral nerve lesion. *Eur J Neurosci* 2002; **15**: 1327-1342.

Stucky C.L. e Lewin G.R. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J. Neurosci* 1999; **19**: 6497– 6505.

Sukhotinsky I., Ben Dor E., Raber P., Devor M. Key role of the dorsal root ganglion in neuropathic tactile hypersensitivity. *Eur J Pain* 2004; **8**: 135-143.

Suzuki R., Rahman W., Rygh L.J., Webber M., Hunt S.P., Dickenson A.H. Spinal-supraspinal serotonergic circuits regulating neuropathic pain and its treatment with gabapentin. *Pain* 2005; **117**: 292-303.

Takeda D., Nakatsuka T., Gu J.G., Yoshida M. The activation of nicotinic acetylcholine receptor enhances the inhibitory synaptic transmission in the deep dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. *Molecular Pain* 2007; **3**: 26.

Tam S.Y., Tsai M., Yamaguchi M. et al. Expression of functional TrKA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cell. *Blood* 1997; **90**: 1807-1820.

Tillman D. B. Heat response properties of unmyelinated nociceptors. *Doctoral dissertation*. JohnsHopkinsUniversity. Baltimore, 1992.

Torebjork H.E. e Hallin R.G. Identification of afferent C units in intact human skin nerves. *Brain Research* 1974; **67**: 387-403.

Torebjork H.E. e Hallin R... Skin receptors supplied by unmyelinated (C) fibers in man. In *Sensory Functions of the Skin in Primates with Special Reference to Man* 1976, ed. Zotterman Y.; pp. **475-485**. Pergamon Press, Oxford.

Torebjork E., LaMotte R.H., Robinson C.J. Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: simultaneous recording in humans of sensory judgments of pain and evoked responses in nociceptors with C-fibers. *J Neurophysiol* 1984; **51**: 325-339.

Treede R.D., Meyer R.A., Campbell J.N. Myelinated mechanically intensive afferents from monkey hairy skin: heat-responsive properties. *J Neurophysiol* 1998; **80**: 1082-1093.

Tracey I. Nociceptive processing in the human brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2005; **15**: 478-87.

Treede R.D., Kenshalo D., Gracely R., Jones A. The cortical representation of pain. *Pain* 1999; **79**: 105-111.

Tremont-Lukats I.W., Hutson P.R., Backonja M.M. A randomized, double-masked, placebo-controlled pilot trial of extended IV lidocaine infusion for relief of ongoing neuropathic pain. *Clin J Pain* 2006; **22**: 266-271.

Urban M.O., Gebhart G.F. Spinal contributions to hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7687-7692.

Van Hees J., Gybels J. C nociceptor activity in human nerveduring painful and non painful skin stimulation. *J Neurol, Neurosurg Psyc* 1981; **44**: 600-607.

Vaught J.L., Pelley K., Costa L.G., Setler P., Enna S.J. A comparison of the antinociceptive responses to the GABA-receptor agonists THIP and baclofen. *Neuropharmacology* 1985; **24**: 211-216.

Verge V.M., Merlio J.P., Grondin J., Ernfors P., Persson H., Riopelle R.J., Hökfelt T., Richardson P.M. Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *J Neurosci* 1992; **12**: 4011-4022.

Vincler M., Wittenauer S., Parker R., Ellison M., Olivera B.M., McIntosh J.M. Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 17880-17884.

Vogt B.A., Rosene D.L., Panda D.N. Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. *Science* 1979; **204**: 205-207.

Vogt B.A., Berger G.R., Derbyshire S.W. Structural and functional dichotomy in human midcingulate cortex. *Eur J Neurosci* 2003; **18**: 3134-3144.

Vulchanova L., Riedl M.S., Shuster S.J., Stone L.S., Hargreaves K.M., Buell G., Surprenant A., North R.A., Elde R. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur. J. Neurosci* 1998; **10**: 3470-3478.

Wagner K.J., Sprenger T., Kochs E.F., Tolle T.R., Valet M., Willoch F. Imaging human cerebral pain modulation by dose-dependent opioid analgesia: a positron emission tomography activation study using remifentanyl. *Anesthesiology* 2007; **106**: 548-556.

Wall P.D., Gutnick M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol* 1974; **43**: 580-593.

Waller A.V. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil Trans R Soc* 1850; **140**: 423-429.

Wang G.D., Zhuo M. Synergistic enhancement of glutamate-mediated responses by serotonin and forskolin in adult mouse spinal dorsal horn neurons. *J Neurophysiol* 2002; **87**: 732-739.

Wang Q.P., Nakai Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull* 1994; **34**: 575-585.

Wang Y., Su D.M., Wang R.H., Liu Y., Wang H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. *Neuroscience* 2005; **132**: 49-56.

Watkins L.R. and Maier S. Beyond neurons: evidence that immune and glia cells contribute to pathological pain state. *Physiol Rev* 2002; **82**: 981-1011.

Watkins L.R., Cobelli D.A., Faris P. et al. Opiate vs non-opiate footshock-induced analgesia (FSIA) : the body region shocked is a critical factor. *Brain Res* 1982 Jun 24; **242**(2): 299-308.

Waxman S.G., Kocsis J.D., Black J.A. Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 1994; **72**: 466-70.

Wei F., Vadakkan K.I., Toyoda H., Wu L.J., Zhao M.G., Xu H., et al. Calcium calmodulin-stimulated adenylyl cyclases contribute to activation of extracellular

signal-regulated kinase in spinal dorsal horn neurons in adult rats and mice. *J Neurosci.* 2006; **26**: 851–861.

Westlund K.N., Bowker R.M., Ziegler M.G., et al. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Res* 1983; **263**: 15-31.

White D.M., Cousins M.J. Effect of subcutaneous administration of calcium channel blockers on nerve injury-induced hyperalgesia. *Brain Res* 1998; **801**: 50-58.

Willis W.D. The Pain System: the Neural Basis of Nociceptive Transmission in the Mammalian Nervous System. Basel: Karger 1985.

Wise R.G., Rogers R., Painter D., Bantick S., Ploghaus A., Williams P., Rapeport G., Tracey I. Combining fMRI with a pharmacokinetic model to determine which brain areas activated by painful stimulation are specifically modulated by remifentanyl. *Neuroimage* 2002; **16**: 999-1014.

Wise R.G., Williams P., Tracey I. Using fMRI to quantify the time dependence of remifentanyl analgesia in the human brain. *Neuropsychopharmacology* 2004; **29**: 626-35.

Woolf C.J. and Salter M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2002; **208**: 1765-69.

Woolf C.J., Thompson S.W., King A.E. Prolonged primary afferent induced alteration in dorsal horn neurons, an intra-cellular analysis in vivo and in vitro. *J Physiol* 1988; **83**: 255-266.

Wright D.E., Snider W.D. Neurotrophin receptor mRNA expression defines distinct populations of neurons in rat dorsal root ganglia. *J Comp Neurol.* 1995; **351**: 329–338.

Wu G., Ringkamp M., Hartke T.V., Murinson B.B., Campbell J.N., Griffin J.W., Meyer R.A. Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci* 2001; **21**: RC140.

Xiao W.H., Bennett G.J. Synthetic omega-conopeptides applied to the site of nerve injury suppress neuropathic pain in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **274**: 666-72.

Yang H.W., Hu X.D., Zhang H.M. et al. Roles of CaMKII, PKA and PKC in the induction and maintenance of LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol* 2004; **91**: 1122–1133.

Yangou Y., Birch R., Sangameswaran L., Eglen R., Anand P. *FEBS Lett* 2000; **467**: 249-252.

Zhang X.C., Zhang Y.Q., Zhao Z.Q. Involvement of nitric oxide in long-term potentiation of spinal nociceptive responses in rats. *Neuroreport* 2005; **16**: 1197–1201.

Zuo Y., Perkins N.M., Tracey D.J., Geczy C.L. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: A key role of mast cells. *Pain* 2003; **105**: 467–479.