



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
Area del Farmaco e Trattamenti Innovativi

CICLO XXXIII

COORDINATORE Chiar.ma Prof.ssa Carla Ghelardini

**Approcci farmacologici innovativi per il trattamento della  
cefalea d'abuso di analgesici e per il blocco dei canali al sodio  
Nav1.8**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

**Dottorando**

Dott. Urru Matteo

**Tutore**

Chiar.mo Prof. Chiarugi Alberto

**Coordinatore**

Chiar.ma Prof.ssa Ghelardini Carla

Anni 2017/2020

# Sommario

INTRODUZIONE	5
STUDIO DELL'EFFETTO DEL DEXPRAMIPEXOLO IN MODELLI ANIMALE DI DOLORE ACUTO E CRONICO.	5
<b>IL DOLORE</b>	<b>5</b>
Classificazioni del dolore	5
Linee guida per il trattamento del dolore	7
I Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei e il Paracetamolo	7
I Farmaci Oppioidi	9
Linee guida per il trattamento del dolore neuropatico.	13
<b>LA NOCICEZIONE</b>	<b>16</b>
Differenza tra nocicezione e dolore	16
Il Sistema Somatosensoriale	16
Le fibre responsabili della nocicezione	19
Le vie somatosensoriali	21
I DRG come nuovo target nella terapia del dolore	23
La Teoria del Gate Control System	23
La via discendente di controllo del dolore	24
<b>I CANALI IONICI</b>	<b>26</b>
Il trasporto attraverso la membrana	26
I canali ionici ligando-dipendenti	27
I canali ionici voltaggio-dipendenti	29
I Canali al Sodio voltaggio dipendenti	31
Farmaci che agiscono sui Nav	36
I canali Nav e il dolore	39
STUDIO DEGLI EFFETTI DEGLI HDAC INIBITORI IN UN MODELLO PRECLINICO DI MOH	42
<b>LA CEFALEA DA USO ECCESSIVO DI FARMACI</b>	<b>42</b>
Introduzione	42
Cefalee episodiche primarie	43

Il ruolo del sistema trigemino-vascolare	45
Uso di farmaci nella cefalea	46
Cefalea da uso eccessivo di farmaci	49
Emicrania ed epigenetica	53
<b>IL CALCITONIN GENE-RELATED PETIDE</b>	<b>56</b>
Introduzione	56
Sintesi e struttura	56
Distribuzione del CGRP	58
Recettori del CGRP	59
Ruolo del CGRP nella patologia emicranica	60
<b>MODULAZIONE EPIGENETICA DELL'ESPRESSIONE GENICA</b>	<b>65</b>
Introduzione	65
Organizzazione del genoma	65
I rimodellatori della cromatina	69
HATs e HDACs	71
Il ruolo dell'acetilazione nella regolazione dell'espressione genica	74
Gli Inibitori HDAC	78
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>81</b>
Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.	81
Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di MOH	82
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>84</b>
<b>Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.</b>	<b>84</b>
Animali	84
Preparazioni delle colture cellulari di DRG	84
Registrazioni elettrofisiologiche	85
Analisi del docking molecolare	86
Modelli animali di dolore	87
Analisi statistica	90
<b>Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di MOH</b>	<b>90</b>
Animali	90
Trattamento farmacologico	91
Analisi mediante gene array	91
Analisi mediante rt-PCR	92

Test comportamentali	92
Analisi statistica	94
<b>RISULTATI</b>	<b>95</b>
<b>Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.</b>	<b>95</b>
Il dexpramipexolo è in grado di inibire la corrente veicolata dai Nav 1.8 nei neuroni DRG	95
Analisi del docking molecolare	98
Il DEX non altera le correnti al sodio nei neuroni ippocampali e nei cardiomiciti	100
Effetto del DEX nei modelli animali di dolore nocicettivo	101
Effetto del DEX in modelli animali di dolore neuropatico	103
<b>Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di MOH</b>	<b>106</b>
Analisi mediante gene array dei gangli trigeminali	106
Valutazione mediante rtPCR dei dati ottenuti mediante gene array	111
Analisi delle soglie nocicettive in seguito al trattamento cronico con ELE o INDO	112
Effetti degli HDACI sul modello di MOH indotto da eletriptan	114
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>117</b>
Conclusioni	125
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>127</b>



# INTRODUZIONE

## Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.

### IL DOLORE

#### Introduzione

Nel 1979 l'Associazione internazionale per lo studio sul dolore (IASP) definì il dolore come "un'esperienza sensoriale e emotiva spiacevole associata a un danno tissutale attuale o potenziale, o descritta in termini di danno". Il dolore presenta quindi una componente percettiva, ossia la nocicezione in senso stretto attraverso il quale la percezione di uno stimolo negativo e lesivo per l'organismo viene trasmesso al sistema nervoso centrale, e una componente affettiva del tutto soggettiva, ossia la percezione psichica del dolore, che può essere percepita con una diversa intensità a seconda dello stato emotivo dell'individuo.

#### Classificazioni del dolore

Esistono diverse tipologie di classificazione del dolore, in base all'aspetto che viene principalmente considerato<sup>1,2</sup>:

- il meccanismo patofisiologico del dolore
- la durata del dolore
- la causa del dolore
- la localizzazione del dolore

Nella classificazione *patofisiologica* si distinguono due principali tipi di dolore, quello *nocicettivo* e quello *neuropatico*. Il dolore *nocicettivo* insorge in seguito ad un danno tissutale che attiva specifici recettori periferici, definiti *nocicettori*, che trasmettono la sensazione a livello centrale. Viene distinto in *somatico* quando è causato da una lesione agli epiteli quali cute, sottocute e nei tessuti muscolari, oppure *viscerale* se causato da alterazioni ad organi interni. L'intensità di questa tipologia di dolore è correlata al danno

subito e la percezione dolorosa termina al terminare della causa. Il dolore *neuropatico* invece è un dolore continuo che non è conseguente ad uno stimolo intenso o che si manifesta in seguito a stimoli che non darebbero conseguenze se non in caso di ipersensibilità. Il dolore neuropatico può essere sia *periferico* (in conseguenza di una lesione o di una patologia che colpisce il sistema nervoso periferico) o *centrale* (in conseguenza di una lesione o di una patologia del sistema nervoso centrale)<sup>3</sup>.

Tuttavia, non è sempre possibile una distinzione netta. Basandoci sulla *durata del dolore*, si distinguono dolore *acuto* e dolore *cronico*. La distinzione netta di un caso dall'altro è difficoltosa, ma indicativamente il dolore acuto viene considerato tale se la sua durata è inferiore a 30 giorni, mentre viene considerato cronico un dolore superiore a tre mesi. I sintomi e le cause dei due tipi di dolore possono sovrapporsi e i fattori patofisiologici possono essere indipendenti dalla durata. La classificazione *eziologica* non ha molta rilevanza ai fini del meccanismo e del trattamento del dolore, dal momento che la classificazione è comunemente basata sul tipo di malattia che lo provoca, maligna o non maligna.

La percezione del dolore è soggettiva e una misurazione di questa sensazione è complicata<sup>4</sup>, inoltre viene influenzata dal tipo di cultura, dalla personalità dell'individuo, dallo stato di nutrizione e dall'eventuale presenza di altre malattie, quindi capire le reali cause del dolore può essere molto complicato.

Il dolore è spesso classificato in base alla *localizzazione* corporea o alla funzione anatomica del tessuto colpito (ad es. dolore articolare, nevralgia, dolore viscerale) poiché si tende a pensare che queste siano caratteristiche univoche e determinanti nella caratterizzazione del dolore. Tuttavia, la localizzazione e la funzione indicano solo la dimensione fisica e non prendono in considerazione il meccanismo sottostante. Per questo motivo, anche se la classificazione anatomica può essere utile per diverse diagnosi, non offre un modello per il trattamento clinico del dolore.

Qualunque sia il tipo di classificazione adottata, una parte essenziale della condizione di dolore in cui versa il paziente è la sofferenza che il paziente stesso prova. Per questo motivo una vasta branca della farmacologia attuale ha l'obiettivo primario di ridurre l'esperienza del dolore, persino a discapito del processo morboso in senso stretto, per via delle implicazioni del dolore sull'umore e sulla qualità della vita del paziente.

## Linee guida per il trattamento del dolore

L'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1986 ha proposto una terapia farmacologica del dolore progressiva, la cosiddetta "*scala analgesica a tre gradini*", il cui principio base è la gradualità della terapia del dolore: l'approccio farmacologico deve essere sequenziale e deve essere proporzionato all'intensità del dolore riportato dal paziente. Per ogni step della scala è indicato un gruppo di farmaci:

- Analgesici non-oppioidi
- Oppioidi deboli
- Oppioidi forti

A questi si possono aggiungere i farmaci adiuvanti che comprendono sostanze che possono migliorare l'analgesia o controllare gli effetti collaterali; possono essere utilizzati ad ogni step per migliorare la sintomatologia complessiva.

Gli *analgesici non-oppioidi* sono costituiti dai farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e il paracetamolo.

## I Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei e il Paracetamolo

I FANS bloccano l'attività degli enzimi ciclossigenasi (COX) responsabili della sintesi di *prostaglandine* (definiti per questo anche PGH sintasi) a partire dall'acido arachidonico. Le *prostaglandine* mediano l'effetto flogogeno nei siti in cui si ha uno stimolo lesivo, perciò il blocco della loro biosintesi da parte dei FANS determina scomparsa o riduzione della flogosi<sup>5</sup>. Gli enzimi COX si distinguono in due isoforme, COX-1 e COX-2, che catalizzano la conversione di acido arachidonico in endoperossido prostaglandinico. Sono quindi implicate non solo nella flogosi, ma anche nella coagulazione del sangue e nel funzionamento di stomaco e reni. La COX-1 è un enzima costitutivamente espresso, invece la COX-2 è un enzima inducibile, espresso nei tessuti colpiti da flogosi.

I FANS vengono suddivisi in tre classi, in base al meccanismo di interazione con gli enzimi COX. La prima classe ha un meccanismo di tipo competitivo semplice, in cui il farmaco compete reversibilmente con l'*acido arachidonico* per il legame sul sito di ancoraggio all'interno del canale della ciclossigenasi di tipo 1 (COX-1). Viene formato rapidamente un complesso Enzima Inibitore (EI) facilmente dissociabile, che porta ad un'inibizione delle cicloossigenasi 1 e 2. A questa classe appartiene per esempio l'*ibuprofene*. La seconda



classe dei FANS ha un meccanismo competitivo tempo-dipendente. I farmaci di questa classe si legano rapidamente e reversibilmente all'enzima, formando complessi EI ma, se trattenuti nel sito di ancoraggio da due isoenzimi per un tempo sufficiente, portano ad un cambiamento conformazionale della proteina che lentamente stabilizza il complesso EI, che avrà un tempo di dissociazione molto più lungo. All'interno di questa classe abbiamo farmaci quali l'*indometacina*, il *diclofenac* e i *coxib*. L'azione terapeutica dei Fans di questa classe è dovuta all'interazione con la COX-2 mentre effetti tossici, in particolare la tossicità intestinale è da imputarsi all'azione sulle COX-1. La terza ed ultima classe dei FANS è costituita ad oggi da un unico farmaco, l'*acido acetilsalicilico* (aspirina) il cui meccanismo d'azione è di tipo competitivo, tempo- dipendente ed irreversibile. Infatti, l'aspirina si lega inizialmente al sito di ancoraggio all'interno del canale con bassa affinità, ma una volta che si trova in questa posizione, trasferisce il suo gruppo acetile ad un uno specifico residuo di serina (Ser). Questo residuo è Ser 529 nella COX-1 mentre è il Ser 516 nella COX-2. Sebbene l'aspirina non sia un inibitore efficace di questi due enzimi, quando somministrato in vivo possiede un effetto antinfiammatorio il cui meccanismo non è ancora stato chiarito. Studi *in vitro* hanno evidenziato come il farmaco, a concentrazioni millimolari sia capace di inibire l'attivazione di proteine regolatrici della trascrizione dei geni espressi nelle risposte infiammatorie, come l'NF-kB ma la rilevanza di queste proprietà con le concentrazioni utilizzate in vivo non è chiara<sup>6</sup>.

Il *paracetamolo* ha un meccanismo differente da quello dei FANS, in quanto inibisce solo debolmente le COX-2, ma in condizioni fisiologiche e a dosi terapeutiche questa inibizione diventa significativa. Al di là di questa debole inibizione, alcuni studi hanno ricollegato l'azione del farmaco all'inibizione di una possibile terza isoforma dell'enzima ciclossigenasi, denominata COX-3<sup>7</sup>. Possiede una potenza analgesica simile a quella dell'aspirina e risulta efficace nel trattamento del dolore di origine non-infiammatoria. Una delle patologie antalgiche per cui viene frequentemente prescritto il *paracetamolo* è quella indicata come *Low-back pain*, ovvero il dolore alla base della schiena che porta a rigidità e difficoltà a mantenere la posizione eretta. Sulla reale efficacia del farmaco in questo tipo di patologia non è ancora stata fatta la necessaria chiarezza, un recente studio confuta questo tipo di uso, definendo l'efficacia del farmaco pari a quella del placebo su più di 1600 casi di lombalgia acuta<sup>8</sup>. Il *paracetamolo* ha una minore tossicità intestinale rispetto ai FANS, ed avvelenamenti sono da ricondurre a sovradosaggi protratti su medio/lunghi periodi<sup>9</sup>.

## I Farmaci Oppioidi

Il secondo e il terzo gradino sulla scala dell'OMS sono occupati dai farmaci oppioidi deboli e forti. I farmaci oppioidi mimano l'azione dei peptidi endogeni che agiscono legandosi ai recettori del sistema oppioide, ampiamente distribuiti nel sistema nervoso centrale e ma che sono presenti anche in periferia. La loro localizzazione in precise aree cerebrospinali, deputate al controllo di specifiche funzioni, rende conto del ruolo fisiologico esercitato dal sistema oppioide e anche dell'effetto farmacologico di queste molecole. L'uso di questi farmaci è consigliato nei casi di dolore acuto, per esempio post-operatorio, o cronico di intensità moderata o forte, come il dolore da cancro o il dolore tipico di alcune malattie degenerative come l'artrite reumatoide<sup>10</sup>.

Vengono distinti in deboli e forti confrontando la loro potenza analgesica a quella della morfina, che viene considerata l'oppioide di riferimento.

Gli oppioidi deboli hanno una capacità analgesica inferiore a quella della morfina e vengono indicati nei casi di dolore moderato, mentre nei casi di dolore da moderato a forte vengono utilizzati gli oppioidi forti, che hanno capacità analgesica superiore a quella della morfina.

Gli oppioidi deboli come la *codeina*, la *diidrocodeina* e il *tramadolo*, si caratterizzano per avere un tetto d'azione, un plateau, per cui dosaggi superiori a quelli indicati portano solo ad un lieve incremento dell'azione analgesica a fronte di un cospicuo incremento degli effetti collaterali. Vengono somministrati insieme ad un altro analgesico non- oppioide, spesso il paracetamolo.

Tra gli oppioidi forti, la *morfina* è ancora il farmaco di scelta nei casi di dolore da cancro. Il farmaco ha diverse vie di somministrazione (orale, intravascolare, intratecale e topica). La morfina è una molecola idrofila e agisce da agonista attivando i recettori oppioidi di tipo  $\mu$ . Ha un'emivita nel plasma che va dalle 2 alle 3 ore e in seguito a somministrazione orale ha una biodisponibilità che va dal 30 al 40%.

Una volta che la morfina raggiunge la circolazione sanguigna, è portata al fegato dove buona parte della sostanza viene metabolizzata. Questo metabolismo di primo passaggio fa sì che soltanto una frazione, intorno al 40%, di morfina possa raggiungere il sistema nervoso centrale. La via principale per il metabolismo della morfina è la coniugazione con acido glucuronico: in seguito a queste reazioni circa il 60% di morfina si trasforma in

morfina-3-glucuronide (M3G) e un altro 10% viene trasformato in morfina-6-glucuronide (M6G).

Il metabolita responsabile dell'effetto analgesico è il M6G. L'accumulo di questo metabolita e della morfina stessa porta ad effetti collaterali come nausea, vomito, sedazione e nei casi più gravi a depressione respiratoria. Anche l'altro metabolita formato, il M3G, può produrre un effetto analgesico ma a questo si devono anche le caratteristiche neurotossiche del farmaco e l'iperalgia indotta da oppioidi.

Entrambi i metaboliti hanno un'emivita più lunga di quella della morfina, arrivando alle 6 ore. Tendono ad accumularsi principalmente in quei pazienti con disfunzionalità e insufficienza renali, in questi casi, ai fini terapeutici, si rende necessaria la sostituzione della morfina con altri farmaci oppioidi.

Altri farmaci classificati come oppioidi forti sono il *metadone*, il *fentanyl* e l'*ossicodone*.

Il *metadone* è un oppioide sintetico con una potenza relativa 50 volte superiore a quella della morfina. Questa molecola ha diversi bersagli, agisce infatti sui recettori oppioidi  $\mu$  ma mostra anche un effetto antagonista sui recettori NMDA e ha un forte effetto di inibizione nel re-uptake della serotonina e della noradrenalina a livello centrale.

Inoltre, ad alte dosi il *metadone* blocca i canali del potassio responsabile della rapida ripolarizzazione a livello cardiaco, infatti uno degli effetti collaterali di questo farmaco è quello di causare di aritmie ventricolari. Il *metadone* viene utilizzato nei pazienti con dolore da cancro che richiedono un cambio di oppioide o può essere utilizzato come primo farmaco oppioide in quei pazienti che hanno già avuto una terapia oppioide per un dolore moderato. Il farmaco ha un debole effetto immunosoppressivo. La molecola è lipofila ed ha un ampio volume di distribuzione e un'elevata affinità tissutale. Questa grande affinità, insieme al graduale e tardivo rilascio dal plasma rende conto della lunga emivita del metadone, che va dalle 15 alle 40 ore. La biodisponibilità del farmaco varia dal 70 al 80%, in seguito alla somministrazione orale. L'effetto analgesico va dalle 6 alle 12 ore. Il metadone viene metabolizzato principalmente attraverso gli enzimi del fegato, ma anche a livello intestinale attraverso una N-demetilazione a livello della parete, ad opera principalmente del citocromo CYP3A4. Il farmaco viene eliminato dall'organismo con le feci oppure attraverso le urine, a seconda del loro pH ma nei casi di disfunzione renale cronica il metadone non viene accumulato nelle urine.

Il metadone non può essere eliminato con l'emodialisi quindi nella terapia del dolore il metadone è più difficoltoso da usare rispetto ad altri oppioidi, a causa della complicata farmacocinetica e per il fatto che interagisce con molti altri farmaci. Il *fentanyl* è una molecola idrofobica, come la morfina è un agonista dei recettori  $\mu$ , con un effetto analgesico di circa 100 volte più potente della morfina. Nella terapia del dolore cronico viene somministrato per via transdermica mediante l'uso di cerotti che rilasciano un determinato quantitativo di farmaco (da 2 a 16.8 mg di farmaco al giorno) e che debbono essere sostituiti ogni 72 ore. La natura lipofila della molecola permette al *fentanyl* di distribuirsi molto rapidamente nei tessuti biologici, accumulandosi a livello dei muscoli scheletrici e nel tessuto adiposo. Questa rapida distribuzione attraverso i tessuti rende conto della rapida insorgenza d'azione come analgesico: il picco d'azione si ha infatti a soli 2-3 minuti dalla somministrazione, mentre il picco d'azione della morfina per esempio, si ha a 10 minuti dalla somministrazione<sup>11</sup>.

Il *fentanyl* viene metabolizzato a livello epatico, nella forma inattiva norfentanyl. Poiché il farmaco agisce principalmente nella via del CYP3A4, una isoforma del citocromo P450, si deve evitare la somministrazione di farmaci che inibiscano o alterino l'attività di questo enzima. In confronto alla morfina, il *fentanyl* da una minore costipazione, meno nausea e sedazione<sup>12</sup>.

Il *fentanyl* è indicato in quei pazienti che soffrono di una costipazione grave in seguito alla terapia con morfina, oppure in quei pazienti che in seguito alla somministrazione di morfina soffrono di intolleranza, nausea e vomito. È invece controindicato nei pazienti che hanno una sindrome dolorosa instabile, non continua a causa della lunga emivita del farmaco (circa 20 ore).

L'*ossicodone* è un derivato semi-sintetico della tebaina, un oppioide che ha un'elevata affinità con i recettori  $\kappa$  per gli oppioidi con effetti agonisti sui recettori  $\mu$ . Rispetto alla morfina, l'*ossicodone* ha una più bassa affinità ai recettori  $\mu$  e una liposolubilità simile. La molecola dell'*ossicodone* ha la capacità di passare la barriera ematoencefalica molto rapidamente, il che spiega i forti effetti analgesici rispetto ad altri oppioidi. Il farmaco non mostra effetti immunosoppressivi.

L'*ossicodone* ha un'alta biodisponibilità in seguito a somministrazione orale, tra il 60-87%: la sua emivita nel plasma va dalle due alle 3 ore in seguito a somministrazione intravascolare, mentre va dalle 3 alle 8 ore in seguito a somministrazione orale.

L'*ossicodone* è metabolizzato a livello del fegato in *norossicodone* ad opera del citocromo CYP3A4 e, più lentamente, ad *ossimorfone* ad opera del CYP2D6. Il *norossicodone* viene metabolizzato a *norossimorfone* tramite il CYP2D6, e l'*ossimorfone* è metabolizzato a *noroxymorfone* dal CYP3A4. L'analgesia si ha principalmente dopo la somministrazione del composto di partenza, infatti già il primo metabolita, ovvero il *norossicodone* ha solo il 17% del potere analgesico dell'*ossicodone*. Il composto *ossimorfone* viene prodotto in esigue quantità, mentre è più consistente la quantità prodotta di *norossimorfone*, che ha inoltre una significativa affinità con i recettori  $\mu$  per gli oppioidi, ma che non riesce a passare la barriera ematoencefalica, non avendo quindi effetto ai fini analgesici. Nei pazienti affetti da cirrosi epatica e malattie epatiche in generale, la dose di *ossicodone* somministrata viene generalmente dimezzata. Il farmaco viene eliminato dall'organismo attraverso i reni, per cui anche nei pazienti con insufficienza renale viene ridotta la dose di *ossicodone* somministrata in quanto in queste condizioni l'emivita del farmaco viene prolungata da 1,8 a 26 ore. Il farmaco interagisce con altri farmaci a livello centrale, per esempio con le benzodiazepine, neurolettici e antidepressivi portando ad un'intensificazione degli effetti collaterali, in particolar modo della sedazione e, in pazienti particolarmente sensibili agli oppioidi, della depressione respiratoria<sup>13</sup>.

Un altro oppioide di largo utilizzo è il *tapentadolo*, più potente della morfina e dello stesso *ossicodone*. Media la sua azione analgesica mediante due meccanismi d'azione: la molecola infatti agisce da agonista dei recettori  $\mu$  del sistema oppioide ma inibisce anche il re-uptake della noradrenalina. Diversi studi hanno dimostrato che i farmaci oppioidi possono essere considerati sicuri quando vengono somministrati correttamente<sup>14</sup>. I farmaci oppioidi analgesici non causano tossicità a carico di un organo specifico, diversamente da altri farmaci ad uso analgesico come l'aspirina e il paracetamolo, non è stato infatti riscontrato l'aumento di emorragie intestinali o di tossicità renale<sup>15</sup>.

Sono comunque farmaci che hanno molteplici effetti collaterali tra cui sedazione, nausea e vomito, tolleranza e dipendenza fisica, depressione respiratoria. Il fenomeno della tolleranza rende conto di una perdita di potere analgesico a parità di dose ed è una delle più comuni complicazioni durante la terapia con oppioidi.

La dipendenza fisica è lo sviluppo di uno stato fisiologico alterato che si manifesta in una sindrome da astinenza da oppiacei con iperattività a livello del sistema nervoso autonomo e a livello somatico. Gli oppioidi hanno capacità immunomodulatoria. Ciò venne dimostrato

già nel 1980 quando venne mostrato la capacità immunosoppressiva e la diminuzione della resistenza all'infezione batterica nelle cavie da laboratorio, in seguito al trattamento con morfina. Gli effetti immunologici degli oppioidi sono mediati da meccanismi a livello centrale e a livello periferico.

Altro effetto collaterale derivante dall'uso di oppioidi è quella che viene definita endocrinopatia da oppioidi. Si tratta di cambiamenti ormonali, che si hanno in entrambi i sessi, che includono fra gli altri, testosterone, estrogeni, ormone luteinizzante, cortisolo e l'ormone di rilascio della gonadotropina.

Un effetto collaterale scoperto più recentemente è quello dell'iperalgia, o iperalgia, da oppioidi, definita come un aumento della sensibilità al dolore. Questa sensibilizzazione presenta un incremento della sensazione di dolore nonostante vengano aumentate le dosi del farmaco oppioide. In questi casi si effettua uno *switch*, ovvero si sostituisce il farmaco oppioide.

Già nei primi pazienti che vennero sottoposti ad una terapia oppioide, si notò che la somministrazione di tali farmaci aveva un effetto sedativo, a causa dell'attività anticolinergica di queste sostanze, influenzando negativamente sulla vita del paziente.

All'uso di oppioidi sono poi attribuiti disturbi cardiaci, disfunzionalità a livello della vescica e disturbi del sonno<sup>16-18</sup>. Quindi è chiaro che, nei pazienti che manifestano un dolore da moderato a forte, l'uso di oppioidi è necessario, ma a questo si accompagna tutta una serie di effetti collaterali che hanno un peso specifico sulla qualità della vita dell'individuo.

Nonostante il forte rischio di effetti collaterali, tra i quali è compresa la morte, questi farmaci continuano ad essere ampiamente prescritti, anche per la mancanza di valide alternative, nella maggior parte dei pazienti affetti da dolore cronico.

### Linee guida per il trattamento del dolore neuropatico

Nel 2010 la Federazione Europea delle società Neurologiche (EFNS) ha aggiornato le linee guida per il trattamento farmacologico del dolore neuropatico. Si tratta di cure palliative, in quanto mirano ad eliminare il sintomo, ovvero la sensazione di dolore, piuttosto che la causa.

Gli studi utilizzati per valutare l'efficacia di ogni farmaco sono stati identificati usando il database di Medline e Cochrane e sono state classificati in base alla condizione eziologica.

Ogni gruppo si è dedicato ad un solo tipo di patologia. Sono state prese in esame varie neuropatie dolorose, dalle più comuni come la neuropatia da diabete, quella post-erpetica (in conseguenza dell'Herpes zoster), quella al nervo trigemino fino a neuropatie più rare tra cui la Neuropatia HIV correlata, la neuropatia post-traumatica, la neuropatia da cancro e quella dell'arto fantasma (pazienti affermano di sentire dolore ad un arto che è stato amputato).

Tra i farmaci più utilizzati per il controllo del dolore neuropatico vi sono gli antidepressivi triciclici la cui efficacia, comprovata in studi randomizzati e controllati verso placebo, è indipendente dall'azione antidepressiva. Tra questi l'amitriptilina, la desipramina, imipramina, la clomipramina, ma non sembra esserci diversità di risposta tra i diversi farmaci. La loro efficacia è verosimilmente legata ai molteplici meccanismi d'azione, tra cui il blocco del reuptake di noradrenalina e serotonina, rinforzando la via endogena di controllo del dolore. Molto usati in passato, lo sono attualmente con minor frequenza dopo l'avvento di altri farmaci efficaci sul dolore con minori effetti collaterali.

La *duloxetina*, appartenente al gruppo dei SRNI, ovvero gli inibitori del re-uptake di serotonina e noradrenalina, è indicato per il trattamento dei disturbi depressivi maggiori e, essendo questi neurotrasmettitori coinvolti nella via discendente del controllo del dolore, viene utilizzato nella gestione del dolore neuropatico associato a neuropatia diabetica periferica. Diversi studi hanno provato l'efficacia del farmaco a diversi dosaggi (60 e 120 mg/die) nel controllo del dolore, sia nel breve periodo (12 settimane) che sul periodo più esteso (28 settimane). Gli studi evidenziano la scarsità di effetti collaterali, in larga maggioranza di entità minore e non gravi.

Per le neuropatie più comuni, tra i farmaci di prima linea vengono indicati *gabapentin* e *pregabalin*, analoghi sintetici dell'acido gamma aminobutirrico (GABA).

Il *gabapentin*, nato come antiepilettico di associazione, ha ottenuto nel febbraio 2001 l'indicazione registrata per il trattamento del dolore neuropatico negli adulti. Il *gabapentin* è in commercio dal 1993, mentre il *pregabalin*, prodotto dalla stessa casa farmaceutica è stato commercializzato nel 2004, contestualmente alla perdita del brevetto del *gabapentin* e quindi alla disponibilità del medicinale come equivalente generico. Entrambi i farmaci agiscono sui canali al Ca<sup>++</sup> voltaggio dipendenti, riducendo la liberazione di vari neurotrasmettitori come il glutammato e la noradrenalina. Il gabapentin inoltre

modula positivamente la liberazione del GABA, che quindi si trova maggiormente concentrato nello spazio inter-sinaptico.

L'AIFA suggerisce il ricorso all'uso di questi farmaci solo in quei pazienti *"con controindicazioni agli antidepressivi triciclici (amitriptilina, clomipramina) e alla carbamazepina o nei quali l'impiego di questi farmaci risulti inefficace, anche in considerazione del fatto che per questi pazienti nella pratica clinica non ci sono alternative farmacologiche"*.



## LA NOCICEZIONE

### Differenza tra nocicezione e dolore

Con il termine nocicezione si indicano tutti quei processi che trasducono il segnale dalla periferia al livello centrale, in seguito alla stimolazione di neuroni sensitivi primari, specializzati nella raccolta di informazioni dolorifiche e detti perciò nocicettori. È importante sottolineare la differenza che esiste tra *nocicezione* e *dolore*: quest'ultimo è una sensazione che si manifesta a livello centrale e risulta da una specifica attività neurologica, spazio-temporale, all'interno della corteccia cerebrale e non sempre i due concetti sono legati. Ad esempio, in un individuo dove sia stato reciso completamente il midollo spinale avremmo tutto il processo di nocicezione ma l'informazione, nell'impossibilità di arrivare a livello centrale, non si tradurrà in dolore.

La distinzione tra dolore e nocicezione è importante in tutti quegli studi in cui si osserva la risposta allo stimolo antalgico, in cui quindi si ritiene il dolore come l'ultima componente della catena di impulsi che dalla periferia arriva a livello centrale.

### Il Sistema Somatosensoriale

Attraverso il sistema somatosensoriale noi percepiamo tatto, pressione, temperatura, dolore. I recettori delle fibre sensitive sono localizzati su tutto il corpo, anche negli organi interni (es. sensazione di bruciore dello stomaco), alcune di queste sensazioni non si percepiscono consciamente a livello corticale, ma arrivano al talamo. Abbiamo percezioni viscerali, percezioni di stiramento dei muscoli e percezione delle articolazioni (percepiamo la loro posizione).

Le sensibilità somatiche si dividono in 3 tipi:

- sensibilità somatiche *meccanocettive*, dovute a sollecitazioni meccaniche dei tessuti corporei;
- sensibilità *termiche*, intorno ai 45° C la sensibilità termica diventa dolorifica;
- sensibilità *dolorifiche*, evocate da qualunque sensazione di danneggiamento tissutale.

Tatto, pressione e vibrazione dipendono da tipi di recettori differenti: il tatto è rilevato da recettori posti vicino alla superficie cutanea, mentre la pressione è rilevata da recettori che si trovano più in profondità.

Le fibre afferenti che rispondono a stimoli di bassa intensità, in genere decodificano stimoli tattili o una sensazione di caldo o di freddo, invece fibre afferenti che rispondono a stimoli ad elevate intensità decodificano la sensazione nocicettiva.

Le sensazioni tattili fini e discriminative avvengono grazie a fibre afferenti, che sono in rapporto con i cosiddetti meccanocettori a bassa soglia. Quando si registra da queste fibre si hanno fondamentalmente due tipi di risposte, che consentono di distinguere 4 classi di fibre afferenti meccanocettive:

- risposte a rapido adattamento, FA (*fast-adapting*)
- risposte a lento adattamento, SA (*slow-adapting*)

Le fibre a rapido adattamento presentano una breve scarica di potenziali d'azione quando il meccanocettore viene stimolato transitoriamente, ma la scarica si blocca quando lo stimolo tattile permane: al termine dello stimolo possono effettuare una nuova scarica di potenziali d'azione. Le fibre a lento adattamento, al contrario, effettuano una scarica di potenziali d'azione per tutta la durata dello stimolo.

Entrambe le tipologie di fibre possono essere ulteriormente discriminate in base alle caratteristiche del loro campo recettivo, ovvero di quella regione di cute la cui stimolazione causa una variazione nella frequenza di scarica della fibra afferente: avremo quindi fibre FA1 e SA1, con campi recettivi piccoli e con confini ben definiti, e fibre FA2 e SA2, con campi recettivi più estesi, con margini poco definiti e un unico punto di massima sensibilità, a partire dal quale la sensibilità diminuisce con la distanza. Comparando l'estensione dei due tipi di campo recettoriale delle fibre di una mano, le unità di tipo 1 ricevono stimoli da uno spazio compreso in 4 solchi papillari (il periodo cresta-solco papillare misura mediamente 500 micron) mentre il campo recettoriale delle unità di tipo 2 si estende per tutto il dito. A livello periferico queste fibre possono terminare come terminazioni nervose libere o all'interno di formazioni capsulate, le cui cellule fungono da cellule di supporto.

Si distinguono 4 tipi di recettori in base alle scariche che provocano nelle fibre afferenti (Figura 1):

- i *recettori del Pacini*, a rapido adattamento sono costituiti da un corpuscolo

connettivale che avvolge una terminazione nervosa; si pensa che l'adattamento sia dovuto solo alla struttura circostante. Si trovano in profondità, sono relativamente poco numerosi e hanno un campo recettivo ampio e con bordi vaghi. Sono FA2;

- i *recettori di Meissner* sono posti nella cute glabra, in superficie. Sono a rapido adattamento e più numerosi di quelli del Pacini, hanno campi recettivi piccoli e con bordi netti. Sono anch'essi costituiti da corpuscoli deformabili. Sono FA1 (sono molto simili ai recettori associati ai follicoli piliferi);
- i *recettori di Merkel* sono superficiali, hanno campi piccoli e definiti e sono molto numerosi, sono a lento adattamento e sono costituiti da dischi cellulari e dalla rispettiva terminazione nervosa. Sono del tipo SA1;
- i *recettori di Ruffini* sono sottocutanei, hanno ampi campi recettivi. Sono costituiti da corpi collegati a una terminazione nervosa. I campi recettivi grandi devono la loro forma alla comprimibilità delle strutture; presentano massima sensibilità al centro e un graduale innalzamento della soglia verso i bordi. I recettori di Ruffini sono del tipo SA2.

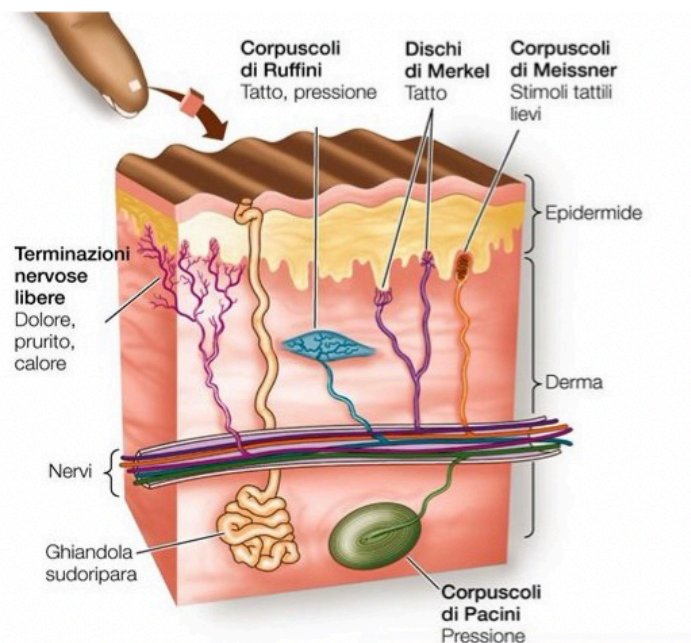


Figura 1 - I differenti nocicettori periferici.

I recettori tattili sono innervati da fibre dette A $\beta$ , mieliniche, con diametro compreso tra 1 e 6  $\mu\text{m}$  e velocità di conduzione tra i 6 e i 36 m/s.

## Le fibre responsabili della nocicezione

La maggior parte delle fibre afferenti possiede un'elevata soglia di attivazione e risponde preferibilmente a stimoli intensi, di tipo termico e nocivo.

Queste fibre afferenti sono raggruppate in un'unica categoria poiché le informazioni che esse rilevano, vengono trasmesse agli stessi tipi di fibre a livello del Sistema Nervoso Periferico e tramite le stesse vie del Sistema Nervoso Centrale.

Una delle conseguenze di queste linee dedicate, dette *linee attivate*, è che la sensazione nociva non è dovuta una sorta di attivazione più intensa delle vie su cui viaggiano altri tipo di informazione, per esempio la sensazione tattile. Da un punto di vista pratico ciò è immediatamente dimostrabile, in quanto una stimolazione sempre più frequente porta ad una stimolazione tattile di intensità crescente, senza trasformarsi in una sensazione dolorosa.

I nocicettori sono dei recettori polimodali, in quanto hanno la capacità di rilevare stimoli di differente natura, che raggiungano un'intensità tale da causare lesioni ai tessuti e che vengono poi interpretati a livello centrale come sensazione di dolore. La base anatomica della generazione dello stimolo nocicettivo è stata studiata a fondo e ne sono stati compresi gli intimi meccanismi<sup>19</sup>.

Il corpo della cellula nervosa è localizzato a livello dei gangli spinali (tranne nel caso del nervo trigemino in cui i corpi cellulari si trovano nel ganglio di Gasser) e da esso si sviluppano due processi, uno verso la periferia e un altro verso le corna dorsali del midollo spinale.

La classificazione delle fibre che conducono l'informazione si basa su tre criteri fisiologici:

- la velocità di conduzione,
- il tipo di stimolo che evoca la risposta,
- le caratteristiche temporali della risposta allo stimolo.

Vengono quindi distinti due principali tipi di fibre periferiche che trasmettono la nocicezione:

- le *fibre C* hanno un diametro ridotto, non sono mie linizzate e conducono l'impulso nervoso lentamente (2 m/s), Rispondono a stimoli meccanici, termici e chimici di alta intensità e rappresentano gli afferenti primari provenienti dai visceri. Conducono un dolore sordo, lento e profondo, difficilmente localizzato definito *protopatico*;

- le fibre  $A\delta$  hanno un diametro maggiore, sono poco mie linizzate e sono capaci di condurre l'impulso nervoso molto rapidamente (20 m/s). Sono responsabili del dolore acuto, transitorio, ben localizzato, definito *epicritico*.

Si ritiene che le fibre  $A\delta$  siano alla base del cosiddetto *primo dolore* mentre le fibre C siano responsabile del *secondo dolore* (Figura 2): stimolando diversi nocicettori si ottengono due tipi di sensazione dolorifiche, la prima più acuta e di breve durata è detta primo dolore, mentre la seconda è più ritardata e più duratura nel tempo ed è indicata come secondo dolore<sup>20</sup>.

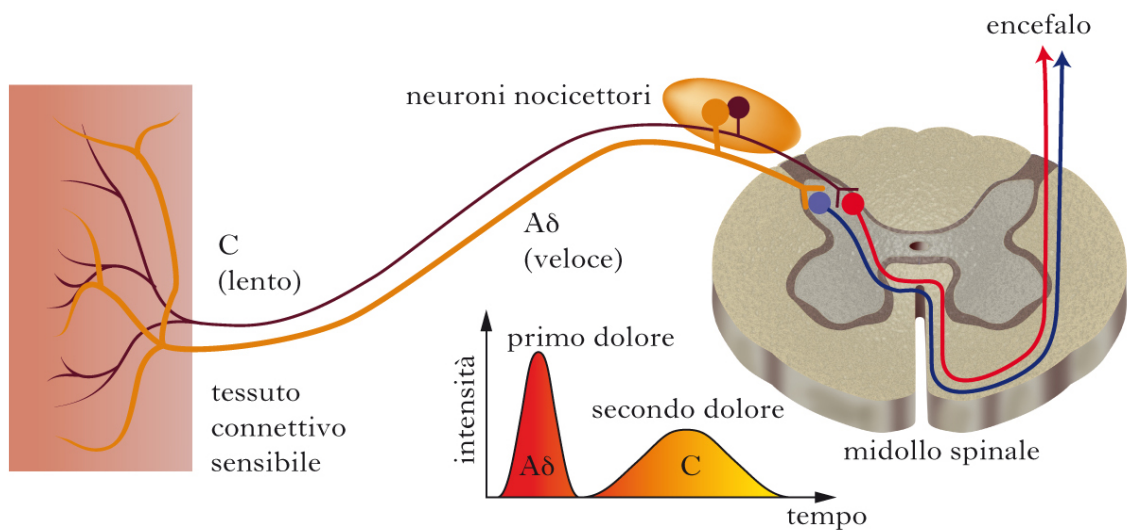


Figura 2 - Fibre  $A\delta$  e Fibre C mediano un diverso tipo di dolore per intensità e tempo relativo, denominati rispettivamente primo dolore e secondo dolore.

Ciascuna classe di fibre è costituita a sua volta da fibre tra loro eterogenee, per quanto riguarda la sensibilità agli stimoli. I nocicettori delle fibre C sono polimodali, rispondono a stimoli meccanici, fisici e termici mentre quelli  $A\delta$  sono di due tipi e rispondono a stimoli di tipo meccanico e meccanico-termico.

Per quanto riguarda la sensibilità termica le fibre si classificano in base alla loro responsività al caldo, al caldo lesivo per i tessuti, al freddo e al freddo lesivo per i tessuti. Stimoli termici vengono percepiti come dolorosi quando la temperatura supera i 43 °C oppure quando questa è inferiore ai 15°C.

Esistono perciò differenti tipi di fibre che rispondono a differenti stimoli, ma il tipo più comune è rappresentato dalle fibre C polimodali, che costituiscono all'incirca la metà delle fibre C di origine cutanea<sup>21</sup>.

Nell'ultimo decennio sono state identificate diverse proteine che avrebbero un ruolo chiave nel processo nocicettivo, in particolare per quanto riguarda la sensazione termica: si tratta di proteine appartenenti alla famiglia TRP (*Transient Receptor Potential*).

Il recettore TRPV1 risponde al caldo doloroso, mentre il recettore TRPM8 risponde alla sensazione di freddo quando questa è nociva per i tessuti<sup>21</sup>.

Le proteine responsabili della trasduzione di stimoli meccanici nocivi non sono state identificate con certezza, ma nell'uomo si pensa che alcune di esse siano omologhe a proteine identificate in *Caenorhabditis elegans*, appartenenti alla famiglia DEG/ENaC (Degenerin/Epithelial Na Channel)<sup>22</sup>.

L'attivazione delle diverse proteine di trasduzione presenti nei nocicettori, determina l'insorgenza di un potenziale d'azione che provoca la scarica della fibra afferente che trasmette le informazioni a livello centrale.

L'attivazione dei nocicettori porta anche alla liberazione topica di diverse sostanze chimiche, tra cui le *tachichine*, come la sostanza P e la CGRP (*Calcitonin Gene-Related Protein*), che portano all'insorgenza di infiammazione con edema e arrossamento della cute circostante. Queste sostanze sono inoltre in grado di attivare i nocicettori *non- sensibili* o *silenti*, nocicettori che abitualmente non sono in grado di rispondere ad uno stimolo meccanico ma che acquistano questa capacità dopo l'avvenuto danno tissutale, in risposta a questi mediatori chimici endogeni<sup>23</sup>.

È stato ipotizzato che questa sensibilizzazione dei recettori silenti sia alla base del fenomeno dell'*allodinia*, ovvero un dolore suscitato da uno stimolo che normalmente non è in grado di provocare una sensazione dolorosa e di quello dell'*iperalgisia*, ovvero un aumento dell'intensità della sensazione dolorifica rispetto a stimoli che, prima della lesione, procuravano una sensazione dolorifica minore.

### Le vie somatosensoriali

Esistono due vie principali che portano le informazioni somatosensoriali dai recettori periferici al SNC, il *sistema delle colonne dorsali-lemnisco mediale* e le *vie anterolaterali* (Figura 3). Le due vie di trasmissione constano di tre neuroni in serie, indicati come neuroni di primo, secondo e terzo ordine. Diversi tipi di informazione arrivano al talamo e alla corteccia somatosensoriale attraverso le due vie: la prima trasmette informazioni provenienti dai meccanocettori e da propriocettori, mentre la seconda trasmette

informazioni provenienti da termocettori e nocicettori. Ad eccezione delle afferenze che innervano il viso, che originano dal ganglio di Gasser, tutte le fibre afferenti del corpo dalla periferia arrivano alle corna dorsali delle vertebre: qui si connettono con i gangli delle corna dorsali (DRG, dorsal root ganglion) i cui prolungamenti entrano nel SNC.

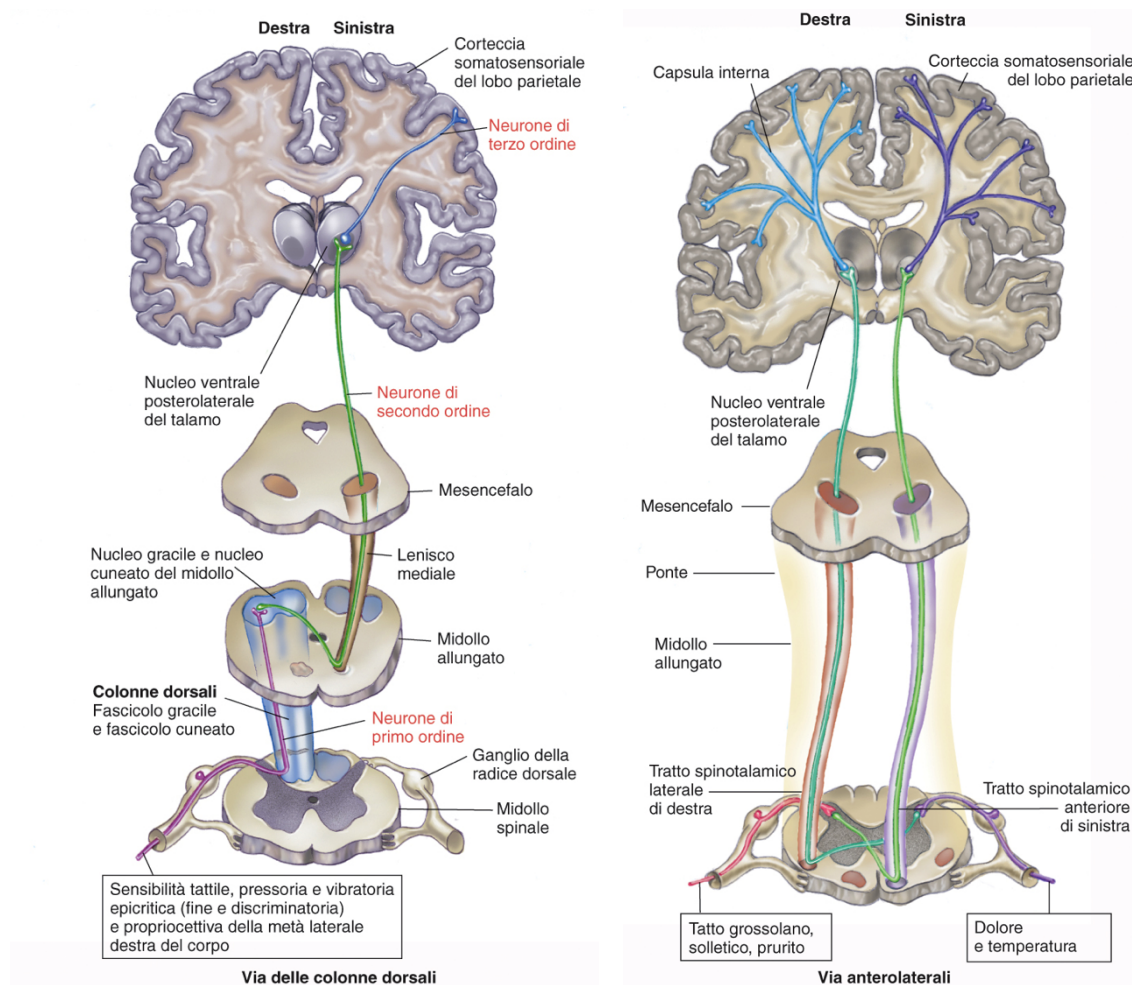


Figura 3 - Le due vie somatosensoriali ascendenti che trasmettono diverse informazioni provenienti dal corpo. L'assone del neurone di secondo ordine, in verde, attraversa la linea mediana in entrambe le vie (da *Fisiologia dell'Uomo*, autori vari, Edi.Ermes, Milano).

I corpi cellulari dei neuroni sensoriali che costituiscono i DRG, noti come neuroni di primo ordine, sono di tipo pseudounipolari, ovvero si caratterizzano per la presenza di un soma e due prolungamenti che però agiscono come un unico assone, e conducono il potenziale d'azione dalla periferia a livello centrale.

In entrambe le due vie, le fibre afferenti da lato destro e sinistro del corpo, dopo essere penetrate nel midollo spinale si incrociano, cambiando lato prima di arrivare al talamo: questo spiega perché le informazioni somatosensoriali provenienti dal lato destro del corpo

raggiungano la corteccia somatosensoriale di sinistra e viceversa. Le branche centrali delle fibre A $\delta$  e di quelle C, che trasmettono le sensazioni dolorifiche e termiche provenienti dal corpo, terminano nel corno dorsale del midollo spinale.

Le fibre A $\delta$  raggiungono le lamine I, V e X della sostanza grigia, invece le fibre C arrivano sulle lamine I e II. Queste differenze nella sede delle terminazioni dei due tipi di fibre ha suggerito che i segnali che esse trasducono vengano mantenuti separati anche a livello del SNC.

Le informazioni di natura termocettiva e nocicettiva provenienti dalla regione del viso e della testa vengono elaborate in maniera analoga a quelle provenienti dal tronco e dagli arti, ma le fibre afferenti raggiungono l'encefalo attraverso il trigemino. Queste fibre non arrivano direttamente all'encefalo, ma discendono sino alla parte superiore del midollo spinale cervicale, per poi risalire nel tronco encefalico insieme alle altre fibre sensoriali, a dimostrazione dell'estrema organizzazione di questo sistema.

### I DRG come nuovo target nella terapia del dolore

I neuroni DRG rivestono un ruolo chiave nella nocicezione, poiché in seguito a stimoli periferici, hanno la capacità di aumentare il segnale verso l'encefalo, attraverso una maggiore eccitabilità neuronale e un aumento delle scariche ectopiche, aumentando la sensazione di dolore.

I DRG, a differenza dei fasci nervosi periferici che sono rivestiti da una capsula di tessuto connettivale detta perineurio e al contrario della barriera ematoencefalica nel SNC, sono rivestiti da una capsula più permeabile in quanto più ricca di capillari. Manca quindi di una efficace barriera, il che consente una più semplice diffusione di sostanze nell'interstizio che circonda il neurone, rendendo i DRG un bersaglio ideale per le nuove terapie del dolore.

### La Teoria del Gate Control System

La teoria del sistema di controllo a cancello del dolore (Gate Control System), pubblicata per la prima volta nel 1965<sup>24</sup>, fa riferimento al fatto che stimoli di natura non nocicettiva, per esempio tattili, provenienti da un'area lesionata, possano bloccare o comunque ridurre la sensazione dolorifica proveniente dalla stessa area.



Secondo questa teoria, gli interneuroni di tipo inibitorio possono essere eccitati dagli impulsi condotti dalle fibre di grosso diametro, quali sono  $A\alpha$  e  $A\beta$  che trasmettono informazioni tattili: questa liberazione di GABA inibisce le cellule del tratto spinotalamico, chiudendo di fatto il cancello agli impulsi algogeni, oltre che dall'attivazione delle vie discendenti di tipo inibitorio.

Viceversa, nella trasmissione del dolore non modulata, fibre collaterali delle afferenze nocicettive, le fibre C, inibiscono questi interneuroni inibitori, tenendo quindi aperto il cancello e permettendo la trasmissione del segnale dolorifico ai neuroni di secondo ordine nelle corna dorsali del midollo (Figura 4).

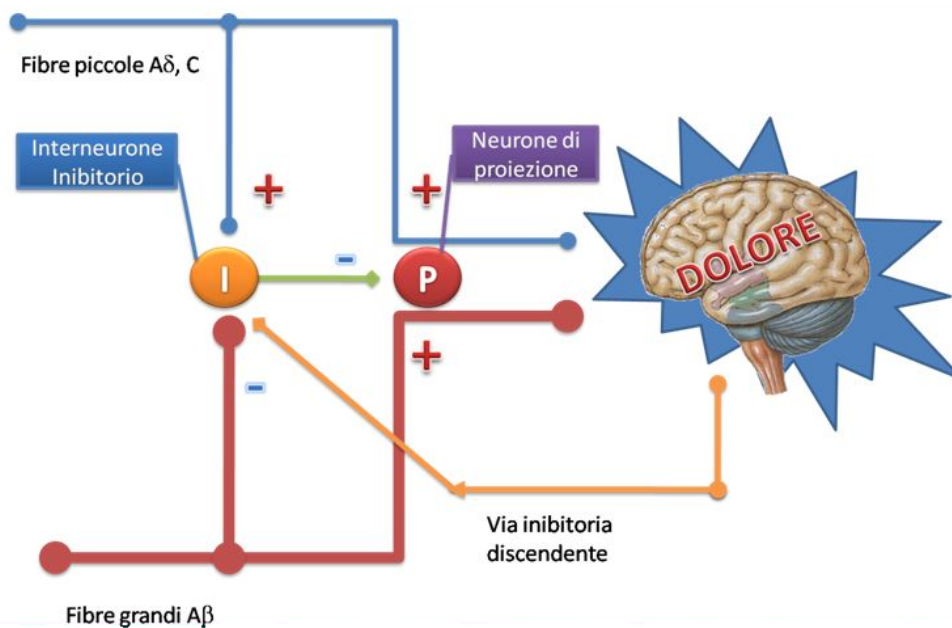


Figura 4 - La teoria del cancello fornisce un modello esplicativo relativo all'attivazione molecolare dei recettori cellulari, con particolare riferimento alla nocicezione. Il concetto fondamentale si basa sull'interazione tra i diversi tipi di fibre nervose, nocicettive e non-nocicettive.

### La via discendente di controllo del dolore

Oltre alle vie ascendenti della nocicezione, di particolare interesse è quello che viene indicato come *sistema analgesico endogeno*: si tratta di un sistema discendente che regola la trasmissione nocicettiva. Di questo sistema fanno parte vari centri presenti nel tronco encefalico, insieme alle vie che ne originano.

I neuroni della *sostanza grigia periacqueduttale* (PAG) ricevono impulsi di controllo dalla corteccia, dal talamo e dall'ipotalamo. I neuroni della PAG proiettano, nel midollo allungato, sul *nucleo magno del rafe* (NRM) e sul *nucleo reticolare magnocellulare* (NRMC).

Da qui originano fibre discendenti che giungono alla *sostanza gelatinosa* (SG) del midollo spinale attraverso il *funicolo dorso-laterale* (FDL). Altre proiezioni spinali rilevanti ai fini del controllo del dolore partono dal *nucleo reticolare paragigantocellulare* (NRPG), a sua volta controllato dalla PAG, e da gruppi di cellule noradrenergiche ponto-midollari (*locus coeruleus*, LC).

L'NRM riceve segnali di attivazione dall'adiacente NRPG che a sua volta viene attivato da impulsi portati attraverso i fasci ascendenti spino-talamici. I neuroni nocicettivi spinali subiscono quindi il controllo inibitorio delle vie discendenti per afferenza sia diretta sia per afferenza mediata da interneuroni della SG. Esistono inoltre altre vie inibitorie che originano dalla corteccia somatosensitiva, dall'ipotalamo e dalla formazione reticolare.

Questo sistema viene suddiviso in due componenti, una nella quale vengono utilizzati oppioidi endogeni (in qualità di neurotrasmettitori) come l'encefalina, la dinorfina e la  $\beta$ -endorfina e un'altra dove, al contrario, non si ha liberazione di queste molecole<sup>25</sup>. Gli oppioidi endogeni si legano a tre tipi di recettori attraverso i quali mediano la loro azione analgesica:  $\kappa$ ,  $\mu$ , e  $\delta$ . Si tratta di recettori accoppiati a proteine G, costituiti da 7 domini transmembrana. Questi recettori hanno un'alta densità in tutte le aree del SNC coinvolte nella nocicezione, ovvero il tronco encefalico, il talamo mediale, il midollo spinale, l'ipotalamo e il sistema limbico, ma sono stati identificati anche nel sistema periferico<sup>26</sup>.

Su questi recettori mediano la loro azione gli analgesici oppioidi. Per esempio, la  *morfina*  ha un'alta affinità per il recettore  $\mu$ , che media l'azione analgesica del farmaco e dei suoi derivati.

## I CANALI IONICI

### Il trasporto attraverso la membrana

La differente distribuzione ai due lati della membrana delle diverse specie ioniche e la variazione di questa distribuzione consentono la vita delle cellule eucariotiche. A dimostrazione dell'importanza di tale distribuzione vi è il fatto che quasi un terzo dell'energia totale spesa dalla cellula, sia impiegata nel mantenimento dei gradienti transmembranari di sodio ( $\text{Na}^+$ ), potassio ( $\text{K}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ) e calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

In base a criteri termodinamici i trasporti transmembrana vengono distinti in attivi e passivi. I trasportatori attivi creano il gradiente energetico, pompando ogni specie ionica attraverso la membrana contro il proprio gradiente di concentrazione: per poter fare ciò necessitano di una fonte energetica costituita dall'ATP, nel caso si tratti di trasportatori primari, o che viene ottenuta accoppiando il flusso netto dello ione che viene trasportato contro gradiente a quello di uno che viene trasportato secondo gradiente.

Quando entrambi gli ioni si muovono simultaneamente nella stessa direzione il co-trasporto è definito *simporto*, quando invece i due ioni si muovono in direzioni opposte è definito *antiporto*. I trasportatori passivi dissipano il gradiente energetico formato dai trasportatori attivi, consentendo il movimento dei soluti da un lato della membrana ad alto potenziale elettrochimico verso quello a basso potenziale. Questo tipo di trasporto viene effettuato da due diversi tipi di proteine, i trasportatori facilitati e i canali ionici, che hanno un meccanismo totalmente differente: nel caso dei trasportatori facilitati, il legame del soluto su un sito specifico della proteina ne induce un cambiamento conformazionale che espone il substrato sul lato opposto, viceversa, nel caso dei canali ionici si hanno dei pori acquosi, che permettono la diffusione degli ioni permeanti ad una velocità molto elevata, tanto da generare correnti significative (una corrente è data da un moto ordinato di particelle cariche), che hanno la capacità in brevissimo tempo di cambiare il potenziale di riposo di una cellula.

In cellule eccitabili come quelle muscolari, le endocrine e le neuronali, i canali ionici sono responsabili della generazione e della regolazione dei segnali elettrici mediante i quali le cellule comunicano per garantire diverse funzioni, tra cui la contrazione del tessuto muscolare, la secrezione ormonale e la liberazione di neurotrasmettitori. Alterazioni dei geni che codificano per queste proteine sono alla base di molte patologie, che vengono

quindi definite "canalopatie", come per esempio la sindrome da QT lungo che è causata da mutazioni in uno o più geni codificante per diversi canali che portano ad un allungamento della durata del potenziale d'azione ventricolare, allungando l'intervallo QT.

I canali ionici vengono suddivisi fondamentalmente sulla base di due proprietà che ne descrivono l'attività: cosa ne determina l'apertura e quale specie ionica è in grado di attraversarlo una volta aperto.

### I canali ionici ligando-dipendenti

I canali ionici che si aprono o si chiudono in risposta al legame di un messaggero a un recettore vengono definiti *canali attivati da ligando o recettori canale*.

I recettori canale sono canali attivati dal ligando, nei quali il ligando agisce da messaggero che si lega alla struttura proteica del recettore. Questi canali vengono divisi in due categorie: i canali rapidi, nei quali il recettore ed il canale sono la stessa proteina, ed i canali lenti, in cui il recettore ed il canale sono proteine separate, accoppiate tra loro da un terzo tipo di proteine, detta proteina G.

I canali rapidi sono quindi proteine che agiscono sia da recettore che da canale ionico. Il legame di un messaggero al recettore-canale provoca un cambio conformazionale e l'apertura del canale, aumentando la permeabilità della membrana a quello specifico ione. L'aumento della permeabilità può variare le proprietà elettriche della cellula oppure può consentire allo ione di agire da secondo messaggero, inducendo risposte quali contrazione muscolare, secrezione, variazioni metaboliche e modificazioni nel trasporto di sostanze.

Per esempio, l'azione del neurotrasmettitore Acetilcolina (ACh) a livello cardiaco è mediata dai recettori nicotinici: quando due molecole di ACh legano la porzione delle subunità  $\alpha$  del canale esposte all'esterno della membrana, il recettore-canale cambia conformazione, aprendo il poro posto nella porzione del recettore che attraversa il doppio strato lipidico. Questo canale può essere attraversato sia da ioni  $\text{Na}^+$  sia da ioni  $\text{K}^+$ , ognuno dei quali segue il suo gradiente elettrochimico.

Poiché in questo caso il recettore ed il canale ionico sono la stessa proteina, le modificazioni del potenziale di membrana indotte dal legame del messaggero al recettore iniziano rapidamente, entro il millisecondo. Il canale rimane nella conformazione aperta solo mentre il messaggero è legato al canale stesso: poiché questo si distacca rapidamente, le

modificazioni del potenziale di membrana non durano generalmente a lungo, terminando entro pochi millisecondi.

In altri casi, i canali rapidi svolgono la loro azione aumentando la concentrazione intracellulare di  $\text{Ca}^{2+}$ . Quando questi canali si aprono, gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  li attraversano seguendo il loro gradiente e quindi entrando nella cellula: a seconda del tipo di cellula, l'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  può portare a differenti risposte, tra cui la contrazione muscolare, la secrezione di un prodotto cellulare oppure lo ione può agire da *secondo messaggero* (un messaggero intracellulare prodotto dal legame di un messaggero extracellulare, il *primo messaggero*, ad un recettore). In qualità di secondo messaggero, il  $\text{Ca}^{2+}$  modifica l'attività di proteine intracellulari legandosi ad una proteina citoplasmatica, la *calmodulina*. Il complesso calcio-calmodulina attiva quindi una proteina chinasi, un enzima che catalizza la fosforilazione di altre proteine, alterandone struttura e funzione attraverso una modifica covalente. L'azione da secondo messaggero viene svolta in maniera ottimale dal  $\text{Ca}^{2+}$  rispetto agli altri ioni, perchè questo ione è normalmente presente nel citoplasma in concentrazioni molto basse (da  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  molare) rispetto alla concentrazione extracellulare ( $10^{-3}$  molare). Grazie a questa bassa concentrazione, l'ingresso di modeste quantità di ione sono sufficienti a portare una forte variazione della concentrazione citoplasmatica.

I canali lenti sono regolati da proteine G, che ne causano l'apertura o la chiusura in risposta al legame di un messaggero con il proprio recettore. Le proteine G sono dei trimeri, formate da tre subunità  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , il cui nome deriva dalla loro capacità di legare il nucleotide guanosina, il cui sito di legame si trova sulla subunità  $\alpha$ .

Nello stato inattivo la proteina G lega una molecola di GDP (guanosina difosfato), quando un messaggero lega il recettore-proteina G, viene rilasciato il GDP e sostituito con una molecola di GTP (guanosina trifosfato), attivando la proteina G. Quando la proteina G viene attivata, la subunità  $\alpha$  si muove verso il canale ionico, si lega e induce un cambio conformazionale che ne provoca l'apertura o la chiusura. Questi canali hanno effetti simili a quelli dei recettori-canale rapidi, ma si differenziano per due ragioni principali:

- il legame del messaggero con i recettori-canali può solamente aprire il canale, aumentando la permeabilità della membrana a quello ione specifico, mentre i canali che dipendono dalla proteina G possono essere aperti o chiusi dal legame del messaggero al recettore;

- Il legame del messaggero con i recettori-canale rapidi induce una risposta breve e immediata, mentre i canali ionici che dipendono dalle proteine G sono canali lenti che possono rimanere aperti o chiusi per lunghi periodi, nell'ordine dei minuti.

### I canali ionici voltaggio-dipendenti

I canali ionici voltaggio-dipendenti si aprono in seguito ad una variazione di voltaggio transmembrana: variazioni anche di pochi millivolt (mV) portano ad una forte alterazione delle probabilità di apertura del canale. Esistono altri tipi di canali ionici che si aprono in seguito al legame di un ligando (ligando-dipendenti), in base alla forza meccanica applicata (meccano-sensibili) o della temperatura ambientale (termo-sensibili). Questa è una distinzione grossolana. In quanto uno stesso canale può essere regolato da diversi meccanismi.

Le caratteristiche di permeazione consentono una classificazione dei canali in base alla specie ionica dalla quale vengono attraversati: i canali per il  $\text{Na}^+$ , per il  $\text{K}^+$ , per il  $\text{Cl}^-$  e per il  $\text{Ca}^{2+}$  hanno un alto grado di selettività ionica. Grazie alla possibilità di registrare i flussi ionici attraversanti il singolo canale, mediante la tecnica del patch-clamp, il clonaggio molecolare e l'analisi cristallografica di ampie regioni funzionalmente importanti (sia nei canali voltaggio dipendenti che ligando dipendenti), si è arrivati a definire in maniera sufficientemente dettagliata l'organizzazione strutturale di molti canali ionici e delle relazioni tra la loro struttura e la loro funzione.

I canali ionici voltaggio-dipendenti hanno un peso che varia dai 200 ai 250 kDa. Possono essere costituiti da un'unica catena polipeptidica, come nel caso dei canali al  $\text{Na}^+$  e di quelli al  $\text{Ca}^{2+}$ , oppure da distinte catene polipeptidiche più piccole, ognuna delle quali costituisce un dominio.

La struttura responsabile della voltaggio-dipendenza è definita *sensore del voltaggio*, il cui funzionamento è permesso dall'esistenza di particelle cariche elettricamente nella porzione transmembrana. Ciò venne già intuito negli anni '50 da Huxley e Hodgkin, che le definirono cariche di attivazione<sup>27</sup>.

Negli anni '80 vennero definite le sequenze primarie dei primi canali voltaggio-dipendenti: il canale al  $\text{Na}^+$  neuronale e quello al  $\text{Ca}^{2+}$  presente nel muscolo scheletrico. Venne osservata la presenza, nel quarto segmento transmembrana di una sequenza particolare,

caratterizzata dalla presenza di 4-8 residui amminoacidici carichi positivamente quali arginine e lisine (Arg e Lis), ogni 3 posizioni occupate da aminoacidi idrofobici.

Il movimento di queste cariche in seguito a variazioni di potenziale, venne indicato come *primum movens*, ovvero la causa prima dell'apertura del canale. Le cariche positive nel quarto segmento transmembrana (S4) stabiliscono interazioni elettrostatiche con le cariche negative localizzate sugli altri segmenti e con le teste apolari dei fosfolipidi costituenti la membrana: il variare di queste interazioni consente al canale di avere differenti configurazioni.

Tutto ciò venne confermato attraverso studi di spettroscopia in fluorescenza, elettrofisiologia e cristallografia<sup>28</sup>.

Dal momento che gli esperimenti di cristallografia vengono condotti in assenza di differenza di potenziale transmembranario, le informazioni che si ottengono sono soprattutto sullo stato attivato del canale che si ha quando la membrana è depolarizzata. Sono stati proposti 3 modelli sul possibile meccanismo di apertura dei canali ionici voltaggio dipendenti<sup>29</sup>:

- il *modello del trasportatore*, secondo cui la maggioranza dei residui di Arg dell'S4 sarebbe posizionata in una fessura a contatto con il liquido intracellulare. Durante l'attivazione le cariche si muoverebbero verso un'altra fessura, questa volta entrando in contatto con il liquido extracellulare. Secondo questo modello il segmento S4 su cui si trovano le cariche andrebbe incontro principalmente a movimenti rotazionali, con un movimento attraverso la membrana molto ridotto (2-3 Å). Questo modello suggerisce quindi una evidente analogia tra il meccanismo di apertura di questi canali ionici e i trasportatori facilitati: entrambi mediano il trasporto grazie ad una modifica conformazionale.
- il *modello a vite elicoidale* prevede, in condizioni di depolarizzazione della membrana, la rotazione intorno al proprio asse del segmento S4 di circa 60-80° e, contemporaneamente, una traslazione attraverso la membrana di circa 5-15 Å, lungo il proprio asse, consentendo alle prime tre Arg di traslocare completamente attraverso il campo elettrico e di formare contatti elettrostatici con altri residui negativi.
- il *modello a paletta* venne ispirato dalla struttura cristallografica del canale batterico KvAP<sup>30</sup>, il segmento S4 e buona parte della porzione extracellulare di

quello S3 formano una forcina, o una paletta che si muove attraverso la membrana come un corpo unico. Nello stato di riposo il segmento S4 si colloca sul fondo della membrana, non lontano dalla soluzione intracellulare e il segmento S3 di conseguenza si colloca sopra di esso. Quando la membrana si depolarizza, l'intera struttura si sposta sulla superficie esterna della membrana, compiendo una traslocazione di circa 15-20 Å. La differenza più significativa di questo modello rispetto agli altri due è che le Arg poste sul segmento S4 sono direttamente esposte all'ambiente lipidico in entrambi gli stadi in cui può trovarsi il canale, mentre negli altri due modelli si trovavano circondate dall'ambiente proteico.

L'attivazione di un canale ionico è spesso seguita dall'inattivazione dello stesso. Questa inattivazione può dipendere dal voltaggio o dall'interazione con un ligando. L'inattivazione voltaggio dipendente segue cinetiche altamente variabili, che possono andare da pochi millisecondi ad alcuni minuti e che prevedono un ri-arrangiamento di specifiche porzioni della proteina, per esempio la porzione N-terminale citoplasmatica delle principali subunità del canale al K<sup>+</sup> oppure il tratto intracellulare di congiunzione tra i domini III e IV del canale al Na<sup>+</sup>, invece l'inattivazione ligando-dipendente è dovuta invece ad interazione del canale con altre proteine e a processi di fosforilazione e defosforilazione.

La *selettività ionica* del canale è data da una sequenza di circa 20 amminoacidi, detta P-loop, che si trova sul tratto che congiunge i segmenti S5 e S6 e si trova nel tratto centrale del poro attraverso cui passano gli ioni. La sequenza P contiene una sequenza GYG, glicina-tirosina-glicina del filtro di selettività, in cui avviene la discriminazione tra le varie specie ioniche.

### I Canali al Sodio voltaggio dipendenti

Tutti i canali al sodio voltaggio-dipendenti (Nav) condividono la medesima struttura, formata da una subunità  $\alpha$  principale, a cui si associa un'unità regolatrice  $\beta$  più piccola e che non è indispensabile per la conduzione dello ione. La presenza dei Nav è ubiquitaria, ma lo studio dell'espressione dei prodotti genici che codificano per questi canali ha rivelato che ogni cellula possiede un corredo di canali specifico, che ne influenza le proprietà. Inoltre, nella stessa cellula possiamo avere la differenziazione di diversi domini funzionali, ognuno dei quali esprime uno specifico set di canali: infatti pur avendo una certa omologia



di sequenza per i tratti determinanti selettività ionica, voltaggio dipendenza e inattivazione, vi sono tratti più divergenti che determinano per esempio differenziazione nei siti di ancoraggio al citoscheletro o nei siti di interazione con specifiche proteine, determinando la diversa localizzazione.

Esistono 9 isoforme di canali Nav, con specifiche localizzazioni e che mediano precisi processi fisiologici e/o patologici (Tabella 1).

<b>Isoform</b>	<b>Gene</b>	<b>Location</b>	<b>TTX sensitivity</b>
Nav 1.1	SCN1A	CNS and DRG	sensitive
Nav 1.2	SCN2A	CNS and DRG	sensitive
Nav 1.3	SCN3A	embryos and CNS	sensitive
Nav 1.4	SCN4A	skeletal muscle	sensitive
Nav 1.5	SCN5A	heart, embryos and DRG	resistant
Nav 1.6	SCN8A	DRG and CNS	sensitive
Nav 1.7	SCN9A	DRG and CNS	sensitive
Nav 1.8	SCN10A	DRG	resistant
Nav 1.9	SCN11A	DRG and CNS	resistant

*Tabella 1 - Famiglia dei canali voltaggio dipendenti al sodio, geni codificanti, localizzazione e sensibilità alla TTX.*

Due di queste isoforme, Nav 1.4 e Nav 1.5, sono largamente espresse, rispettivamente, nel tessuto muscolare scheletrico e in quello cardiaco mentre, le altre sette isoforme sono largamente espresse nei neuroni. Con l'eccezione delle isoforme 1.8 e 1.9, che si trovano quasi esclusivamente nei neuroni somatosensoriali, le altre isoforme che si trovano nei neuroni sono molto sensibili all'azione della neurotossina TTX.

### Struttura dei canali $Na_v$

La subunità  $\alpha$  è formata da 24  $\alpha$ -eliche transmembrinarie organizzate in 4 differenti domini, formati da un'unica catena polipeptidica di circa 2000 amminoacidi. Ognuno dei 4 domini contiene 6 segmenti, il segmento voltaggio-dipendente formato dai primi 4 eliche transmembrana è il segmento S4, il poro interno è delimitato dal segmento P congiungente il segmento S5 ed S6 di ognuno dei 4 domini, che determina la selettività del canale.

Il filtro di selettività è formato da un anello di 4 residui, ognuno appartenente al P-loop di un dominio: *Aspartato* (D) nel dominio I, *Acido glutammico* (E) nel dominio II, *Lisina* (K) nel dominio III e *Alanina* (A) nel dominio IV<sup>31</sup>.

Solo lo ione sodio riesce ad attraversare il filtro, stabilendo interazioni forti con i residui. Altri ioni, per esempio il potassio, difficilmente attraversano il canale in quanto riescono ad avere interazioni molto deboli e vengono, viceversa, fortemente respinti ad opera prevalentemente della Lisina, come è stato confermato dal fatto che la sostituzione di questo specifico residuo (K1237) rende il canale permeabile anche al Potassio e al Calcio.

La subunità  $\alpha$  contiene tutti i siti di legame per farmaci e tossine noti finora, tra cui la *tetradotossina* (TTX) e la *saxitossina* (STX): le tossine causano un blocco del canale, quindi un blocco della conduzione nervosa che può causare sintomi che vanno dall'ottundimento alla paralisi, fino alla morte, se non si provvede alla respirazione artificiale.

La caratterizzazione elettrofisiologica dei canali a voltaggio dipendente, in combinazione con l'utilizzo delle neurotossine TTX, indicano che ci sono generalmente due classi di correnti, una che viene bloccata dalla TTX (detta quindi TTX-S) mentre un secondo tipo di corrente non viene bloccato (TTX-R).

Le correnti TTX-S vengono bloccate dalla neurotossina a concentrazioni nell'ordine delle nanomoli. I canali attraversati da queste correnti hanno una bassa soglia di attivazione, tra i -55 e i -40 mV, si attivano e de-attivano rapidamente.

Le correnti TTX-R possono essere ulteriormente suddivise in differenti classi, sulla base delle diverse caratteristiche biofisiche, per esempio la soglia di attivazione. Esistono infatti sia correnti che hanno una soglia molto simile a quella delle correnti TTX-S, correnti che hanno un'alta soglia di attivazione (circa -36 mV) e correnti che hanno una soglia di attivazione molto bassa (tra -90 mV e -70 mV).

Nella subunità  $\alpha$ , si trovano anche i siti di glicosilazione a livello della zona extracellulare S5 ed S6 dei domini I e II e i siti di fosforilazione nel segmento di connessione tra domini I e II e nelle regioni terminali.

Glicosilazione e fosforilazione, che sono modifiche post-traduzionali, influenzano la stabilità del canale nella membrana e ne influenzano l'attività. Gli effetti della fosforilazione dei canali a voltaggio-dipendente del sodio sono diversi, in base al sito e allo stadio in cui la fosforilazione avviene, e possono indurre modifiche sia funzionali che nella loro espressione<sup>32</sup>.

Le proteine chinasi che possono influire sul *trafficking* (ovvero quel processo che consiste nel trasporto delle proteine dal sito di sintesi al compartimento di destinazione) dei canali voltaggio-dipendenti del sodio maturi sono diverse; tra queste le principali sono le chinasi PKA e PKC.

Il ruolo dei Nav nelle cellule eccitabili è fondamentale, poiché le correnti che li attraversano sono responsabili della fase di depolarizzazione del potenziale d'azione. Queste correnti attraversano il canale solo per brevissimi periodi, poiché esso diventa rapidamente impermeabile agli ioni, in un processo che viene definito *inattivazione rapida*. Questa inattivazione avviene per mezzo di un meccanismo del tipo "ball and chain": una regione citoplasmatica (la particella di inattivazione) occlude il poro legandosi ad una regione adiacente (il sito di attracco): la particella di inattivazione, definita *h-gate* da Hodgkin-Huxley, è costituita da una porzione dell'ansa citoplasmatica che connette i domini III e IV in cui è fondamentale la regione IFMT (isoleucina, fenilalanina, metionina e treonina) che va a legarsi su vari siti in particolare sull'ansa citoplasmatica che connette S4 a S5 dei domini III e IV e all'estremità citoplasmatica di S6 nel dominio IV (Figura 5).

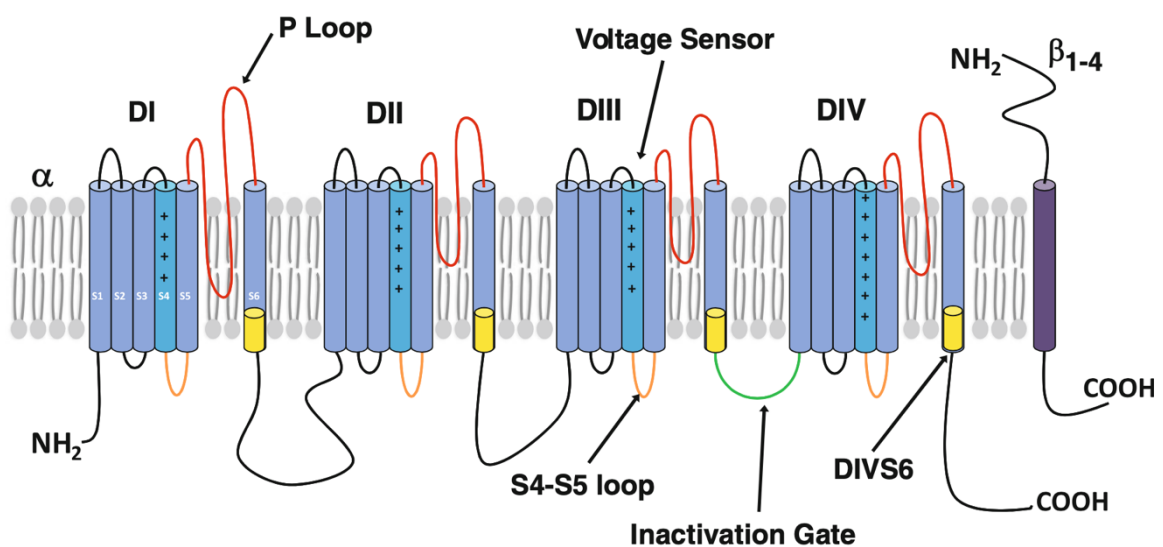


Figura 5 - Organizzazione dei canali Nav. La subunità- $\alpha$  è composta da 24 segmenti (S) transmembrana organizzati in 4 domini omologhi (DI-DIV). I segmenti S1-S4 includono l'S4 a carica positiva e formano i domini del sensore di voltaggio. I segmenti S5-S6 vanno a formare la bocca interna del canale e il gate di attivazione. I segmenti S6 contengono i residui che allineandosi formano il poro citoplasmatico e contribuire a legare il farmaco (giallo). I linker extracellulari tra i segmenti S5 e S6 formano i loop P e contribuiscono alla selettività ionica (rosso). Il linker interdominio D3-D4 include il motivo IFMT e funge da porta di inattivazione del canale (verde). Il linker intracellulari S4-S5 accoppiano i domini del sensore di voltaggio al gate di attivazione (marrone). Le subunità- $\beta$  ( $\beta$ 1-4) hanno un singolo segmento transmembrana con un N-terminale extracellulare e un C-terminale intracellulare (viola).

L'importanza della sequenza IFMT è stata evidenziata in quanto, una sua mutazione causa la scomparsa dell'inattivazione rapida<sup>33</sup>. Esiste un secondo meccanismo attraverso il quale il canale interrompe il flusso di ioni che lo attraversano, indicato come *inattivazione lenta*.

Fisiologicamente questo tipo di inattivazione si ha in seguito a ripetitive e prolungate depolarizzazioni e si tratta di un processo cineticamente distinto (si parla di una scala temporale di secondi contro i millisecondi tipici dell'inattivazione rapida) che interessa regioni del canale diverse da quelle coinvolte nell'inattivazione rapida, tanto che i trattamenti (enzimi, tossine, mutazioni) che aboliscono l'inattivazione rapida non hanno effetto su quella lenta. I meccanismi dell'inattivazione lenta non sono stati ancora del tutto chiariti: un'ipotesi si basa su riarrangiamenti strutturali del poro, con un meccanismo simile a quello che regola l'inattivazione dei canali del potassio di tipo C, ovvero attraverso un restringimento del filtro di selettività<sup>30</sup>; il processo di inattivazione lenta tuttavia probabilmente comporta cambiamenti conformazionali anche in altre zone, quali il segmento S4 del dominio IV, il segmento S6 del dominio II e il collegamento tra S5 e S6 del dominio II<sup>34-36</sup>.

Gran parte della nostra attuale comprensione del legame farmaco-canale e dei meccanismi di inibizione di questi canali da parte dei farmaci deriva dai primi studi sugli ioni dell'ammonio quaternario (AQ) in qualità di bloccanti dei canali al potassio<sup>37,38</sup>. Questi studi rivelarono che:

- gli AQ possono accedere ai loro siti di legame dal versante citoplasmatico,
- l'accesso al sito di legame è regolato dal gate di attivazione,
- a seconda della lunghezza delle code idrofobiche degli AQ, questi possono legarsi all'interno del poro o impedire la chiusura del gate di attivazione con un meccanismo di apertura a pedale,
- aumentando la concentrazione esterna di ioni  $K^+$  si spostano gli AQ dai loro siti interni.

Questi risultati sono coerenti con l'esistenza di un sito di legame degli AQ situato tra la porta di attivazione citoplasmatica e lo stretto filtro di selettività del canale. Studi successivi sui canali voltaggio dipendenti al  $Na^+$  hanno indicato un meccanismo simile di inibizione da parte degli AQ<sup>39-44</sup>.

Le proprietà osservate nel blocco dei canali  $K^+$  da parte degli AQ sono ben correlate con gli studi strutturali del canale KcsA batterico<sup>45</sup>. Il dominio dei pori del canale  $K^+$  è formato dalle eliche transmembrana S5 e S6 che sono organizzate come un cono rovesciato che converge vicino all'estremità citoplasmatica creando un restringimento, l'ipotetica porta di attivazione. L'estremità esterna del poro citoplasmatico è circoscritta dai linkers S5-S6 che contengono residui importanti ai fini della selettività ionica  $K^+$ . Una grande cavità si forma

tra il filtro di selettività e le strette estremità citoplasmatiche dei segmenti S6 che è in grado di accogliere ioni  $K^+$  idratati e composti AQ di grandi dimensioni<sup>46</sup>.

Nei canali  $Na^+$  dei mammiferi, i residui altamente conservati di fenilalanina e tirosina del DIVS6 contribuiscono in modo importante al legame dei farmaci anestetici locali<sup>47</sup>. La fenilalanina sul segmento 6 del IV dominio (DIVS6), è situata vicino all'ingresso citoplasmatico del filtro di selettività e stabilizza il legame tramite interazioni catione- $\pi$  (ovvero di tipo elettrostatico) con le proprietà amminiche di questi farmaci<sup>48,49</sup>. La tirosina conservata sul DIVS6 è situata vicino all'estremità interna del poro citoplasmatico, appena a monte della stretta porta di attivazione, e sembra essere associata principalmente alle proprietà idrofobiche di questi farmaci<sup>50</sup>. Le mutazioni di questi residui generalmente indeboliscono l'inibizione inattivazione-dipendente dei canali al  $Na^+$  fino a 100 volte. La mutagenesi ha identificato ulteriori residui dei segmenti DIS6 e DIIS6 che contribuiscono anche al legame degli anestetici<sup>51</sup>. Tuttavia, le mutazioni dei segmenti DI e DIIII producono riduzioni relativamente piccole dell'inibizione degli anestetici, suggerendo che i residui altamente conservati di fenilalanina e tirosina del DIVS6 sono i più importanti per il legame di questi farmaci<sup>52</sup>.

### Farmaci che agiscono sui Nav

In realtà, la farmacologia di questi canali iniziò ben prima che venissero evidenziate la loro caratteristiche, la loro localizzazione e la loro struttura. Si tratta infatti di un evidente esempio di come, l'utilizzo ai fini terapeutici di determinati farmaci abbia condotto alla comprensione dei processi fisio-patologici, la cui modifica è responsabile dell'azione farmacologica.

Successivamente alla scoperta della potente azione anestetica locale della cocaina, verso la fine del 1800, la ricerca di derivati sintetici che conservassero tale proprietà senza quelle tossiche e manigene, portò alla sintesi della *procaina*, nel 1905. Nei successivi anni la ricerca proseguì, con lo scopo principale di ovviare alla breve durata d'azione della procaina, arrivando alla sintesi della *lidocaina*.

La sintesi della lidocaina, alla fine degli anni '40, è identificabile come il punto di divergenza tra i farmaci ad azione anestetico-locale e i farmaci ad azione antiaritmica. È quindi comprensibile come farmaci che hanno azioni terapeutiche ben distinte,

condividano un meccanismo d'azione comune, che venne scoperto solo dopo la sintesi e l'utilizzo terapeutico di queste molecole: il blocco dei canali del Na<sup>+</sup> voltaggio- dipendenti nelle membrane delle cellule eccitabili.

Le più importanti classi di farmaci, che agiscono in qualità di bloccanti di questi canali, sono:

- gli *anestetici locali*, che bloccano i canali al Na<sup>+</sup> dei nervi periferici,
- gli *antiaritmici* di classe I, che bloccano i canali al Na<sup>+</sup> cardiaci,
- gli *anticonvulsivanti*, che bloccano i canali al Na<sup>+</sup> dei neuroni centrali,
- i *miorilassanti*, che bloccano i canali al Na<sup>+</sup> del muscolo scheletrico.

Pur avendo lo stesso meccanismo d'azione, le diverse molecole si distinguono per la loro farmacocinetica e per la loro farmacodinamica, rendendo ragione dell'appartenenza ad una classe piuttosto che ad un'altra.

L'interazione dei bloccanti con i canali della famiglia Nav ha caratteristiche uso- dipendenti, si parla infatti di *blocco fasico* per cui, in presenza del farmaco, il blocco delle correnti di Na<sup>+</sup> aumenta all'aumentare della stimolazione. Ciò è dovuto al fatto che il sito di legame del farmaco si trova all'interno del poro, per cui la molecola può accedervi rapidamente solo quando il canale è in uno stato aperto e, una volta legato, ha poi un'alta affinità per lo stato inattivato, mantenendo il canale chiuso. Il blocco del canale è progressivo, in relazione al numero di aperture del canale. La frequenza di apertura del canale determina quindi anche la rapidità con cui viene bloccato, ma dato che si tratta di canali voltaggio- dipendenti e la loro frequenza di apertura viene determinata dal voltaggio, si parla quindi di *blocco voltaggio-dipendente*. Questa proprietà fa sì che gli antiaritmici di classe I agiscano preferenzialmente su cellule cardiache danneggiate e quindi depolarizzate, senza influire sulle normali proprietà elettriche del cuore, che gli anticonvulsivanti riescano a bloccare le scariche epilettiche senza alterare la normale attività neuronale e che gli anestetici locali blocchino le fibre nervose con più alta frequenza di scarica, ovvero quelle nocicettive.

Gli antiaritmici di classe I

I farmaci antiaritmici di classe I agiscono sul canale Nav 1.5 presente a livello cardiaco, dove ha lo scopo di permettere la propagazione dell'impulso attraverso il tessuto. Il blocco di tali canali può interrompere le aritmie da rientro, bloccare extra-sistoli dovute a depolarizzazione tardive e accorciare la durata del potenziale d'azione. I bloccanti dei canali

al Na<sup>+</sup> riducono la velocità di contrazione, l'eccitabilità e la conduzione del miocardio. Questa classe di antiaritmici si suddivide in 3 sottoclassi, che si differenziano principalmente in base agli effetti che le diverse molecole hanno sulla durata del potenziale d'azione, sulle cinetiche e sul tipo di interazione che esse hanno con il canale. La *chinidina* è il capostipite della famiglia, attualmente poco usato in clinica a causa della sua elevata tossicità. A questa classe appartengono la lidocaina, un anestetico locale, e i suoi derivati come la *procainamide*. La lidocaina è usata specificamente per le tachiaritmie ventricolari e viene somministrata esclusivamente per infusione endovenosa. La *flecainide* è un altro farmaco appartenente a questa categoria e viene spesso utilizzato per i casi di fibrillazione atriale parossistica.

Farmaci bloccanti dei canali Nav, come la bupivacaina, la lidocaina, la tetracaina vengono utilizzati in procedure di anestesia locale. Recenti sviluppi hanno tentato di migliorarne l'efficacia e limitarne la neurotossicità e la cardiotoxicità. Il primo segno di tossicità neurologica è la sonnolenza, cui seguono sensazione di lingua addormentata, disturbi visivi, agitazione. A livello cardiaco una accidentale somministrazione di 100-200 mg di anestetico, per esempio bupivacaina, porta ad alterazioni del ritmo, quali extrasistoli ventricolari, tachicardie ventricolari e sopraventricolari e difetti di conduzione, con allargamento della traccia QRS.

### Antiepilettici, antimiotonici e neuroprotezione

Altre molecole che agiscono come bloccanti dei canali Nav hanno indicazioni neurologiche, per esempio come antiepilettici, antimiotonici e come neuroprotettivi in situazioni di insulti acuti come l'ischemia cerebrale. Le convulsioni epilettiche sono caratterizzate da scariche ad alta frequenza di potenziali d'azione, che determinano un'attività sincrona di popolazioni di neuroni cerebrali. Attualmente nessun farmaco antiepilettico clinicamente utile ha un'azione terapeutica riconducibile esclusivamente al blocco di un solo tipo (o di una sola classe) di canali ionici, ma i dati sperimentali hanno dimostrato che i canali al Na<sup>+</sup> sono fondamentali sia per le molecole più datate, quali fenitoina e carbamazepina, sia per quelle più recenti come la lamotrigina, l'oxcarbamazepina e il felbamato. La carbamazepina viene anche utilizzata come analgesico di terza linea nel dolore neuropatico, in quei pazienti che non rispondono ai trattamenti di prima e seconda linea<sup>53</sup>.

Farmaci antiaritmici bloccanti dei canali al  $\text{Na}^+$ , come ad esempio la mexiletina e la tocainide trovano impiego anche come farmaci antimiotonici: la miotonia è una patologia a carico dei muscoli scheletrici caratterizzata da contrazioni prolungate causate da un ritardato rilassamento delle fibre muscolari scheletriche.

Analogie tra i meccanismi neurochimici che sono alla base delle manifestazioni epilettiche e alla base di fenomeni neurodegenerativi, in particolar modo disregolazioni dell'attività dei canali  $\text{Na}^+$  e di canali  $\text{Ca}^{2+}$ , ha posto le basi per ipotizzare un possibile effetto neuroprotettivo degli agenti bloccanti dei canali al  $\text{Na}^+$ , in situazioni di insulti acuti come l'ischemia cerebrale. Farmaci quali lidocaina, utilizzato abitualmente come anestetico locale, o il topiramato, il valproato, aventi azione antiepilettica, hanno mostrato azioni neuroprotettive in modelli animali in vivo di ischemia globale e/o focale<sup>54</sup>.

### I canali Nav e il dolore

La stretta correlazione esistente tra i canali al sodio voltaggio-dipendenti e la trasmissione dell'impulso nocicettivo, è testimoniata dal fatto che alterazioni nelle proprietà biofisiche dei canali Nav periferici portino alla comparsa di sindromi dolorose. È, per esempio, il caso di due condizioni di dolore neuropatico ereditarie nell'uomo, l'eritromelalgia e la sindrome da dolore parossistico (PEPD), entrambe associate a mutazioni missenso a carico del gene SCN9A, codificante per l'isoforma Nav 1.7 nell'uomo. L'eritromelalgia, in assenza di cause (ad esempio patologie mieloproliferative o come effetto collaterale dell'assunzione di farmaci), è definita primaria ed è caratterizzata da un intenso dolore bruciante di tipo episodico, associato al rossore e al calore delle estremità colpite. L'insorgenza di questa patologia avviene nei primi anni di vita, è stata infatti segnalata in pazienti di 1 di età e spesso si manifesta entro la fine del primo decennio di vita. Gli attacchi sono descritti dai pazienti come un dolore bruciante (che i pazienti descrivono come straziante, "come lava calda versata sul corpo") con conseguente arrossamento delle estremità distali (piedi e/o mani) in risposta agli stimoli caldi o all'esercizio fisico moderato. I pazienti ottengono sollievo immergendo i piedi o le mani nel ghiaccio, pratica che può portare a ulcerazioni e cancrena<sup>55</sup>. Differenti studi hanno evidenziato l'esistenza di più mutazioni a carico dell'isoforma 1.7 nelle famiglie affette da eritromelalgia di tipo primario<sup>56-59</sup>. Le diverse mutazioni causano la modifica delle proprietà elettrofisiologiche del canale, mutandone le



cinetiche di attivazione e disattivazione, facilitandone l'apertura e mantenendo il canale aperto più a lungo una volta attivato. Dato che i canali Nav1.7 sono presenti nei piccoli neuroni sensoriali (per lo più responsabili della trasmissione del segnale nocicettivo), è ragionevole ipotizzare che i cambiamenti nell'attivazione, nella disattivazione e nell'ampiezza della corrente possano essere alla base del dolore bruciante descritto dai pazienti affetti da eritromelalgia primaria<sup>60,61</sup>.

La PEPD si caratterizza per un diverso set di mutazioni a carico dell'isoforma 1.7, che compromettono l'inattivazione del canale<sup>62,63</sup>.

Le manifestazioni di dolore intenso nei pazienti affetti da PEPD si accompagnano a disfunzioni autonome come arrossamenti della pelle e possono iniziare a manifestarsi già durante l'infanzia. Gli attacchi hanno una durata che va da alcuni secondi a pochi minuti, ma più raramente possono durare alcune ore. I sintomi cambiano con l'età, interessando dapprima la zona oculo-mandibolare e in seguito la zona rettale. Il dolore è più severo nella parte inferiore del corpo e l'attacco può essere innescato da un movimento intestinale o da un sondaggio dell'area perianale, ma anche da repentini cambiamenti di temperatura e da stati motivazionali intensi e possono essere accompagnati da convulsioni toniche non-epilettiche, bradicardia e/o apnea, che sembra essere più comune nell'infanzia e nei bambini piccoli<sup>64</sup>. Le cause delle convulsioni e dei sintomi cardiaci non sono ancora state chiarite.

Le mutazioni a carico del canale compromettono l'inattivazione rapida senza alterare la capacità di attivazione del canale, causando una corrente persistente (attenuata dalla carbamazepina). Successivi studi elettrofisiologici hanno dimostrato che il canale mutato recupera più velocemente dopo l'inattivazione rapida rispetto al canale wild-type<sup>63</sup>.

In seguito all'identificazione del ruolo dell'isoforma 1.7 in sindromi come l'eritromelalgia e la PEPD, sono state scoperte alcune famiglie in cui mutazioni a carico della stessa isoforma portavano alla totale perdita di funzione del canale, portando ad una totale insensibilità al dolore, mentre le altre funzioni sensoriali rimangono inalterate. Tale sindrome è stata definita *insensibilità congenita al dolore* (CIP, congenital insensitivity to pain) e gli individui che ne sono affetti riportano ustioni, fratture e lesioni a labbra e lingua in totale assenza di dolore. I pazienti non presentano anomalie a carico del sistema nervoso, mostrando una normale capacità nel produrre secrezioni esocrine quali lacrime e sudore ed un normale

quoziente intellettivo. Analisi successive del canale Nav 1.7 espresso in queste famiglie ha evidenziato come la mutazione ha prodotto proteine tronche e non funzionanti<sup>65</sup>.

L'isoforma Nav 1.7 non è tuttavia l'unica ad avere un ruolo nella nocicezione. Infatti, mentre l'isoforma 1.7 è responsabile della fase iniziale del potenziale d'azione, avendo quasi una funzione di canale-soglia, la maggior parte della corrente viene veicolata da un'altra isoforma, il canale Nav 1.8.

Mutazioni a carico dell'isoforma Nav 1.8, espressa specificatamente a livello dei neuroni DRG e negli assoni periferici, causano un forte incremento dell'eccitabilità di queste cellule, portando all'instaurarsi di una neuropatia dolorosa. Alcuni studi evidenziano inoltre, come una ridotta espressione di questa isoforma ottenuta mediante l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso, in modelli animali di dolore neuropatico, è correlata ad una riduzione delle manifestazioni comportamentali del dolore neuropatico cronico, quali dell'allodinia tattile e dell'iperalgia<sup>66</sup>.

Tuttavia, è ritenuto improbabile che il ruolo di Nav1.8 nel dolore neuropatico sia mediato dai canali presenti nei neuroni danneggiati. Infatti, il team del Professor Dib-Hajj ha scoperto che l'espressione del canale Nav1.8 è significativamente ridotta (insieme alla corrente veicolata da questi canali) nei neuroni DRG successivamente all'assotomia. Al contrario, l'isoforma Nav1.8 sembra contribuire allo sviluppo del dolore neuropatico attraverso la sua upregulation nei neuroni adiacenti non danneggiati, che risultano quindi sensibilizzati<sup>67</sup>.

L'isoforma Nav 1.9, per le sue cinetiche di attivazione e disattivazione, è indicato come un canale-soglia, ovvero contribuisce al raggiungimento e al superamento della soglia utile ad innescare il potenziale d'azione. Mutazioni a carico del gene codificante la forma Nav 1.9, che inducono un aumento di funzione del canale sembrano possano causare sia la perdita della sensibilità al dolore ma anche episodici attacchi di dolore acuto<sup>68-70</sup>. Diversi studi riportano infatti mutazioni sia in diverse famiglie con manifestazioni di dolore episodico alle estremità ma anche in un'unica famiglia affetta da iperalgia da freddo<sup>71-73</sup>. Mutazioni dell'isoforma Nav1.9 sono state identificate anche in pazienti con neuropatia dolorosa<sup>74,75</sup>.

# Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di MOH

## LA CEFALEA DA USO ECCESSIVO DI FARMACI

### Introduzione

La cefalea è un disturbo molto comune con una prevalenza stimata al 99% tra le donne e al 93% tra gli uomini<sup>76</sup>. In Europa si stima che circa il 53% della popolazione abbia sofferto di cefalea nell'ultimo anno<sup>77</sup>.

La cefalea è una patologia invalidante e ha conseguenze sia per chi ne è affetto sia per la società. Le persone che ne sono affette riferiscono effetti negativi sulle attività sociali e sui rapporti con la famiglia e gli amici<sup>78</sup>. La cefalea influisce anche sulla capacità lavorativa. Un'ampia percentuale dei pazienti afferma di avere difficoltà a lavorare a tempo pieno a causa della patologia<sup>79</sup>. Nel tentativo di calcolare il carico globale della malattia, i disturbi della cefalea sono stati inclusi tra le 10 condizioni più invalidanti al mondo<sup>80</sup>. In una recente stima della misura in cui le risorse economiche vengono perse a causa delle cefalee, il costo annuale per la cefalea tra gli adulti di età compresa tra 18 e 65 anni nell'UE è stato stimato a 173 miliardi di euro<sup>81</sup>.

Con la terminologia generale di cefalea, ci si riferisce in realtà a diversi tipi di patologia. L'International Headache Society (IHS) ha sviluppato un sistema di classificazione, *l'International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (ICHD-III)*<sup>82</sup>. Il sistema è un insieme di linee guida, utilizzato per la classificazione della cefalea sia nella pratica clinica che nella ricerca.

I diversi tipi di cefalea possono essere suddivisi in due categorie, a seconda della frequenza con cui si manifestano, ovvero cefalee episodiche e cefalee croniche quotidiane. Le cefalee episodiche sono cefalee che si verificano in attacchi distinti e ricorrenti, al contrario delle cefalee croniche quotidiane (CDH), in cui gli attacchi di cefalea si manifestano con una maggior frequenza<sup>83,84</sup>.

## Cefalee episodiche primarie

Le cefalee primarie sono cefalee che esistono indipendentemente da altre condizioni mediche, mentre le cefalee secondarie sono cefalee causate da qualche condizione di fondo<sup>85</sup>. Le cefalee episodiche sono cefalee che si manifestano in attacchi distinti e ricorrenti. Le cefalee episodiche primarie sono quindi cefalee che esistono indipendentemente da altre condizioni mediche e si manifestano in attacchi ricorrenti. I due tipi più comuni sono l'emicrania e la cefalea di tipo tensivo (TTH)<sup>77</sup>.

### Emicrania

L'emicrania è un disturbo ereditario, cronico, con attacchi ricorrenti di cefalea grave<sup>86</sup>. Gli attacchi sono solitamente caratterizzati da cefalea unilaterale pulsante di intensità medio-grave, nausea e aumentata sensibilità agli stimoli sensoriali, come la luce (fotofobia) e il suono (fonofobia)<sup>85</sup>. Un attacco di emicrania abituale dura tra le 4 e le 72 ore con una frequenza media di 1-3 attacchi al mese. Gli attacchi possono essere scatenati da fattori come lo stress, i disturbi del sonno, alcuni tipi di cibo e così via<sup>87</sup>.

Una recente revisione ha concluso che la prevalenza media dell'emicrania in Europa è del 15%. L'emicrania è più comune nelle donne (12-25%) che negli uomini (5-9%)<sup>77,88</sup>. Gli attacchi di emicrania nelle donne sono generalmente più lunghi di quelli negli uomini e le donne soffrono più frequentemente nausea e vomito associati agli attacchi<sup>89</sup>. Sia tra le donne che tra gli uomini, la prevalenza è più alta tra i 20 e i 50 anni<sup>90</sup>. L'emicrania è più comune tra le persone con un reddito e un livello di istruzione più bassi che tra la popolazione generale<sup>91</sup>. Si tratta di una patologia sotto-diagnosticata, come dimostra uno studio che ha dimostrato che solo il 26% delle persone con emicrania in Italia ha avuto una precedente diagnosi di emicrania da un medico<sup>92</sup>.

L'emicrania è gravemente invalidante per chi ne è affetto durante gli attacchi, ma tra un attacco e l'altro è di solito completamente priva di sintomi fisici<sup>93</sup>. Tuttavia, a causa dell'incapacità di prevedere il prossimo attacco, molte persone con emicrania vivono in uno stato di costante preoccupazione. Queste paure si trasformano spesso in ansia, e molti emicranici vivono quindi di fatto con una disabilità cronica<sup>94</sup>. L'emicrania influisce sulla qualità della vita, tanto che le persone che ne soffrono hanno una qualità di vita ridotta in termini di salute rispetto ad individui sani<sup>95</sup>, così come rispetto ad individui con altre malattie croniche come il diabete, l'ipertensione, la depressione e l'osteoartrite<sup>96</sup>.

L'emicrania comporta anche notevoli costi per la società, in particolare costi indiretti dovuti all'aumento delle assenze per malattia e alla ridotta produttività sul lavoro<sup>77,97</sup>.

### Cefalea di tipo tensivo

La cefalea di tipo tensivo (TTH) è un altro tipo di cefalea episodica primaria. È caratterizzata da un dolore bilaterale, pressante, di intensità da lieve a moderata. La cefalea non è associata a caratteristiche tipiche dell'emicrania come il vomito o la sensibilità sia al suono che alla luce, e tipicamente non è aggravata dall'attività fisica<sup>85</sup>.

La cefalea di tipo tensivo è il tipo di cefalea più diffuso in tutte le fasce d'età in tutto il mondo<sup>98</sup>. La prevalenza nel corso della vita varia notevolmente, a seconda del metodo di studio, ma di solito è riportata nell'intervallo 60-90%<sup>76,99</sup>. La cefalea di tipo tensivo è leggermente più comune tra le donne che tra gli uomini in tutte le fasce di età, con un rapporto maschio-femmina compreso tra 1:1 e 3:1. In entrambi i sessi, la prevalenza raggiunge picchi tra i 30 e i 39 anni e diminuisce con l'aumentare dell'età<sup>23</sup>.

Per l'individuo, il carico di malattia è meno grave che nell'emicrania, ma a causa del gran numero di persone colpite, il carico globale di TTH è presumibilmente superiore a quella dell'emicrania<sup>80</sup>.

### Cefalea cronica quotidiana

La cefalea cronica quotidiana (CDH) è una descrizione collettiva delle cefalee che si manifestano molto frequentemente<sup>85</sup>. Più recentemente, il termine è stato ridefinito e viene solitamente interpretato come cefalea che si manifesta almeno 15 giorni/mese negli ultimi 3 mesi<sup>100</sup>. Si noti, tuttavia, che la CDH non è una diagnosi formale e non compare nella ICHD-II<sup>85</sup>.

Circa il 4% della popolazione adulta è affetta da CDH<sup>101</sup>. Il disturbo è circa due volte più comune tra le donne che tra gli uomini, e la prevalenza sembra essere relativamente costante per tutta la durata della vita adulta<sup>102</sup>. La prevalenza relativamente costante del CDH è in contrasto con il modello visto con l'emicrania episodica e, in misura minore, il TTH, entrambi i quali tendono a diventare meno prevalenti con l'aumentare dell'età<sup>90</sup>. La prevalenza di CDH è inversamente associata al livello di istruzione<sup>102</sup>.

Le cefalee croniche giornaliere possono essere classificate come primarie o secondarie<sup>103</sup>, (vedi Tab.1). Il CDH primario esiste indipendentemente da altre condizioni mediche, e i due tipi più prevalenti sono il TTH cronico e l'emicrania cronica<sup>88,104</sup>. La CDH secondaria è

causata da qualche altra condizione di fondo, per esempio trauma cranico, disturbi della colonna cervicale, disturbi vascolari o uso eccessivo di farmaci per la cefalea acuta. La cefalea cronica quotidiana associata all'uso eccessivo di farmaci per la cefalea acuta è chiamata cefalea da uso eccessivo di farmaci (MOH)<sup>105</sup> e sarà discussa nella prossima sezione.

### Il ruolo del sistema trigemino-vascolare

La patofisiologia alla base dell'attacco di cefalea è complessa e coinvolge l'interazione di differenti componenti del sistema nervoso centrale e del distretto cranico, che costituiscono il sistema trigemino-vascolare.

Le fibre C non-mie linizzate e le fibre mie linizzate A $\delta$  di piccolo calibro costituiscono la parte periferica di questo sistema ed innervano le meningi e i vasi sanguigni. Le terminazioni contengono differenti peptidi implicati nella patofisiologia emicranica, tra cui CGRP, PACAP e VIP, e rappresentano le diramazioni periferiche dei neuroni del ganglio trigeminale (neurone di I° ordine del STV)<sup>106</sup>. Il ganglio trigeminale non è protetto dalla barriera ematoencefalica e ciò ha assunto una notevole importanza, in quanto il ganglio trigeminale è stato identificato come possibile sito di azione dei nuovi ed efficaci farmaci antiemicranici, gli anticorpi monoclonali anti-CGRP, la cui diffusione è fortemente limitata dalla barriera ematoencefalica, principalmente a causa della loro dimensione e del loro peso molecolare. I prolungamenti centrali dei neuroni trigeminali convergono a livello del tronco cefalico dove si trovano i nuclei trigeminali (nucleo trigeminale spinale) ed il complesso trigemino-cervicale (TCC, costituisce i neuroni di secondo ordine del sistema) che rappresenta una stazione fondamentale del sistema trigemino vascolare, in quanto costituisce la connessione tra la porzione periferica e la parte all'interno del sistema nervoso centrale<sup>107</sup>. Dal TCC si sviluppano proiezioni verso il talamo (neuroni di III° ordine). Inoltre, è da sottolineare come da questa "stazione" del sistema trigemino vascolare originino differenti proiezioni verso varie strutture di particolare importanza quali l'ipotalamo, la sostanza grigia periacqueduttale, il locus ceruleus e i gangli della base<sup>108</sup>. Infine, il sistema trigeminovascolare è caratterizzato da proiezioni che dal talamo vanno ad innervare la regione corticale, principalmente la corteccia somatosensitiva primaria e secondaria, quella motoria e quella visiva e uditiva<sup>109</sup>.

## Uso di farmaci nella cefalea

I farmaci sono oggi la modalità di trattamento più comune nell'assistenza sanitaria.

La cefalea non fa eccezione; la maggior parte delle persone con cefalea utilizza farmaci per il trattamento, sia su prescrizione medica che preparati da banco<sup>110</sup>. Le persone affette da cefalea possono usare sia farmaci per il trattamento della fase acuta, ovvero l'attacco emicranico, che profilattici per gestire il loro disordine. La cefalea può anche essere trattata e prevenuta con metodi non farmacologici<sup>111</sup>, ma questi esulano dall'ambito di questa tesi.

### Farmaci per il trattamento della fase acuta

Secondo le linee guida cliniche della European Federation of Neurological Societies (EFNS) Task Force<sup>112</sup>, analgesici orali (acido acetilsalicilico, ibuprofene, naprossene, diclofenac e paracetamolo), e triptani (almotriptan, eletriptan, frovatriptan, naratriptan, rizatriptan, sumatriptan e zolmitriptan) sono farmaci di prima scelta per il trattamento acuto dell'emicrania. Anche gli alcaloidi dell'Ergot possono essere utilizzati, ma sono considerati meno efficaci. Gli oppioidi, nonostante il loro potere analgesico, non sono raccomandati per il trattamento dell'emicrania. In occasione di attacchi di emicrania particolarmente severi, la somministrazione di ASA per via endovenosa o sumatriptan sottocutaneo sono farmaci di prima scelta<sup>112</sup>.

L'elenco dei farmaci essenziali dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) comprende solo analgesici (acido acetilsalicilico, ibuprofene e paracetamolo) per il trattamento acuto dell'emicrania<sup>113</sup>. Nonostante sia stato suggerito, nel corso degli anni, l'inserimento dei triptani in questo elenco<sup>80</sup>, la commissione dell'OMS non ha accolto la richiesta, basandosi sulla meta-analisi di tre studi clinici randomizzati che hanno concluso che l'acido acetilsalicilico è efficace quanto i triptani nel trattamento degli attacchi di emicrania<sup>114</sup>. Una meta-analisi ancora più recente su sei studi randomizzati controllati, ha concluso che l'acido acetilsalicilico deve essere considerato come trattamento di prima scelta sia per l'emicrania che per la TTH, indipendentemente dall'intensità del cefalea<sup>115,116</sup>.

Per il trattamento acuto della TTH, gli analgesici semplici sono i farmaci di prima scelta, e gli analgesici combinati contenenti caffeina sono farmaci di seconda scelta<sup>117</sup>. I triptani e gli alcaloidi della segale cornuta sono utilizzati principalmente per il trattamento dell'emicrania e non sono efficaci nel TTH.

I triptani si caratterizzano per una serie di effetti collaterali transitori e di lieve intensità quali disturbi gastrointestinali, arrossamento del volto, dolori muscolari e di costrizione nella zona toracica, torpore e sonnolenza.

I triptani sono controindicati in quei pazienti con anamnesi di patologie cardiovascolari, in quanto capaci di indurre vasocostrizione coronarica. Nei pazienti senza questo tipo di patologie l'effetto dei triptani sulla componente vasomotoria a livello coronarico è marginale: questo si spiega ricordando che si tratta di agonisti selettivi per il recettore serotoninergico 5HT<sub>1B</sub> e il tono coronarico è solo parzialmente interessato dall'attività di questo recettore.

In Italia i triptani non sono disponibili come farmaci da banco e vengono venduti rigorosamente dietro prescrizione medica. Contrariamente in altri Paesi europei è possibile acquistare compresse di sumatriptan e lo spray nasale zolmitriptan senza prescrizione medica. Da notare che, in relazione a decisioni simili riguardanti i triptani, nel Regno Unito e in Germania, è stato sottolineato il rischio di un aumento dell'uso eccessivo di farmaci<sup>118</sup>. L'utilizzo eccessivo di triptani, ma anche di altri farmaci antiemicranici per il trattamento della fase acuta, può indurre lo sviluppo di un tipo di CDH chiamata cefalea da rimbalzo o cefalea da abuso di farmaci (MOH)<sup>119</sup>. Per questo motivo, ci sono raccomandazioni rigorose sul numero di assunzioni massimo per ogni tipologia di farmaco<sup>120</sup>:

- Triptani, alcaloidi della segale cornuta, oppioidi (da soli o in combinazione con analgesici) non dovrebbero essere assunti per più di 10 giorni/mese
- Gli analgesici come i FANS non dovrebbero essere assunti per più di 15 giorni/mese.

Tutto ciò che supera queste limitazioni (per un periodo superiore ai 3 mesi) è considerato come uso eccessivo. Raccomandazioni diverse a seconda della classe farmaceutica si devono al differente potenziale nell'indurre la MOH<sup>121</sup>.

Per i pazienti che soffrono attacchi emicranici con una frequenza superiore ai 15 giorni al mese, sono indicate strategie diverse dal solo utilizzo di farmaci antiemicranici acuti, proprio al fine di evitare il superamento dei limiti raccomandati. Tali strategie includono trattamenti non farmacologici (colloqui psicologici individuali, tecniche di rilassamento muscolare progressivo e l'apprendimento di esercizi respiratori). Tuttavia, circa il 3-4% della popolazione soffre di cefalea per 15 giorni al mese o più <sup>77</sup>, trovandosi quindi ad affrontare questo tipo di problema.



Molto probabilmente, vari fattori influenzano il circolo vizioso che si crea tra cefalea e uso eccessivo di farmaci, come la pressione legata al lavoro, le esigenze sociali e la percezione di limitate opzioni non farmacologiche per controllare la cefalea stessa.

A riprova di ciò, uno studio danese ha evidenziato come le giovani donne affette da emicrania utilizzino gli analgesici non solo in relazione alla patologia, ma anche per alleviare l'ansia che ne consegue, in relazione alla possibilità di perdere le attività sociali<sup>122</sup>.

### L'uso eccessivo di farmaci

Sebbene la maggior parte dei ricercatori consideri l'associazione causale tra l'uso eccessivo di farmaci per la sintomatologia acuta della cefalea e il successivo sviluppo del MOH come un fatto assodato, questa tesi è ancora oggetto di dibattito, in particolar modo se l'uso eccessivo di questi farmaci sia effettivamente una causa di CDH, o viceversa se l'uso eccessivo si verifichi in quegli individui che si trovano già in una fase di sviluppo della CDH indotta da altri fattori<sup>123,124</sup>.

Uno studio longitudinale sulla popolazione condotto in Norvegia si occupa di questa associazione<sup>125</sup>. In questo studio, è risultato che chi utilizza analgesici con frequenza quotidiana o settimanale, ha un rischio maggiore di aver sviluppato la CDH al follow-up 11 anni dopo. Gli autori hanno così concluso che l'uso eccessivo di farmaci per il trattamento acuto dell'emicrania, poteva essere un indicatore del futuro sviluppo della CDH nella popolazione. Tuttavia, poiché le informazioni sullo stato della cefalea non sono state raccolte all'inizio dello studio, non è possibile escludere che l'uso frequente di analgesici fosse semplicemente un indicatore di cefalea frequente. L'associazione tra cronicizzazione della cefalea e l'utilizzo eccessivo di farmaci è stata comunque replicata in diversi altri studi<sup>126-128</sup>. I ricercatori hanno dimostrato che tra le persone con emicrania episodica, l'aumento dell'frequenza di assunzione di farmaci antiemicranici era associato all'aumento del rischio di sviluppare CDH. Nei modelli multivariati, le frequenze sia della cefalea che dell'uso di farmaci erano predittori indipendenti per lo sviluppo della CDH. Tra i farmaci utilizzati in eccesso, gli oppioidi costituivano il fattore di rischio maggiore.

La MOH si sviluppa a partire da disturbi episodici primari della cefalea, come l'emicrania o il TTH<sup>129</sup>. Circa due terzi dei pazienti con MOH hanno avuto l'emicrania come cefalea primaria, un terzo dei pazienti ha avuto TTH, e solo una piccola frazione ha avuto altre

cefalee<sup>129-131</sup>. L'uso eccessivo di farmaci non sembra causare cefalea in individui senza un disturbo cefalalgico preesistente. Quando gli analgesici sono stati usati quotidianamente per il dolore reumatico, non hanno causato CDH in individui senza disturbi cefalalgici preesistenti. Al contrario, gli analgesici sono stati un forte fattore di rischio per il CDH nei soggetti con emicrania preesistente<sup>132</sup>. La ricerca effettuata da Wilkinson et al. ha evidenziato come tra i pazienti che utilizzano quotidianamente oppiacei per il trattamento di problemi di motilità intestinale, esclusivamente quelli con una preesistente cefalea di tipo primario sviluppino la CDH<sup>133</sup>. Il fatto che l'uso quotidiano di analgesici possa portare a CDH nei soggetti sensibili, anche quando i farmaci sono utilizzati per indicazioni diverse dalla cefalea, rafforza l'evidenza di un'associazione causale tra l'uso eccessivo di farmaci e il successivo sviluppo CDH.

Inoltre, in uno studio controllato con placebo è stato dimostrato un temporaneo peggioramento dopo il ritiro del farmaco acuto, e questo indica anche che l'uso eccessivo del farmaco possa essere un fattore causale. La maggior parte dei pazienti che si sottopongono alla terapia di astinenza sperimentano un miglioramento significativo della cefalea<sup>134,135</sup>.

L'uso eccessivo di oppioidi o barbiturici costituisce il fattore di rischio maggiore, seguito da triptani e FANS. Inoltre, la frequenza di assunzione necessaria allo sviluppo di CDH varia per le diverse classi di farmaci (5 giorni/mese per i barbiturici, 8 giorni/mese per gli oppioidi, 10 giorni/mese per i triptani, e solo in situazioni specifiche per i FANS)<sup>136</sup>.

Nonostante non tutti i pazienti con cefalea episodica e abuso di farmaci sviluppino CDH, e non tutti i casi di CDH siano causati dall'abuso di farmaci, nessuno dei due fatti nega il rapporto di causalità. I dati presentati nei differenti studi suggeriscono che esiste effettivamente una relazione causale tra l'uso eccessivo di farmaci per acuti e il conseguente sviluppo di CDH.

### Cefalea da uso eccessivo di farmaci

#### Classificazione

La cefalea da uso eccessivo di farmaci (MOH) è un tipo di CDH che si sviluppa in individui con cefalea primaria che fanno un uso eccessivo di farmaci per il trattamento acuto<sup>137</sup>. L'evidenza che un uso eccessivo di farmaci per la cefalea potesse portare ad una

cronicizzazione della cefalea, è stata presentata per la prima volta da Peters e Horton negli anni '50, quando descrissero la cefalea cronica in pazienti con emicrania che usavano frequentemente l'ergotamina<sup>138,139</sup>. Nei loro studi descrissero anche che la CDH scompariva in seguito all'interruzione dell'assunzione di ergotamina da parte del paziente. In questi primi studi, la MOH venne principalmente associata all'uso eccessivo di derivati dell'ergotamina, venendo quindi indicata come *cefalea da ergotamina*. La prima classificazione dell'International Headache Society (IHS), nel 1988, introdusse il termine *cefalea indotta da farmaci*, definendola come una cefalea cronica in pazienti con emicrania o TTH a seguito di un uso eccessivo (assunzione di analgesici o ergotamina per 15 giorni o più al mese, per almeno 3 mesi) di farmaci per la cefalea, e la scomparsa entro 1 mese dalla sospensione<sup>140</sup>.

L'introduzione dei triptani, negli anni '90, ha aperto una nuova era nel trattamento dell'emicrania. Furono ampiamente utilizzati e ben presto divenne evidente che molti pazienti ne facessero un uso eccessivo<sup>141-143</sup>. Successivamente venne dimostrato che l'assunzione di triptani, anche per 10 giorni/mese, poteva indurre l'MOH<sup>144</sup>.

Oggi, l'opinione generale è che tutti i farmaci per il trattamento della cefalea acuta possano causare MOH in persone con una preesistente cefalea primaria<sup>119</sup>.

La seconda versione della classificazione dell'IHS (ICHD-II) ha introdotto il termine MOH e ha ridotto la soglia critica per l'assunzione dei triptani a 10 giorni/mese<sup>85</sup>. Tuttavia secondo questi criteri la diagnosi di MOH può essere stabilita solo retrospettivamente, dopo che in seguito alla terapia di astinenza, il paziente mostra un miglioramento significativo<sup>145</sup>. Nel 2006, l'IHS ha quindi pubblicato nuovi criteri in appendice, introducendo un concetto più ampio di MOH, che non richiedeva più un miglioramento della cefalea dopo l'astinenza, ma semplicemente la contemporaneità tra CDH e l'utilizzo eccessivo di farmaci antiemicranici acuti (Tabella 2). Tuttavia, l'evidenza del miglioramento del paziente in seguito all'interruzione dell'assunzione del farmaco antiemicranico è una prova fondamentale per confermare la diagnosi di MOH. La percentuale di pazienti che migliorano dopo l'astinenza varia notevolmente tra uno studio e l'altro, ma generalmente è compresa tra il 50% e l'80%<sup>146</sup>.

ICHD-II	ICHD-IIR	ICHD-3 beta
<p>A. Headache present on <math>\geq 15</math> days/month fulfilling criteria C and D</p> <p>B. Regular overuse for <math>&gt;3</math> months of <math>\geq 1</math> drugs that can be taken for acute and/or symptomatic treatment of headache</p> <p>C. Headache has developed or markedly worsened during medication overuse</p> <p>D. Headache resolves or reverts to its previous pattern within 2 months after discontinuation of overused medication</p>	<p>A. Headache present on <math>\geq 15</math> days/month</p> <p>B. Regular overuse for <math>&gt;3</math> months of <math>\geq 1</math> acute/symptomatic treatment drugs:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ergotamine, triptans, opioids or combination analgesic medications on <math>\geq 10</math> days/month on a regular basis for <math>&gt;3</math> months</li> <li>2. Simple analgesics or any combination of ergotamine, triptans, or analgesics or opioids on <math>\geq 15</math> days/month on a regular basis for <math>&gt;3</math> months without overuse of any single class alone</li> </ol> <p>C. Headache has developed or markedly worsened during medication overuse</p>	<p>A. Headache occurring on <math>\geq 15</math> days/month in a patient with a pre-existing headache disorder</p> <p>B. Regular overuse for <math>&gt;3</math> months of <math>\geq 1</math> drugs that can be taken for acute and/or symptomatic treatment of headache</p> <p>C. Not better accounted for by another ICHD-3 diagnosis</p>

MOH: medication-overuse headache; ICHD: International Classification of Headache Disorders (II: second edition; IIR: second edition revised; 3 beta: third edition beta version).

Tabella 2 - Evoluzione dei criteri diagnostici dell'MOH

## Epidemiologia

Studi sull'MOH condotti sulla popolazione adulta in diversi paesi hanno riportato una prevalenza di circa l'1-2%<sup>129,147-149</sup>. L'incidenza dell'MOH è di 0,72 per 1.000 anni di persona (95% CI 0,62-0,81)<sup>150</sup>, ed è la terza diagnosi di cefalea più comune nella pratica clinica negli Stati Uniti<sup>151</sup>.

L'MOH è più comune nelle donne che negli uomini, con un rapporto uomo/donna compreso tra 1,4 e 2,0<sup>147,152</sup> e si caratterizza per un'insorgenza precoce rispetto ad altri tipi di cefalea cronica. Altri fattori, quali il fumo e l'inattività fisica raddoppiano il rischio di MOH.

Studi provenienti dalla Norvegia e dalla Turchia hanno dimostrato che la CDH è più diffuso tra coloro che hanno generalmente un basso livello di istruzione e status socio-economico basso<sup>153,154</sup>.

## Impatto economico dell'MOH

La cefalea da uso eccessivo di farmaci è un problema di salute pubblica che ha sia implicazioni per la vita quotidiana delle singole persone sia di tipo economico per l'intera società. In una recente stima dell'impatto economico di questa in Europa, il costo medio annuo per persona affetta da MOH è stato calcolato in 3.561 euro<sup>81</sup>, superiore ai costi corrispondenti calcolati per le cefalee episodiche, come l'emigrania e la cefalea di tipo tensivo (tension type headache, TTH). La qualità generale della vita di individui affetti da MOH è più bassa che per gli individui affetti da cefalea episodica<sup>155</sup>.

Potenziabili complicazioni fisiologiche secondarie sottolineano anche l'MOH come un importante problema di salute. Queste complicanze sono principalmente effetti collaterali ascrivibili all'uso eccessivo dei farmaci, come ad esempio i rischi di insufficienza renale (in casi in cui si abusa di più farmaci analgesici) o di danno a livello epatico (FANS)<sup>156</sup>.

### Basi molecolari della MOH

La fisiopatologia della MOH è, ad oggi, quasi completamente sconosciuta<sup>157</sup>. Sulle possibili cause alla base di questa patologia sono state fatte varie ipotesi, tra cui cambiamenti neurofisiologici, fattori ereditari e variazioni delle funzioni endocrine e dei neurotrasmettitori, così come fattori di tipo psicologico<sup>158,159</sup>. Tra i fattori di tipo psicologico che possono aiutare a spiegare il circolo vizioso che si instaura nell'MOH tra gli attacchi di cefalea e l'abuso di farmaci, vi sono ad esempio, la paura anticipatrice del dolore, le pressioni esterne, la tossicodipendenza e la comorbidità psichiatrica<sup>160-162</sup>.

Finora sono stati fatti molti sforzi per comprendere le alterazioni a livello molecolare che stanno alla base della patogenesi della MOH<sup>163</sup>. Al momento sono state avanzate 2 differenti ipotesi<sup>157</sup>. La prima si basa sull'uso compulsivo di farmaci per la cefalea mostrato in alcuni pazienti che hanno sviluppato la MOH e considera quindi la patologia come una dipendenza da rimedi sintomatici per la cefalea<sup>164,165</sup>. Secondo questa ipotesi quindi, alla base vi sarebbero la disfunzione delle classiche vie del sistema nervoso centrale di ricerca della ricompensa e la tossicodipendenza. Una seconda ipotesi pone al centro dell'attenzione il processo di sensibilizzazione neurale. Quest'ultima si verificherebbe come conseguenza diretta dell'abuso di farmaci, inducendo adattamenti del sistema trigemino-vascolare, che faciliterebbero a loro volta la trasmissione del dolore e una sensibilizzazione latente<sup>166</sup>. In linea con questa interpretazione, il lavoro svolto in modelli preclinici di MOH, sviluppati nei roditori, suggeriscono che l'iper-espressione del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP) e dell'ossido nitrico (NO) sono responsabili dei processi di sensibilizzazione da un uso eccessivo di triptani<sup>167-170</sup>. Tuttavia, non è ancora noto se questi effetti possano essere causati anche da altri farmaci per il trattamento acuto della cefalea, diversi dai triptani e soprattutto, se possano essere rappresentativi, quindi utilizzati come indicatori, dei riarrangiamenti neurofisiologici che sono alla base della MOH.

### Trattamento e prognosi

L'interruzione dell'assunzione del farmaco antiemigranico (o una forte riduzione dell'assunzione a meno di 10 assunzioni mensili) è la sola terapia raccomandata per il trattamento dell'MOH<sup>159</sup>. L'obiettivo del trattamento di astinenza è principalmente quello di disintossicare il paziente e contemporaneamente di ripristinare l'efficacia del farmaco antiemigranico.

Uno studio ha confrontato i risultati di tre diverse procedure per la terapia di astinenza evidenziando pari efficacia tra programmi standard di disintossicazione ambulatoriale, ospedaliera e una efficace educazione medica del paziente sulla necessità di interrompere l'uso eccessivo del farmaco<sup>171</sup>. I sintomi causati dall'interruzione improvvisa (principalmente peggioramento della cefalea preesistente, nausea e ansia) di solito si attenuano dopo 2-10 giorni, ma possono persistere fino a 4 settimane. La maggior parte dei pazienti sperimenta, in seguito a questo periodo, una significativa riduzione della frequenza del cefalea<sup>134</sup>.

Se la terapia ha successo, può sorgere un altro problema comune, ovvero, quello di una ricaduta; il tasso di ricaduta ad un anno dal termine della terapia è di circa il 25%, indipendentemente dal tipo di terapia di astinenza utilizzata<sup>137</sup>.

### Emicrania ed epigenetica

È sempre più chiaro che i processi epigenetici svolgono un ruolo importante in una grande varietà di patologie multifattoriali<sup>172,173</sup>. Le principali modifiche epigenetiche sono catalizzate da enzimi che comprendono le deacetilasi istoniche (HDAC), le acetiltrasferasi istoniche (HAT) e le metiltrasferasi del DNA (DNMT). Le modifiche epigenetiche possono essere dinamiche, ma possono anche essere ereditate. Pertanto, i processi epigenetici consentono la regolazione cellulare e quella dello stadio di sviluppo specifico dell'espressione genica, ma svolgono anche un ruolo importante nella programmazione di risposte durature agli stimoli ambientali.

A questo proposito è ormai noto che, parimenti ad una chiara componente genetica, i fattori ambientali probabilmente contribuiscono in egual misura al rischio di sviluppare l'emicrania<sup>174</sup>. Questi fattori possono scatenare direttamente gli attacchi di emicrania (i cosiddetti *triggers*) o abbassare la soglia di attacco, rendendo il cervello più suscettibile ad altri fattori scatenanti. Tra i fattori capaci di influenzare la frequenza degli attacchi di

emicrania è ormai acclarato che vi siano gli ormoni sessuali femminili, dato che l'emicrania colpisce due/tre volte di più le donne rispetto agli uomini, ed è influenzata dal ciclo mestruale e dalla gravidanza, così come dai contraccettivi ormonali<sup>175</sup>. Ad ulteriore riprova, la menopausa, con la sua ridotta produzione di estrogeni e progesterone, è associata ad un calo della frequenza degli attacchi di emicrania<sup>176</sup>.

La depressione e l'epilessia sono due disturbi che mostrano una comorbilità bidirezionale con emicrania. È interessante notare che la depressione condivide anche fattori modulatori con l'emicrania, come appunto gli ormoni femminili e lo stress cronico, che è un fattore di rischio accertato per la depressione<sup>177</sup>.

La prova principale di un ruolo dei meccanismi epigenetici nella depressione viene dai modelli animali per il disturbo depressivo maggiore che mostrano grandi cambiamenti nella programmazione epigenetica dei geni correlati allo stress (per esempio, *Bdnf*) che potrebbero essere invertiti dal trattamento antidepressivo<sup>178,179</sup>.

Il contributo dell'epigenetica nell'epilessia è provato dall'elevata incidenza di questo disturbo nella sindrome di Rett e dal ritardo mentale dell' $\alpha$ -talassemia, due disturbi causati da mutazioni a carico di alcune proteine effettoriali epigenetiche<sup>180,181</sup>. Inoltre, nel cervello dei pazienti affetti da epilessia è stato misurato un aumento dei livelli di metilazione del DNA nella regione del promotore della *Reelin*<sup>182</sup>, un gene coinvolto nella plasticità cerebrale la cui espressione ridotta contribuisce alla patogenesi dell'epilessia<sup>183</sup>.

Pertanto, la comorbilità tra queste patologie e l'emicrania potrebbe indicare che anche in questa patologia vi possa essere una componente epigenetica.

Poiché i pazienti con emicrania che già di base hanno un'alta frequenza di attacchi emicranici hanno un rischio maggiore di sviluppare MOH e andare quindi verso una cronicizzazione dell'emicrania, è stato ipotizzato che gli attacchi di emicrania stessi potrebbero promuovere lo sviluppo di emicrania cronica<sup>184</sup>. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che l'attività neuronale sincrona, provoca cambiamenti nel pattern epigenetico dei geni coinvolti nella plasticità neuronale e nella neuroprotezione<sup>185-187</sup>. Questi risultati sono in accordo con l'evidenza che i meccanismi epigenetici sono coinvolti nella regolazione dell'attività sinaptica basale (cioè cambiamenti a lungo termine dei livelli di attività sinaptica)<sup>188</sup>. Quindi è plausibile che l'aumento dell'attività neuronale nell'emicrania possa indurre alterazioni nell'epigenoma cerebrale, promuovendo così i successivi attacchi di emicrania e la creazione di un circolo vizioso in cui la programmazione

epigenetica di geni e percorsi sottostanti eccitabilità sono alterati verso una linea di base più sensibile.



## IL CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE

### Introduzione

Il calcitonin gene-related peptide (CGRP) appartiene alla stessa famiglia di peptidi della calcitonina e della quale fanno parte altri importanti membri quali l'adrenomedullina e l'amilina<sup>189</sup>. Tutti i peptidi appartenenti a questa famiglia si caratterizzano per la presenza di un anello composto da sei aminoacidi (sette per la calcitonina) chiuso dall'estremità N-terminale, tramite un legame disolfuro. L'adrenomedullina e la CGRP sono vasodilatatori estremamente potenti e farmaci capaci di antagonizzare (gepanti e anticorpi) l'azione del CGRP sono farmaci chiave nella terapia dell'emicrania. L'adrenomedullina è un potente fattore angiogenico, infatti modelli preclinici quali i topi con deficit del gene AM non sono vitali, probabilmente a causa della ridotta formazione dei vasi sanguigni. L'amilina è importante per mantenere il controllo endogeno ed esogeno del carico di nutrienti e un analogo di questo peptide è attualmente commercializzato per il trattamento del diabete di tipo 1 e di tipo 2. La calcitonina ha un ruolo nella regolazione della concentrazione di calcio nel sangue ed è quindi utilizzata nel trattamento dell'osteoporosi. A causa della loro similarità a livello strutturale e negli effetti biologici è possibile che interagiscono con recettori accoppiati a proteine G a loro volta simili tra loro.

Il CGRP venne identificato per la prima volta nel 1982<sup>190</sup>. Si tratta del più potente vasodilatatore endogeno isolato a livello dei vasi cerebrali, ma è ampiamente distribuito sia nel sistema nervoso periferico che in quello centrale, a sostegno della teoria che l'azione vasodilatatoria non sia l'unica mediata da questo peptide di 37 aminoacidi. Differenti studi hanno infatti mostrato il ruolo di CGRP da un punto di vista nocicettivo ed infiammatorio ma anche nei processi di apprendimento e memoria e nella regolazione di appetito e sete<sup>191-193</sup>.

### Sintesi e struttura

Il CGRP viene sintetizzato grazie allo splicing alternativo dell'RNA del gene CALCA, codificante per la calcitonina e localizzato a livello del cromosoma 11<sup>190</sup>.

Il gene CALCA è espresso principalmente in due differenti tessuti, le cellule C della tiroide e in un sottogruppo di neuroni sensoriali primari.

Il pre-mRNA di calcitonina e CGRP subisce lo splicing alternativo in maniera tessuto dipendente: il messaggero maturo per la calcitonina è infatti predominante nelle cellule della tiroide, mentre quello del CGRP a livello ipotalamico e di vari altri tessuti<sup>194</sup>.

Il pre-mRNA comprende 6 esoni e viene processato diversamente in modo da conservare i primi 4 esoni a livello delle cellule c della tiroide per la sintesi della calcitonina, oppure di eliminare esclusivamente l'esone 4 per la sintesi del CGRP. Successivamente, il peptide CGRP subisce modificazioni post-traduzionali e l'azione di differenti proteasi che portano alla formazione del peptide maturo (Figura 6).

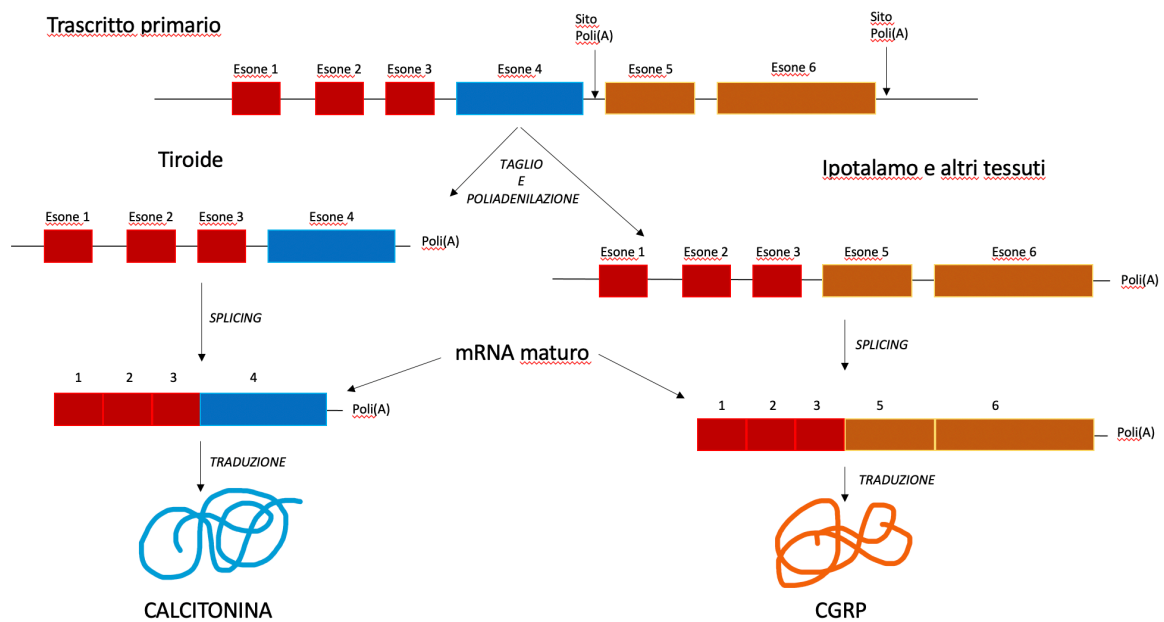


Figura 6 - Rappresentazione schematica del processo di splicing alternativo che avviene nel gene CALCA.

Tre anni più tardi, basandosi sulla sequenza del CGRP di ratto, venne identificato un peptide molto simile, chiamato  $\beta$ -CGRP, codificato da un gene, anch'esso situato nel cromosoma 11, chiamato CALCB. Tra i due peptidi vi è una differenza di tre aminoacidi nell'uomo e di solo un aminoacido nel ratto<sup>195,196</sup>.

L'organizzazione del gene CALCB è molto simile a quella del gene CALCA, a sostegno dell'ipotesi che si sia originato in seguito ad una duplicazione genica del gene che codifica per la calcitonina. Mentre l'esone numero uno non viene tradotto, l'esone numero due contiene la cosiddetta sequenza segnale, che è un breve peptide presente all'estremità N-terminale delle proteine appena sintetizzate e che sono destinate verso la via secretoria e l'esone numero tre, che ha un'omologia pari al 92% rispetto all'esone numero due del gene CALCA, codifica per il pro-peptide N-terminale. L'esone quattro di CALCB ha un'omologia

del 67% con la stessa regione del gene CALCA, ma la mancanza della poliadenilazione previene il meccanismo di splicing alternativo a cui è soggetto il pre-mRNA del gene CALCA, portando unicamente alla sintesi di  $\beta$ -CGRP<sup>197</sup>.

Entrambe le forme di CGRP contano 37 aminoacidi, costituenti una singola catena polipeptidica (Figura 7A)<sup>198</sup>.

In generale le due isoforme di CGRP sono espresse in maniera simile a livello di sistema nervoso centrale e periferico, ma alcuni specifici tessuti, quali i neuroni sensoriali primari o i neuroni enterici, regolano l'espressione delle due isoforme in maniera differente<sup>199</sup>.

L'  $\alpha$ CGRP ha un ruolo prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale e periferico mentre al  $\beta$ -CGRP viene attribuito un ruolo nella trasmissione neuronale enterica.

L'anello all'estremità amminica è coinvolto nella traduzione del segnale e nell'attivazione recettoriale. La struttura ad  $\alpha$ -elica è importante nell'interazione tra CGRP e recettore, infatti è stato dimostrato che la mancanza di questa struttura diminuisce di circa 100 volte l'affinità tra recettore e CGRP. Infine, la regione C-terminale si caratterizza per la capacità di legare debolmente il recettore, tuttavia è probabile che questa struttura sia necessaria affinché la molecola assuma la corretta conformazione<sup>200</sup>.

### Distribuzione del CGRP

Il CGRP e i suoi recettori sono ampiamente distribuiti nel sistema nervoso periferico e centrale, nonché nel sistema cardiovascolare<sup>201</sup>. In periferia, il CGRP è presente a livello delle cellule del corno posteriore del midollo spinale. Nei gangli sensoriali primari, CGRP è spesso co-immagazzinato con la sostanza P<sup>202</sup> e nei motoneuroni CGRP è co-immagazzinato con acetilcolina<sup>203,204</sup>.

Nel sistema cardiovascolare, le fibre nervose contenenti CGRP sono più abbondanti intorno alle arterie che intorno alle vene<sup>198</sup>; nel sistema arterioso, si vedono prevalentemente nella giunzione tra tonaca avventizia e tonaca media. Inoltre, le fibre nervose contenenti CGRP sono maggiormente presenti a livello atriale più che nei ventricoli; all'interno degli atri, sono localizzati nel nodo seno-atriale, nel nodo atrio-ventricolare e nel sistema di conduzione specifico. Inoltre, il miocardio è meno densamente innervato rispetto a epicardio, endocardio e pericardio<sup>205</sup>. Nella periferia, le fibre nervose contenenti CGRP sono spesso associate alla muscolatura liscia vascolare come:

- la maggior parte delle parti del tratto gastrointestinale, compresi i dotti escretori della ghiandola parotide, sull'epitelio delle ghiandole fundiche dello stomaco, le cellule endocrine di il duodeno e l'ileo e alcuni gangli mioenterici;
- polmone;
- tiroide (vicino alle cellule C);
- vena splenica e sinusoidi;
- pelle umana;
- ghiandola pituitaria <sup>206–208</sup>.

### Recettori del CGRP

I differenti effetti biologici del CGRP vengono mediati principalmente attraverso i suoi recettori.

Uno sviluppo cruciale nella scoperta del recettore del CGRP, a distanza di pochi anni dalla scoperta del peptide stesso, fu l'identificazione di una nuova famiglia di proteine transmembranarie, chiamate *receptor activity-modifying proteins* (RAMPs). È stato a lungo ritenuto che il recettore accoppiato a proteina G denominato *calcitonin-like receptor* (CLR) fosse il recettore del CGRP. Tuttavia, quando ne veniva indotta l'espressione in vitro, questo non risultava capace di arrivare sulla membrana cellulare e mediare gli effetti del CGRP (Figura 7B).

Sono state clonate tre proteine RAMP umane, identificate come RAMP1, RAMP2 (entrambi clonati da cellule SK-N-MC originate da tumore di Askin) e RAMP3 (clonata da cellule proveniente dalla milza) e conservano un'omologia di sequenza pari al 31% <sup>209</sup>.

Di notevole interesse è stata la scoperta che i recettori generati dai complessi tra CLR e differenti proteine RAMP mediano sia la farmacologia del CGRP sia di AM, che sino a quel momento era stata descritta in vari tessuti e linee cellulari <sup>209,210</sup>.

I recettori AM formati da CLR con RAMP2 o RAMP3 sono definiti rispettivamente come sottotipi AM1 e AM2 <sup>211</sup>.

Al contrario di quanto ritenuto inizialmente, il ruolo della proteina RAMP non è solo quello di veicolare la proteina CLR sulla membrana cellulare, ma insieme le due proteine hanno un ruolo centrale nel riconoscimento e nell'interazione con il CGRP.

Nel 1996 è stata descritta un'altra proteina di 146 amminoacidi che è stata clonata dall'organo del Corti di cavia e non condivide i classici sette domini transmembrana degli altri recettori descritti per la famiglia di peptidi CT. Questa proteina, chiamata "proteina componente del recettore" (RCP) non forma un sito di legame diretto per il CGRP, ma sembra avere un ruolo chiave del sistema di segnalazione del recettore CGRP agendo come una proteina periferica di membrana che facilita la segnalazione del recettore. Il significato fisiologico di questa proteina non è ancora chiaro e, rispetto al complesso principale costituito dall'associazione tra CLR e RAMP1, è scarsamente studiata.

Il legame tra CGRP e il suo recettore attiva la proteina Gs accoppiata che va a stimolare l'adenilato ciclasi (AC), la quale converte adenosina trifosfato (ATP) in adenosina monofosfato ciclica (cAMP). L'incremento nella concentrazione di cAMP porta alla attivazione della protein chinasi A (PKA).

Ulteriore effetto dell'attivazione della proteina Gs è quello della mobilitazione di calcio dalle riserve intracellulari all'interno del reticolo endoplasmatico.

L'attivazione della proteina G $\alpha$ q/11 infatti promuove l'attivazione della fosfolipasi C $\beta$ , che andando ad agire sul fosfatidil-inositolo 4,5-difosfato (un fosfolipide di membrana) genera i due secondi messaggeri inositolo-trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG). Mentre il DAG resta ancorato sul versante citosolico della membrana cellulare e attiva la protein chinasi C (PKC), IP3 va ad agire su recettori specifici presenti a livello del reticolo endoplasmatico, che promuovono l'efflusso di Ca<sup>2+</sup> nel citoplasma.

L'identificazione del frammento 8-37 di CGRP (CGRP8-37) come inibitore dell'attivazione AC indotta da CGRP umano nelle membrane plasmatiche del fegato di ratto costituisce primo strumento utile per caratterizzare da un punto di vista farmacologico i recettori del CGRP.

### Ruolo del CGRP nella patologia emicranica

Diversi studi hanno dimostrato che la stimolazione dei gangli trigeminali/nervi sensoriali rilascia CGRP, che dilata i vasi sanguigni cranici e stimola la trasmissione nervosa sensoriale<sup>212,213</sup>. È stato dimostrato come, durante gli attacchi emicranici spontanei, la concentrazione del CGRP aumenti a livello della vena giugulare esterna e come diminuisca in seguito alla somministrazione di triptani parallelamente al miglioramento sintomatologico. Antagonizzare il pathway del CGRP, inibendone il rilascio (in particolar

modo a livello trigeminale) o antagonizzandone l'azione sui propri recettori, è perciò stata intrapresa come strada promettente per la profilassi dell'emicrania <sup>212-214</sup>. Entrambe le strategie porterebbero alla prevenzione della vasodilatazione cranica, come dimostrato per i farmaci indicati per la sintomatologia acuta quali i triptani e i derivati dell'ergot <sup>215</sup>.

Gli antiemicranici acuti sono efficaci nel contrastare l'insorgenza dell'attacco emicranico attraverso due meccanismi principali, vale a dire:

- costrizione delle arterie craniche dilatate attraverso la stimolazione del recettore 5-HT1B<sup>215,216</sup>;
- inibizione del rilascio di CGRP e della trasmissione nocicettiva sui nervi sensoriali trigemini periferici e centrali attraverso i recettori 5-HT1B/1D <sup>212,217,218</sup> (Figura 7, C)

### Inibizione del rilascio di CGRP come strategia terapeutica

I vasi sanguigni cerebrali sono innervati dai nervi sensoriali che immagazzinano vari neuropeptidi, tra i quali il CGRP è il più abbondante<sup>219</sup>. Come discusso in precedenza, i triptani agiscono normalizzando i livelli elevati di CGRP a livello plasmatico, prevenendo l'attacco<sup>212</sup>. Anche se i triptani rappresentano un progresso significativo nella terapia dell'emicrania, sono inefficaci in alcuni pazienti e hanno limitazioni a causa dei loro potenziali effetti collaterali a livello cardiovascolare<sup>220,221</sup>. Inoltre, il trattamento con triptani non dovrebbe essere superiore ai 9 giorni al mese a causa del rischio di sviluppare la cosiddetta emicrania da rimbalzo o MOH. Pertanto, il miglioramento cruciale nella terapia anti emicranica sembrerebbe essere lo sviluppo di un farmaco senza effetti collaterali a carico del sistema cardiocircolatorio<sup>212</sup>, ma in grado di inibire il rilascio di CGRP a livello trigeminale.

Sulla base di ciò, potenzialmente il ruolo dei sottotipi del recettore  $\alpha_2$  e dei recettori dell'adenosina A1 nell'inibire il rilascio di CGRP può rivelarsi utile nello sviluppo di nuovi farmaci antiemicranici <sup>222,223</sup>. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato che un agonista selettivo del recettore A1 dell'adenosina, GR79236, inibisce la nocicezione a livello trigeminale e il rilascio di CGRP<sup>222,224</sup>.

Frammenti tronchi del CGRP stesso, come il CGRP (8-37), funzionano come antagonisti del recettore CGRP. Tuttavia, CGRP (8-37) si è dimostrato inefficace nel trattamento dell'emicrania a causa della sua bassa potenza e della sua breve emivita<sup>225,226</sup>.

Un importante passo avanti è stato lo sviluppo di potenti antagonisti del recettore CGRP, appartenenti alla classe dei gepanti.

Il telcegepant, il primo gepante assumibile per via orale, risulta ben tollerato dai pazienti emicranici affetti da disfunzione coronarica, ma presenta epatotossicità perciò la ricerca è avanzata verso lo sviluppo di anticorpi monoclonali diretti verso il CGRP o verso il suo recettore. Questi farmaci risultano in grado di inibire gli effetti del CGRP circolante prevenendo l'insorgenza dell'attacco emicranico, agendo ipoteticamente a livello del sistema trigeminale, non protetto dalla barriera ematoencefalica.

Gli effetti collaterali ascrivibili all'inibizione della segnalazione CGRP da parte di queste molecole sono rappresentati da epatotossicità e rischio cardiovascolare, a causa delle proprietà vasodilatatorie di CGRP.

Lo sviluppo di mAbs ha rappresentato un approccio completamente nuovo per inibire la via CGRP. Anche se la loro efficacia terapeutica può essere considerata simile a quella degli altri trattamenti farmacologici già utilizzati nella profilassi, il vantaggio nel loro utilizzo è quello di una migliore tollerabilità, grazie anche all'elevata specificità e selettività per il recettore del CGRP o per CGRP stesso<sup>227</sup>. I principali vantaggi da un punto di vista farmacocinetico degli mAbs sono rappresentati da una lunga emivita, eliminando quindi la necessità di somministrazioni giornaliere e una clearance mediante proteolisi. Questi anticorpi si caratterizzano per una scarsa biodisponibilità orale, pertanto è necessaria una via di somministrazione parenterale<sup>228</sup>.

Attualmente, ci sono quattro anticorpi approvati dalla Food and Drug Administration (FDA):

- eptinezumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il CGRP, è stato approvato nel Febbraio 2020 per il trattamento preventivo dell'emicrania negli adulti, ad una dose raccomandata di 100 mg ogni 3 mesi. Si tratta del primo anticorpo approvato per il trattamento dell'emicrania che deve essere somministrato endovena;
- fremanezumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il CGRP, è stato approvato nel settembre 2018, per il trattamento preventivo dell'emicrania, alle dosi raccomandate di 225 mg al mese o 675 ogni tre mesi. Nel gennaio 2020 è stato inoltre approvato il device che permette l'autoiniezione sottocute.
- galcanezumab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il CGRP, è stato approvato nel settembre 2018, per il trattamento preventivo dell'emicrania, alla

dose di 120 mg al mese, mediante autoiniezione per via sottocutanea. Nel gennaio 2019 è stato inoltre approvato per il trattamento della cefalea a grappolo alla dose di 300 mg.

- Erenumab, anticorpo monoclonale umano che lega il recettore del CGRP, è stato approvato nel maggio 2018, per il trattamento preventivo dell'emicrania negli adulti alla dose mensile di 140 mg per via sottocutanea<sup>229</sup>.



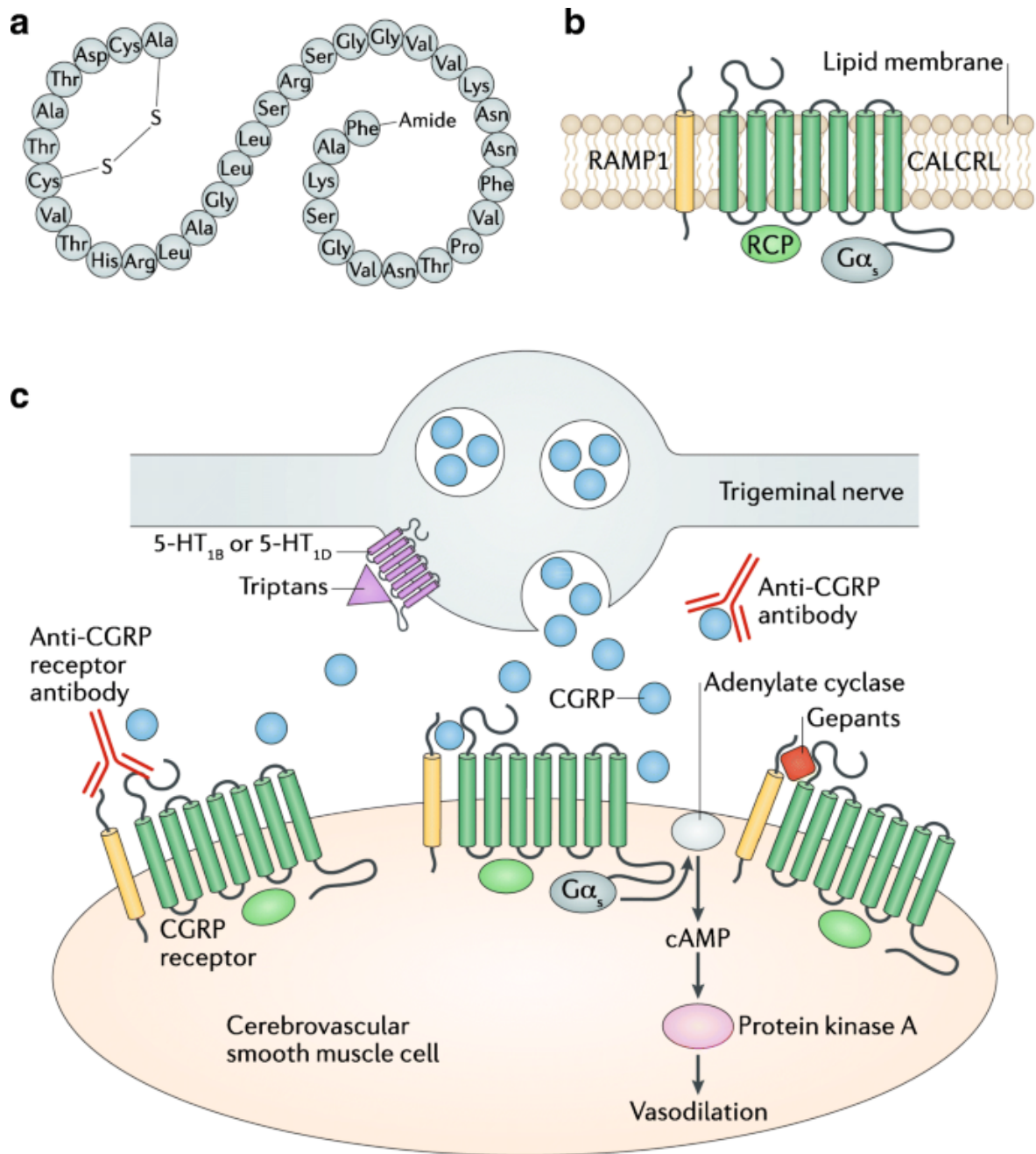


Figura 7 - Componenti della trasmissione CGRP e siti di azione dei farmaci antiemicranici. (a) Struttura amminoacidica dell' $\alpha$ -CGRP umano, (b) Il complesso del recettore CGRP, (c) siti d'azione dei farmaci utilizzati nella terapia dell'emicrania (Edvinsson L et al. Nat Rev Neurol. 2018;14:338-350).

# MODULAZIONE EPIGENETICA DELL'ESPRESSIONE GENICA

## Introduzione

L'espressione e la regolazione genica sono alla base dello sviluppo e della differenziazione cellulare, dando alla cellula la capacità di adattarsi alle diverse condizioni.

Trattandosi di un processo complesso, che prevede il coordinamento di eventi dinamici, la sua regolazione avviene a più livelli: il livello trascrizionale (inizio, allungamento e terminazione della trascrizione), il livello post-trascrizionale (traslocazione dell'RNA, splicing dell'RNA, stabilità dell'RNA), livello (inizio, allungamento e terminazione della traduzione) e livello post-traduzionale (splicing proteico, traslocazione, stabilità e modificazioni covalenti).

Le modificazioni di tipo epigenetico (dal greco ἐπί, epì, «sopra» e γεννητικός, gennitikòs, «relativo all'eredità familiare») rappresentano un tipo di regolazione dinamica della struttura della cromatina. Con il termine epigenetica ci si riferisce oggi a tutti quei processi capaci di alterare l'attività genica senza cambiare la sequenza del DNA, introducendo modificazioni ereditabili dalle cellule figlie.

Attualmente sono stati identificati molti tipi di processi epigenetici, tra cui metilazione, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e sumoilazione.

Le deacetilasi istoniche (HDAC) sono uno degli attori che regolano l'espressione genica attraverso la deacetilazione degli istoni e delle proteine non istoniche. Gli inibitori della deacetilasi dell'istone (HDACi) sono noti per alterare l'espressione genica attraverso sia l'induzione sia la repressione dei geni che codificano per le proteine nelle cellule normali e nelle cellule tumorali. Tuttavia, i meccanismi responsabili dell'attivazione e della repressione dell'espressione genica rimangono ancora sconosciuti.

## Organizzazione del genoma

Nelle cellule eucariotiche, il DNA genomico è strettamente associato alle proteine istoniche in unità note come nucleosomi. Questa struttura è l'unità di base della cromatina ed è composta da 147 coppie di basi di DNA avvolte intorno ad un ottamero istonico costituito da due molecole di ognuno dei quattro istoni del core (H2A, H2B, H3 e H4), che si organizzano in un tetramero centrale formato da H3 e H4, fiancheggiato da due

eterodimeri di H2A e H2B<sup>230</sup>. I nucleosomi sono separati tra loro da 10÷100 bp di DNA linker. Questa configurazione rappresenta il primo livello di organizzazione della cromatina. Ogni istone del core contiene sia un motivo globulare, C-terminale, altamente conservato, detto histone fold, e coda N-terminale, caratteristica per ogni tipo di istoni. Il dominio C-terminale prende parte ai processi di eterodimerizzazione specifica con un altro istone (H2A con H2B, H3 con H4) e a quelli di avvolgimento del DNA nucleosomiale. Viceversa, le code N-terminali, apparentemente non strutturate, protrudono all'esterno del nucleosoma sono implicate nell'organizzazione delle strutture cromatiniche di ordine superiore mediante l'interazione con altre proteine e nucleosomi. In aggiunta agli istoni costituenti il *core*, l'istone H1 funziona come proteina linker, che permette un ulteriore avvolgimento di circa 20÷30 bp di DNA. Benché la condensazione sia una proprietà intrinseca alla fibra nucleosomiale, la presenza di H1 favorisce la formazione del livello strutturale immediatamente superiore: l'insieme dell'ottamero istonico, dell'istone H1 e di due avvolgimenti di DNA viene indicato con il termine di cromatosoma (Figura 8)<sup>231</sup>.

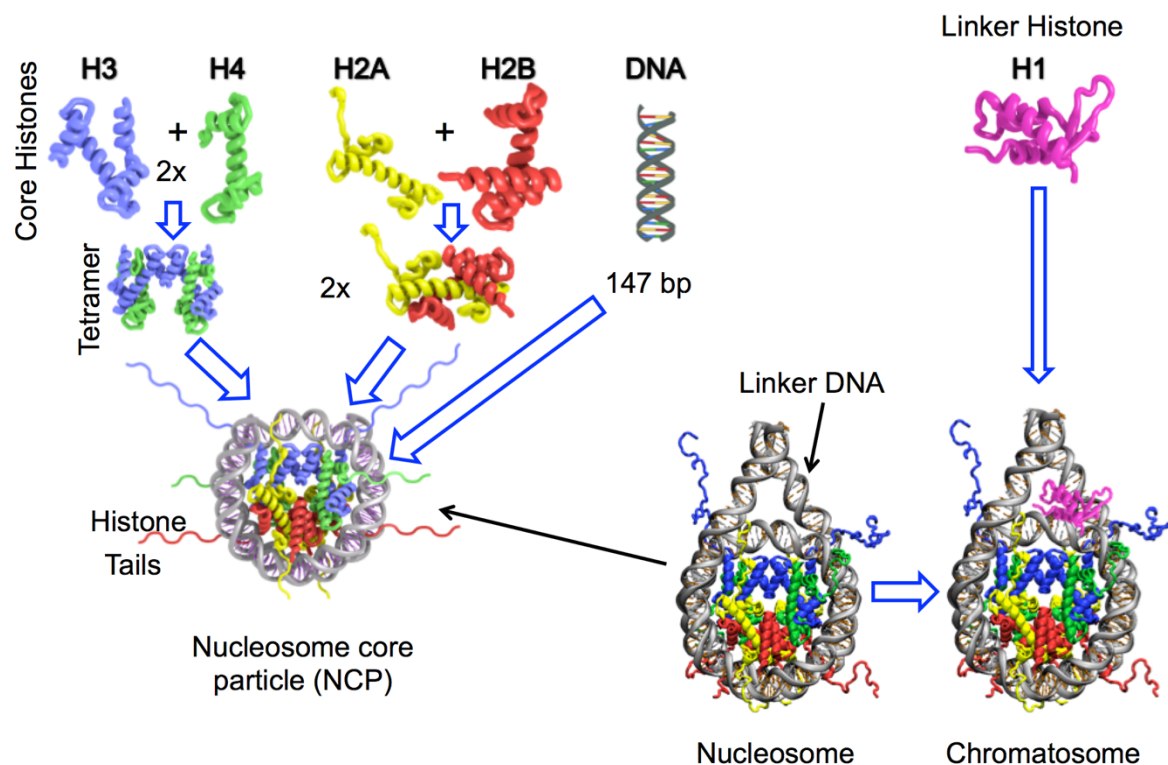


Figura 8 - Organizzazione strutturale del nucleosoma (E.J. Draizen, A.K. Shaytan, L. Marino-Ramirez, P.B. Talbert, D. Landsman, A.R. Panchenko. "HistoneDB 2.0: a histone database with variants—an integrated resource to explore histones and their variants." Database (2016). PMID: 26989147.)

Esistono differenti proteine H1, generalmente presenti nella maggior parte delle nostre cellule. Esperimenti di genetica condotti su modelli murini hanno permesso di dimostrare come questi diversi sottotipi sono funzionalmente ridondanti e una sostanziale riduzione

dei livelli totali di istoni di connessione porta alla morte dei topi in utero<sup>232</sup>. L'avvolgimento del DNA intorno agli istoni e la formazione di strutture di cromatina di ordine superiore permette alle cellule di mammifero di condensare oltre 3 miliardi di coppie di base di informazioni genetiche in un nucleo di circa 8 micron di diametro (Figura 9). Anche se la grande quantità di cromatina permette una maggiore complessità, introduce anche un problema intrinseco: il DNA compattato deve infatti interagire con i numerosi fattori nucleari coinvolti nei processi cellulari come la replicazione del DNA, la ricombinazione, la trascrizione e la riparazione<sup>233</sup>. Ciò rende la regolazione della struttura della cromatina un problema fondamentale negli eucarioti, in quanto la molecola del DNA deve essere sia compatta ma, all'occorrenza, anche facilmente accessibile.

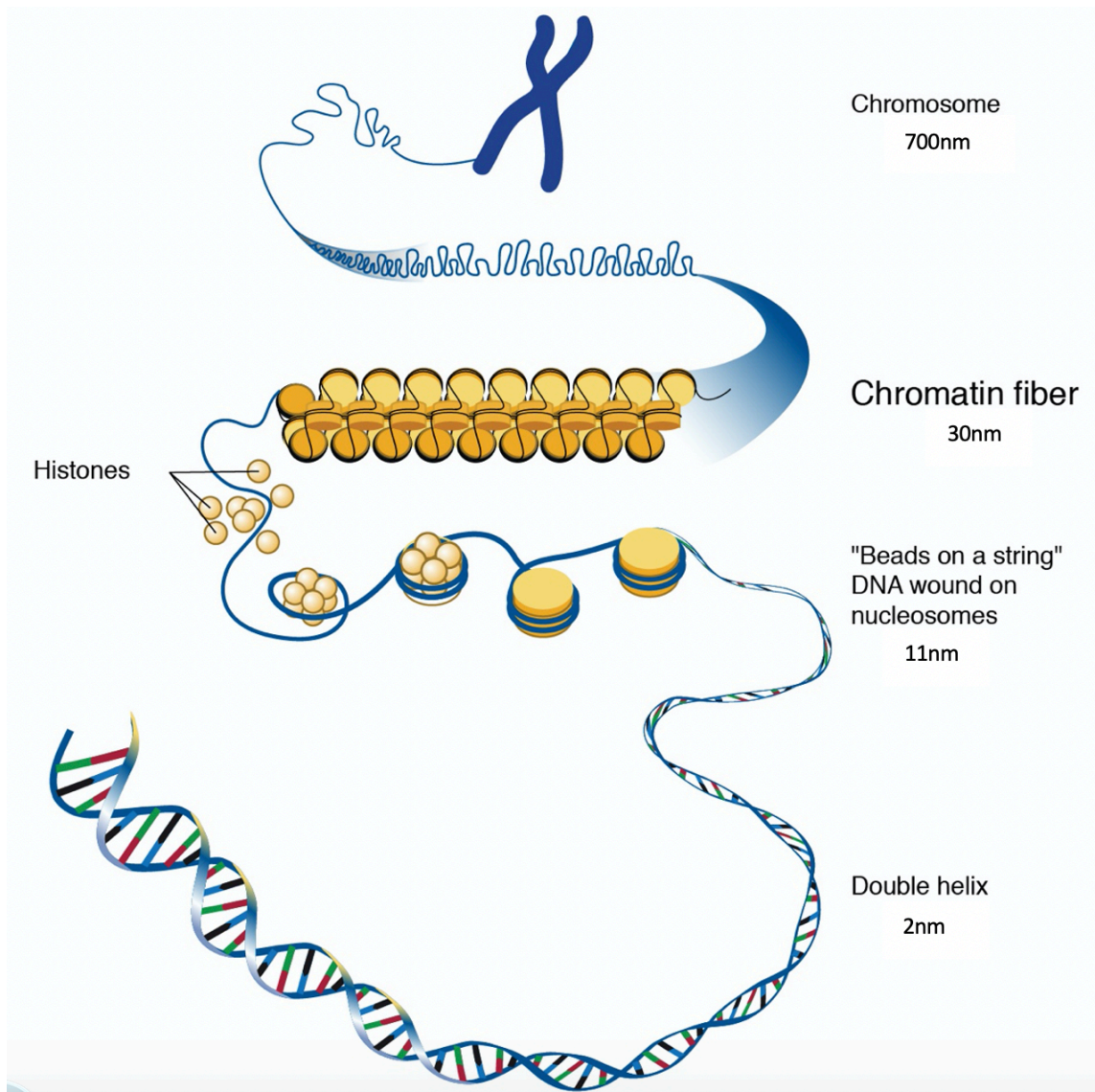


Figura 9 - Organizzazione strutturale della cromatina (<https://www.genome.gov/genetics-glossary/histone>)

Il meccanismo attraverso il quale la cromatina permette l'accesso alle proteine regolatrici specifiche del sito è per lo più controllato da diverse proteine dette rimodellatori della cromatina<sup>234,235</sup>. La classe più studiata di rimodellatori della cromatina sono gli enzimi che agendo sull'istone (principalmente a livello delle code istoniche) hanno la funzione di aggiungere o rimuovere specifici gruppi funzionali in maniera reversibile. Le code istoniche sono lunghe fino a 40 amminoacidi e interagiscono con le proteine modificatrici e regolatrici.

Le modifiche covalenti di queste regioni non strutturate forniscono un meccanismo fondamentale che regola la dinamica della cromatina ed è responsabile della fedele esecuzione dei programmi biologici critici<sup>236</sup>. E' stato identificato un gran numero di enzimi che agiscono modificando l'istone e che sono noti per essere responsabili di un'ampia

varietà di modifiche post-traduzionali dell'istone tra cui acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitilazione e sumoilazione<sup>237</sup>.

In contrapposizione agli enzimi che aggiungono i gruppi funzionali sulle code istoniche vi sono gli enzimi che le rimuovono (cioè deacetilasi istoniche e demetilasi specifiche della lisina). Spesso, sia gli enzimi che aggiungono gruppi funzionali, che quelli che li rimuovono si trovano coinvolti in eventi di rimodellamento dinamico della cromatina. Mentre classicamente si riteneva che l'effetto di queste modificazioni fosse essenzialmente dovuto ad alterazioni nei legami elettrostatici tra DNA e proteine istoniche, oggi questa visione è ritenuta insufficiente a spiegare i complessi effetti regolatori che derivano dalla presenza di queste modificazioni. La combinazione delle differenti modificazioni istoniche costituirebbe una sorta di codice, capace di essere riconosciuto da specifiche proteine non istoniche e che presentano particolari strutture quali bromodomini (per esempio nella proteina HP1), cromodomini e domini Tudor<sup>238</sup>.

La reversibilità della modifica post-traduzionale è essenziale per la plasticità dei segnali biologici tipicamente transitori. L'aggiunta e la rimozione di queste modificazioni reversibili sono mediate da attori enzimatici opposti, consentendo risposte rapide e dinamiche a stimoli intracellulari ed extracellulari. Ad esempio, chinasi e fosfatasi aggiungono o rimuovono gruppi fosfato dalle proteine bersaglio. Le ligasi dell'ubiquitina sono opposte dagli enzimi deubiquitinanti e la metilazione delle proteine è invertita dagli enzimi demetilasi.

L'equilibrio tra la deposizione e la rimozione delle differenti modificazioni istoniche gioca un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione genica e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. Ad esempio, l'espressione alterata dei geni che codificano per le HDACs (istone deacetilasi) è stata collegata allo sviluppo del cancro e di altre patologie, poiché è noto che questi enzimi influenzano la trascrizione dei geni chiave coinvolti nella proliferazione cellulare, nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi<sup>239</sup>.

### I rimodellatori della cromatina

In generale, le proteine che regolano l'accessibilità della cromatina sono classificate in due gruppi principali: i rimodellatori covalenti e i rimodellatori ATP-dipendenti. Questi ultimi sono complessi multi-proteici che sfruttano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per

alterare direttamente la struttura della cromatina, principalmente alterando il posizionamento relativo dell'ottamero istonico sul filamento di DNA. Lo spostamento dell'ottamero permette l'accesso a quelle sequenze che quando sarebbero altrimenti inaccessibili. I complessi di rimodellamento della cromatina sono stati implicati in un'ampia varietà di processi cellulari, tra cui la facilitazione e la repressione dell'espressione genica, l'organizzazione nucleare, la funzione centromerica e la stabilità cromosomica<sup>240</sup>. In accordo con questa ampia funzionalità, un'analisi a livello genomico ha trovato il complesso SWI/SNF in stretta prossimità di elementi regolatori cis integrali alla trascrizione (cioè gli stimolatori), oltre ad occupare regioni critiche per l'organizzazione cromosomica (cioè le origini della replicazione del DNA)<sup>241</sup>.

I fattori di rimodellamento della cromatina dipendenti dall'ATP sono più spesso responsabili del rilassamento della cromatina. Al contrario, gli enzimi che modificano gli istoni in maniera covalente possono indurre sia stati di cromatina rilassata (euchromatina) che di cromatina condensata (eterocromatina). Le modificazioni covalenti degli istoni hanno la capacità di modificare la struttura della cromatina poiché alterano l'interazione di tipo elettrostatico tra il filamento di DNA e i residui istonici. Per esempio, l'acetilazione delle lisine sulle code degli istoni neutralizza la carica positiva del residuo bersaglio e riduce l'affinità degli istoni per il DNA, carico negativamente, allentando così la struttura del nucleosoma<sup>242</sup>. Questo permette al complesso trascrizionale di poter accedere al DNA, agevolando la trascrizione<sup>235,243</sup>. Al contrario, la rimozione enzimatica dei gruppi acetilici dalle code degli istoni inverte l'effetto e porta alla formazione di cromatina compatta e trascrizionalmente repressa<sup>244</sup>.

Insieme, i fattori dipendenti dall'ATP e gli enzimi che modificano l'istone forniscono alle cellule eucariotiche un'ampia gamma di enzimi specializzati nel rimodellamento della cromatina. I fattori di rimodellamento degli istoni si sono evoluti per mirare a specifiche caratteristiche genomiche e aiutare ad eseguire processi biologici critici durante le diverse fasi di sviluppo<sup>245</sup>.

## HATs e HDACs

Le deacetilasi istoniche (HDAC) agiscono mediando la reazione opposta a quella indotta dagli enzimi istone acetiltransferasi (HAT) (Figura 10).

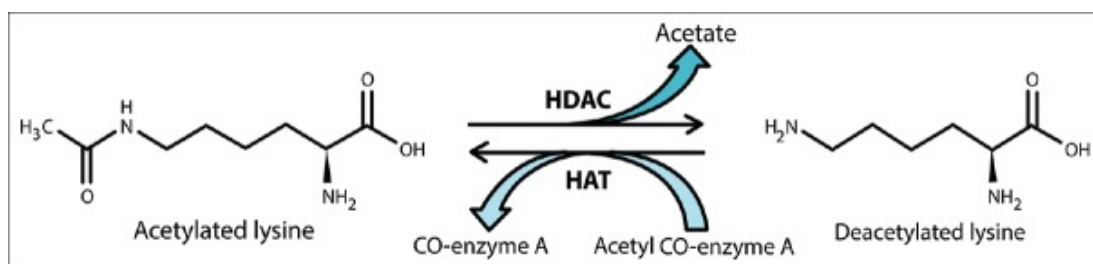


Figura 10 - Acetilazione e deacetilazione della lisina mediata dagli enzimi HAT e HDAC

Le proteine HAT infatti modificano gli istoni legando gruppi acetilici ai residui di lisina sulle code N-terminali<sup>246</sup>. In molti casi, gli enzimi HAT funzionano nel contesto di complessi multiproteici ad alto peso molecolare, e differenti complessi HAT variano in relazione alla composizione della subunità e alla specificità del substrato. Oltre agli istoni, gli HAT modificano anche le proteine non istoniche. Ad esempio alcuni complessi HAT come p300, CBP e PCAF, sono in grado di acetilare substrati non istonici come il soppressore tumorale p53, EKLF, GATA1 (proteina legante GATA 1), tubulina, importina- $\alpha$  e altri, con conseguente alterazione della capacità di questi fattori di interagire con il DNA o altre proteine<sup>247-251</sup>.

Le HDACs, viceversa, catalizzano la deacetilazione dei residui di acetil-lisina degli istoni e di altre proteine. L'azione svolta da questi enzimi regola l'espressione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nella regolazione del ciclo cellulare e nell'apoptosi, e la loro alterata regolazione è spesso associata alla carcinogenesi<sup>252</sup>.

La superfamiglia HDAC si divide in quattro classi principali in base alla loro conservazione evolutiva e alle loro proprietà funzionali (Tabella 3).

Gli enzimi zinco-dipendenti appartengono alle classi I, II e IV. La classe III è costituita dagli enzimi noti come sirtuine<sup>253</sup>. Le sirtuine sono sette (SIRT1-7), e la loro attività da deacetilasi è dipendente dalla nicotinammide adenina dinucleotide (NAD<sup>+</sup>).

Le sirtuine sono state associate al processo di proliferazione cellulare e al controllo del ciclo cellulare, ma sembra che la loro funzione primaria sia la regolazione dell'omeostasi metabolica<sup>254,255</sup>. Ad esempio, SIRT3 è una delle principali deacetilasi mitocondriali e SIRT1



Famiglia	Classe	Isoforme	Localizzazione Cellulare
Zn Dipendenti	I	HDAC1	Nucleo
		HDAC2	Nucleo
		HDAC3	Nucleo
		HDAC8	Nucleo/Citoplasma
	IIA	HDAC4	Nucleo/Citoplasma
		HDAC5	Nucleo/Citoplasma
		HDAC7	Nucleo/Citoplasma/Mitocondri
		HDAC9	Nucleo/Citoplasma
		IIB	HDAC6
	HDAC10		prevalentemente Citoplasma
	IV	HDAC11	Nucleo/Citoplasma
NAD <sup>+</sup> Dipendenti	III	SIRT 1-7	

Tabella 3 - Famiglia HDAC e localizzazione cellulare

promuove l'induzione dell'espressione genica mitocondriale così come il metabolismo dei lipidi e del glucosio<sup>256,257</sup>.

La classe I delle HDAC è composta dalle isoforme HDAC 1, 2, 3 e 8, che condividono l'omologia di sequenza con la deacetilasi istonica Rpd3 del lievito. Gli enzimi HDAC di classe I sono principalmente localizzati nel nucleo cellulare<sup>258,259</sup>. Gli enzimi HDAC di classe II sono omologhi alla deacetilasi istonica 1 del lievito (Hda1) e sono ulteriormente suddivisi in due sottogruppi, la classe IIA, che comprende le isoforme HDAC 4, 5, 7 e 9 e la classe IIB, che comprende HDAC6 e 10.

A differenza degli HDAC di classe I, gli HDAC di classe II sono principalmente localizzati nel citoplasma. Tuttavia, lo stato di fosforilazione di alcune HDAC di classe II può indurre lo spostamento tra il citoplasma e il nucleo. L'enzima HDAC6 è stato trovato associato alle regioni del gene codificante dove è probabilmente responsabile della modulazione dell'istone acetilato H3<sup>260,261</sup>. L'enzima HDAC11 è l'unico membro della famiglia di classe IV ed è stato rilevato unicamente a livello nucleare. Questo enzima si caratterizza per una struttura unica, ma mostra anche alcune omologie di sequenza con gli enzimi di classe I e II<sup>262</sup>.

La ridondanza funzionale tra i diversi enzimi HDAC di classe I rende difficile l'identificazione di differenti target specifici per ogni isoforma. Tuttavia, una recente indagine in cui è stato

messo a punto per la prima volta un modello HDAC1/2 knockdown, ha rivelato che i due enzimi, strettamente correlati tra loro, agiscono principalmente sui residui dell'istone H3 per la deacetilazione<sup>263</sup>. In questo modello, in cui le isoforme I e II non vengono espresse, è stato rilevato un aumento dei livelli di acetilazione sui residui H3K14 e H3K56 di circa tre volte mentre l'acetilazione delle lisine 9, 18, 23 e 27 sullo stesso istone è aumentata in modo meno rilevante. Inoltre, i livelli di H3K4 di-metilato e H3K9 tri-metilato non hanno mostrato cambiamenti significativi, suggerendo che gli HDAC di classe I non abbiano nessun ruolo nel rimodellamento della metilazione del nucleosoma.

Oltre alla deacetilazione degli istoni, le HDAC classiche agiscono anche su differenti proteine non istoniche, rimuovendo i gruppi acetilici. Analisi filogenetiche mostrano che le proteine non istoniche fossero probabilmente i substrati principali degli enzimi HDAC<sup>258</sup>.

Infatti, gli HDAC (ma anche gli HAT) possono influenzare l'espressione genica modulando direttamente la funzionalità dei fattori di trascrizione e di altre proteine regolatorie<sup>264</sup>. Si contano più di cinquanta proteine non istoniche soggette a deacetilazione specifica da parte degli enzimi HDAC, compresi vari fattori di trascrizione (p53, NF-κB e E2F1), co-regolatori trascrizionali (Rb), enzimi coinvolti nella riparazione del DNA (Ku70 e NEIL2), proteine strutturali (α-tubulina) e chaperones molecolari (Hsp90)<sup>265,266</sup>.

Le proteine HDAC di classe I sono meglio conosciute per la loro capacità di partecipare alla regolazione trascrizionale e sono spesso descritte come repressori genici<sup>267</sup>. Nelle cellule dei mammifero, la repressione trascrizionale può essere ottenuta attraverso meccanismi passivi o attivi<sup>268,269</sup>. I repressori passivi funzionano sequestrando attivatori trascrizionali essenziali o occupando in modo inerziale siti di legame sui promotori. Per definizione, i repressori passivi generalmente non richiedono attività enzimatica per la loro funzione inibitoria. Le proteine HDAC sono invece considerate repressori trascrizionali attivi, poiché rimuovono direttamente i gruppi acetilici dagli istoni o da altri substrati, fornendo un segnale trascrizionale negativo. Infatti, l'inattivazione dell'attività catalitica della deacetilasi indotta per mutazione o inibizione farmacologica può eliminare l'attività repressiva<sup>270</sup>.

L'associazione di alcuni complessi proteici contenenti HAT con attivatori trascrizionali specifici per il promotore e il reclutamento di alcuni complessi contenenti HDAC attraverso alcuni repressori trascrizionali ha portato alla intuitiva associazione tra alti livelli di acetilazione e attivazione trascrizionale e, viceversa, la diminuzione dei livelli di acetilazione degli istoni presso i promotori è stata correlata con il reclutamento di HDAC e la repressione

trascrizionale<sup>271</sup>. Per esempio, le HAT p300 e CBP si associano a molti fattori di trascrizione, tra cui c-Jun<sup>272</sup>, MyoD<sup>273</sup>, recettori ormonali nucleari<sup>274</sup>, e l'attivatore della trascrizione 1 (STAT1)<sup>275</sup> e in tutti questi casi agiscono da coattivatori trascrizionali. Al contrario, l'associazione dell'istone deacetilasi Rpd3 del lievito con i promotori porta ad una minore occupazione di tali promotori da parte della proteina legante TATA (TBP), del complesso di rimodellamento dei nucleosomi Swi/Snf e del complesso dell'istone acetilasi SAGA, con conseguente repressione trascrizionale<sup>276</sup>. Studi in vitro hanno dimostrato un'aumentata accessibilità del DNA agli enzimi di restrizione e ai fattori di trascrizione in risposta all'acetilazione istonica, presumibilmente a causa di un aumento della carica negativa sull'istone e della repulsione del DNA caricato negativamente, che può destabilizzare le interazioni istone-DNA<sup>277</sup>. L'acetilazione è stata anche associata all'attivazione trascrizionale perché può favorire l'aggancio di proteine coattivatrici contenenti bromodomini (che legano le lisine acetilate) agli istoni modificati su promotori bersaglio. Al contrario, la rimozione dei gruppi acetilici potrebbe diminuire il legame del coattivatore, reprimendo di fatto la trascrizione<sup>278</sup>.

Gli inibitori delle HDAC hanno evidenziato il loro potenziale terapeutico principalmente nella terapia antitumorale poiché capaci di indurre l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi<sup>279,280</sup>.

### Il ruolo dell'acetilazione nella regolazione dell'espressione genica

Nonostante vi siano numerose prove a sostegno del modello che associa gli HAT con l'attivazione trascrizionale e gli HDAC con la repressione trascrizionale, molti studi indicano che la regolazione genica mediante acetilazione è più dinamica e complessa e che gli HAT possono anche agire come repressori e gli HDAC, viceversa, possono anche funzionare come attivatori. Il differente livello di acetilazione può modulare in maniera positiva o negativa i differenti fattori trascrizionali e ciò spiega perché l'inibizione degli enzimi HDAC non determini sempre un incremento nell'espressione genica, nonostante la cromatina si trovi in uno stato "rilassato".

Per esempio, gli HAT p300 e CBP contengono entrambi il dominio di regolazione del ciclo cellulare 1 (CRD1), un repressore trascrizionale che può permettere a questi HAT di agire come repressori trascrizionali<sup>281</sup>. La rimozione delle deacetilasi del lievito Rpd3, Sin3, o

Hda1 si traduce in una diminuzione della trascrizione di un certo numero di geni e un aumento di silenziamento, indicando un ruolo alternativo degli HDAC come attivazioni trascrizionali.

Inoltre, SIN3, un componente principale del complesso di repressori trascrizionali contenenti HDAC Sin3p, funziona come un co-repressore trascrizionale per il recettore umano del progesterone, ma è anche un co-attivatore trascrizionale per i fattori di trascrizione GAL4 e HAP1<sup>282</sup>. Un'altra deacetilasi di classe I del lievito, Hos2, si lega preferibilmente ai promotori trascrizionali attivi e agli istoni deacetilati H3 e H4 (41). Inoltre, è stato dimostrato che l'Rpd3 è necessaria per l'attivazione trascrizionale dei promotori osmotici del lievito in risposta allo stress osmotico<sup>283</sup>.

L'importanza degli HDAC come attivatori dell'espressione genica è evidenziata dall'espressione genica nelle cellule trattate con inibitori HDAC. Solo una piccola percentuale del totale dei geni esaminati risponde al trattamento (circa il 7% degli mRNA), con proporzioni simili nel numero di geni attivati o e quelli repressi<sup>284,285</sup>.

È ragionevole infatti ipotizzare che questi processi di acetilazione/deacetilazione transitoria si traducano in una precisa regolazione, anche da un punto di vista temporale, della struttura cromatinica, al fine di modulare il legame di regolatori trascrizionali<sup>286,287</sup>.

Nonostante l'importanza degli enzimi HDAC nell'attivazione e nella repressione dell'espressione genica, differenti studi hanno rilevato solo un piccolo sottoinsieme di promotori sensibili agli HDAC. Ciò può essere spiegato col fatto che l'inibizione cumulativa dell'HDAC colpisce le molteplici isoforme, ognuna delle quali potrebbe avere ruoli distinti nell'attivazione o nella repressione dei geni come bersaglio di specifici percorsi di segnalazione. L'analisi dei singoli geni sembrerebbe evidenziare queste differenze, in quanto alcuni mRNA si accumulano in ritardo in risposta a trattamenti prolungati di inibitori dell'HDAC, mentre altri rimangono invariati o mostrano una diminuzione in condizioni simili<sup>288</sup>.

L'effetto dell'attività deacetilasica degli HDAC e quindi anche quello della loro inibizione può variare a seconda dello stato in cui si trova il promotore.

Infatti, i geni potrebbero essere basicamente attivi e non influenzati dagli HDAC (e di conseguenza neanche dagli inibitori HDAC). In alternativa, i geni possono essere silenziati sia da repressori non-HDAC che da repressori contenenti HDAC. L'inibizione del repressore contenente l'HDAC porterà ad un accumulo di mRNA in quest'ultima categoria, a patto che

sia presente anche RNA polimerasi necessaria per indurre l'attivazione del promotore (Figura 11, A).

In caso contrario, il gene non sarà più represso, ma rimarrà silente fino a quando non saranno presenti gli attivatori appropriati.

Per sistemi inducibili come i geni stimolati dall'IFN, in assenza di stimoli il promotore potrebbe essere semplicemente inattivo (a causa proprio della mancanza di un segnale di attivazione) o potrebbe essere attivamente represso dagli HDAC. Anche se l'espressione di geni non repressi non viene influenzata dalla presenza di HDACI, gli effetti sul gene represso potrebbero causare l'accumulo di mRNA, a condizione che siano presenti gli attivatori trascrizionali. In seguito al segnale di attivazione, i geni diventano capaci di rispondere ai fattori trascrizionali associati ad HAT e HDAC. Tuttavia, in questo caso, il blocco degli HDAC nel complesso attivatore si porterebbe ad una repressione della trascrizione. Da notare che ulteriori fenomeni regolatori alternativi potrebbero anche produrre effetti secondari a valle dell'inibizione dell'HDAC (Figura 11, B e C). Per esempio, se il gene represso dall'HDAC codifica per un attivatore trascrizionale e quindi si accumula in risposta agli inibitori dell'HDAC, la proteina attivatrice potrebbe diventare disponibile a legarsi ai propri promotori target, inducendone potenzialmente la trascrizione. Con il medesimo meccanismo, l'inibizione dell'HDAC può portare alla diminuzione della produzione di un repressore trascrizionale, diminuendo l'azione negativa del promotore del gene target del repressore<sup>289</sup>.

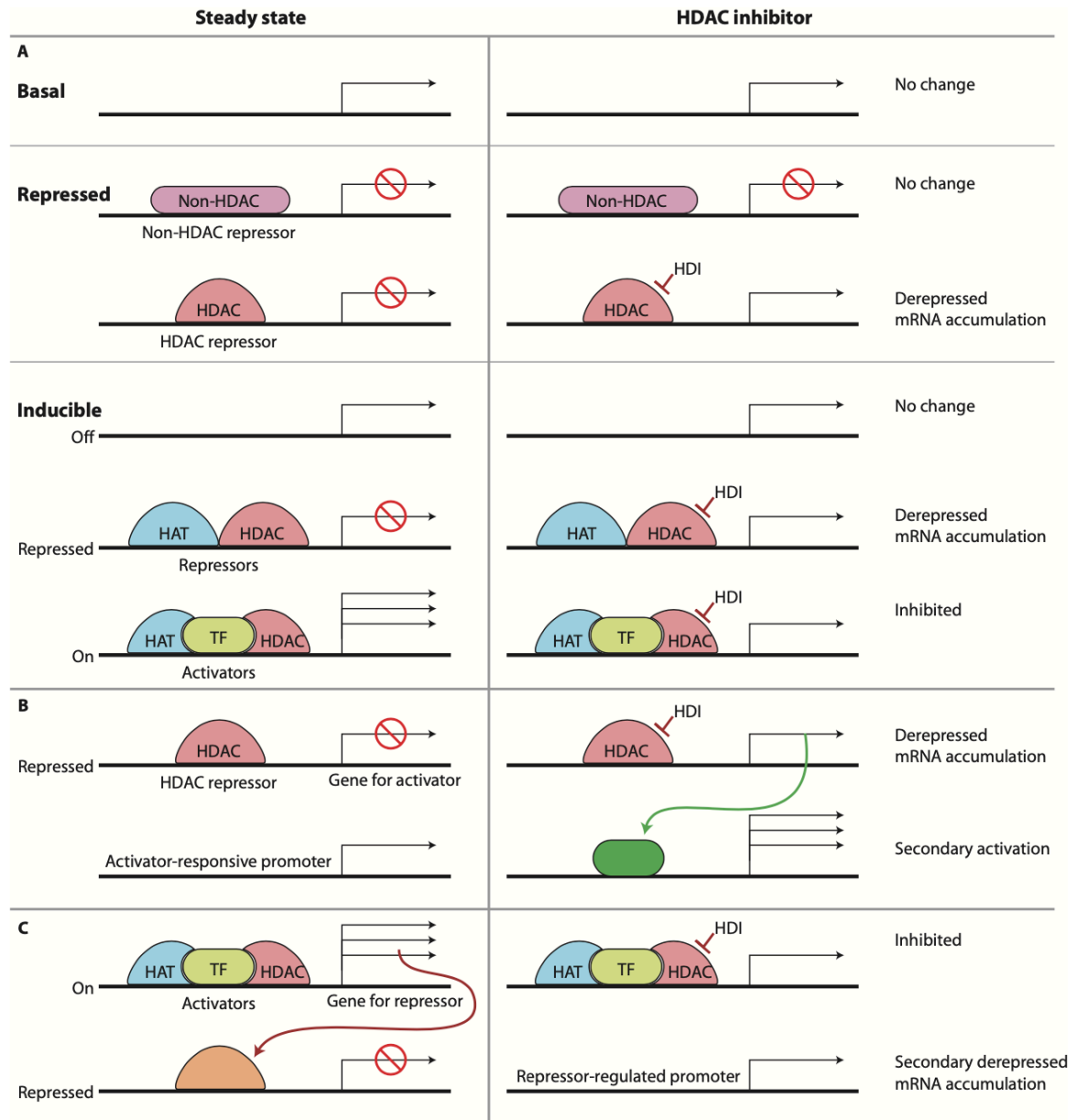


Figura 11 - Effetti degli HDACI sull'espressione genica. Confronto tra gli effetti degli HDAC sui promotori basali, repressi e inducibili. I geni espressi a livello basale e che non sono regolati dagli HDAC sono insensibili ai trattamenti agli HDACI. I geni silenziati da repressori non-HDAC sono insensibili agli inibitori. I geni repressi dall'HDAC sono attivati da parte degli inibitori HDAC, con conseguente possibile accumulo di mRNA. I promotori inducibili che sono semplicemente "spenti" non dovrebbero cambiare, ma quelli "repressi" dai complessi HDAC saranno de-repressi, con possibile conseguente accumulo di mRNA in assenza di stimoli. Questi stessi geni sono attivati in risposta allo stimolo, ma se altri HDAC fanno parte del meccanismo di attivazione, l'espressione genica può essere compromessa dalla presenza degli inibitori anche in presenza degli stimoli attivatori. (B) Effetti secondari dell'inibizione degli HDAC. Gli inibitori dell'HDAC possono de-reprimere i geni che codificano un attivatore di trascrizione. Quando l'attivatore si accumula, può attivare l'espressione dei suoi normali promotori bersaglio, con conseguente attivazione secondaria. (C) Effetti secondari degli inibitori HDAC nella trascrizione attivata. Un gene inducibile che codifica un repressore è inibito dagli inibitori HDAC, permettendo la de-repressione secondaria del gene target a valle (Nusinzon I, Horvath CM. *Sci STKE*. 2005 Aug 9;2005(296):re11. doi: 10.1126/stke.2962005re11. PMID: 16091625.).

## Gli Inibitori HDAC

La carcinogenesi è il risultato dell'accumulo di processi aberranti che portano all'instabilità e ad alterazioni dell'espressione genica<sup>290</sup>. La deregolazione dell'espressione degli enzimi HDAC può essere un fattore della genesi tumorale e di altre patologie: è stato stimato che fino al 40% dei tessuti tumorali umani (tra i quali il cancro del colon, della prostata, del seno, del polmone, delle ovaie, dello stomaco, dell'esofago, del pancreas e della tiroide) mostrino una iperespressione dell'isoforma 1, 2 e 3 delle HDAC di classe I<sup>291</sup>. Inoltre, i tumori meno differenziati e quindi più aggressivi sono caratterizzati dalla forte sovraespressione di HDAC2 e HDAC3<sup>292,293</sup>. Si ritiene che lo stato di ipoacetilazione indotto dall'HDAC possa contribuire alla repressione trascrizionale e mantenga un ambiente favorevole per la proliferazione cellulare, la sopravvivenza e la sdifferenziazione tumorale. Questa alterazione dell'espressione delle HDAC, comune a molti tumori, ha portato questa classe enzimatica ad essere identificata come bersaglio per nuovi approcci terapeutici. Di conseguenza, gli HDACI sono emersi come possibili farmaci per il trattamento di un'ampia varietà di tumori. Non sorprende che questi composti abbiano catturato l'interesse dei ricercatori accademici come anche di diverse ditte farmaceutiche. Infatti, nel corso dell'ultimo decennio un gran numero di HDACI è stato intensamente studiato con l'obiettivo di introdurre questi composti nel mercato.

Gli inibitori HDACI possono agire in maniera selettiva verso una singola isoforma o verso alcune isoforme della famiglia HDAC, o agire in maniera non-selettiva verso tutta la famiglia (i cosiddetti pan-inibitori).

## Classificazioni degli inibitori HDAC

Sebbene gli inibitori delle HDAC possano essere suddivisi in classi in base alla loro struttura chimica o in base alla loro origine, naturale o sintetica, tutti possono essere ricondotti a un farmacoforo comune; la struttura base di queste molecole assomiglia a quella della tricostatina A (TSA), molecola naturale e noto inibitore delle HDAC, che è caratterizzata da un gruppo di riconoscimento (CAP), una catena alifatica (LINKER), e da un gruppo funzionale che coordina lo zinco nel sito catalitico (Figura 12).

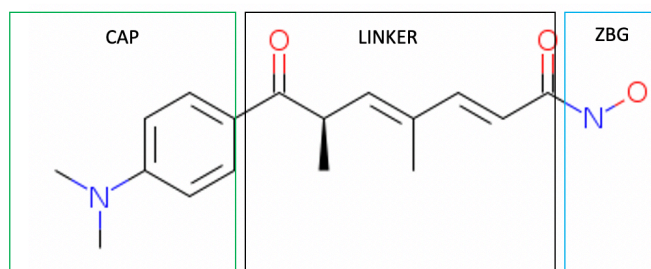


Figura 12 - Componenti degli HDACI, modello farmacoforico costituito da: Zinc Binding Group (ZBG) che coordina lo zinco nel sito catalitico, un cap group ed un linker che collega le due porzioni precedenti.

Esistono cinque differenti classi di inibitori HDAC, suddivisi in base alla struttura chimica<sup>294</sup>:

- Idrossamati
- carbossilati (acidi grassi a corta catena)
- benzamidi
- tetrapeptidi ciclici
- inibitori delle sirtuine (Tabella 4).

All'interno della classe più ampia degli HDACI, quella degli idrossamati, la TSA viene utilizzata unicamente in laboratorio a fini sperimentali a causa della sua elevata tossicità, mentre il vorinostat (acido suberaniloidrossamico, SAHA) è stato approvato dalla FDA per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T nel 2006. Belinostat (approvato per il trattamento di pazienti con linfoma periferico a cellule T), panobinostat (approvato per il trattamento del mieloma multiplo) e altri componenti della classe come givinostat, abexinostat e resmipostat che sono stati recentemente testati in alcuni trials clinici sono tutti pan-inibitori. Rocilinostat, practioestat e CHR-3996 inibiscono invece come inibitori selettivi di una o più classi.

Il gruppo degli acidi a catena corta comprende acido valproico (VPA), acido butirrico e fenilbutirrico che, rispettivamente, hanno una debole attività inibitoria verso gli enzimi HDAC di classe I e IIa e verso quelli di classe I e II. Il VPA è approvato per il trattamento dell'epilessia, della sindrome bipolare e per la profilassi dell'emigrania ed è stato testato come antitumorale in qualità di HDACI in diversi studi clinici.

Tra i benzamidi che sono attualmente impiegati in studi clinici vi sono l'entinostat, tacedinalina e 4sc202 che inibiscono le isoforme di classe I. Fa parte di questo gruppo anche mocetinostat, che però si comporta da inibitore selettivo della classe I e IV.

I tetrapeptidi ciclici includono la romidepsina, che ha ottenuto l'approvazione dalla FDA per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T. Si tratta di un profarmaco, ovvero diviene



attivo solo dopo essere stato metabolizzato, che va a legare gli ioni zinco degli enzimi di classe I. Tra gli inibitori delle sirtuine vi sono la nicotinamide, che è un pan-inibitore e il sirtinolo, il cambinolo ed EX-527 che sono inibitori specifici di SIRT1 e SIRT2<sup>295</sup>.

Class	HDAC Inhibitor	Target	Studi Clinici/Approvazione
Idrossamidi	TSA	pan	preclinico
	SAHA	pan	approvato per il linfoma cutaneo a cellule T
	Belinostat	pan	approvato per il linfoma a cellule T periferiche
	Panabostat	pan	approvato per il mieloma multiplo
	Givinostat	pan	studi clinici di fase II - leucemia recidiva e mieloma multiplo
	Resminostat	pan	studi clinici di fase I e II - carcinoma epatocellulare
	Abexinostat	pan	studi clinici di fase II - linfoma a cellule B
	Quisinostat	pan	studi clinici di fase I - mieloma multiplo
	Rocilinostat	II	studi clinici di fase I - mieloma multiplo
	Practinostat	I,II,IV	studi clinici di fase II - cancro alla prostata
	CHR-3996	I	sperimentazione clinica di fase I - tumori solidi metastatici avanzati/metastatici refrattari alla terapia standard
Carbossilati	Acidi Valproico	I,IIA	approvato per l'epilessia, i disturbi bipolari e l'emicrania, studi clinici di fase II
	Acido Fenilbutirrico	I,II	studi clinici di fase I - vari studi
	Acido Butirrico	I,II	studi clinici di fase II - vari studi
Benzammidi	Entinostat	I	studi clinici di fase II - cancro al seno, linfoma di Hodgkin, tumore polmonare
	Tacedinaline	I	studi clinici di fase III - tumore polmonare non a piccole cellule e tumore del pancreas
	4SC202	I	studi clinici di fase I - neoplasie maligne ematologiche avanzate
	Mocetinostat	I, IV	studi clinici di fase II - linfoma di Hodgking
Tetrapeptidi ciclici	Romidepsina	I	approvato per il linfoma cutaneo a cellule T
Inibitori delle sirtuine	nicotinamide	III	studi clinici di fase III - cancro alla laringe
	Sirtinolo	SIRT1 e 2	preclinico
	Cambinolo	SIRT1 e 2	preclinico
	EX-527	SIRT1 e 2	cancro preclinico, studi clinici di fase I e II - malattia di Huntington, glaucoma

Tabella 4 - Classificazione degli HDAC inibitori e studi clinici

# Scopo della tesi

I due progetti che compongono la presente tesi si sono sviluppati in maniera indipendente, da un punto di vista temporale e da un punto di vista di progettazione scientifica. Tuttavia, ritengo sia importante sottolineare come, il messaggio che deriva da entrambi è quello di una necessaria e, alla luce dei risultati che verranno elencati nell'ultima parte del mio elaborato, plausibile ricerca di nuovi approcci terapeutici nel trattamento del dolore.

## Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.

Il dolore cronico, che può avere componenti sia nocicettive che neuropatiche, rappresenta un'esigenza terapeutica ancora insoddisfatta<sup>296,297</sup>. Il targeting selettivo di quegli eventi molecolari che sottendono la trasmissione del segnale nocicettivo dai neuroni sensoriali primari può fornire una base per l'identificazione di terapie analgesiche innovative prive di effetti collaterali centrali e con un profilo di sicurezza favorevole. Dato il ruolo chiave dell'eccitabilità neuronale nella nocicezione, uno sforzo sostanziale è stato diretto all'identificazione dei canali ionici espressi preferenzialmente dai nocicettori periferici<sup>298</sup>. A questo proposito, una notevole attenzione è stata riservata a specifici canali al sodio voltaggio dipendenti (Nav), che sono presenti nei neuroni sensoriali primari, compresi i loro terminali periferici e centrali, con i sottotipi Nav1.7, 1.8 e 1.9. In termini di proprietà biofisiche di questi canali, sappiamo che l'apertura delle isoforme Nav1.7 e Nav1.9 gioca un ruolo chiave nell'amplificazione degli stimoli sotto-soglia, consentendo l'inizio del *firing* dei potenziali d'azione, mentre l'attivazione del Nav1.8 è fondamentale per il mantenimento del segnale<sup>299</sup>. Questi risultati hanno suscitato un forte interesse nello sviluppo di analgesici in grado di bloccare selettivamente i canali Nav1.7, 1.8 o 1.9. La logica di tale strategia è ulteriormente rafforzata da studi di genetica molecolare umana che dimostrano che specifici disturbi del dolore come l'eritromelalgia e l'insensibilità congenita al dolore sono legati a mutazioni dei geni che codificano per Nav1.7, Nav1.8 o Nav1.9<sup>300</sup>. Attualmente, sono stati identificati diversi bloccanti dei canali con diversi gradi di selettività tra le isoforme 1.7 e 1.8 che si trovano in diverse fasi di sviluppo clinico<sup>299</sup>.

Recentemente è emersa una strategia chiave che è quella di rivalutare farmaci già noti in nuove patologie, il cosiddetto *drug repositioning*. Infatti, lo sviluppo di farmaci o composti già esistenti che abbiano già un profilo di sicurezza accettabile noto, per il trattamento di malattie oltre a quelle per cui hanno ottenuto l'approvazione normativa può portare a una significativa riduzione sia dei tempi di sviluppo che dei costi<sup>301</sup>. In termini di sviluppo di bloccanti selettivi dei canali del sodio nella terapia del dolore, il riutilizzo dei composti esistenti potrebbe prevenire problemi di sicurezza e tollerabilità e accelerare il passaggio alla clinica.

Con questa logica, in questo studio abbiamo notato che i composti contenenti all'interno della loro struttura molecolare un anello benzotiazolico, mostrano un buon grado di selettività e di potenza inibitoria per i canali Nav1.7 e Nav1.8<sup>302</sup>. Tra i composti di tipo benzotiazolico, il dexpramipexolo (DEX) è l'R-enantiomero del farmaco antiparkinsoniano pramipexolo, dotato di una capacità clinicamente irrilevante di legare i recettori della dopamina ma in grado di migliorare la bioenergetica neuronale tramite F1Fo ATP-sintasi<sup>303,304</sup>. Da notare che il DEX è stato ampiamente testato negli esseri umani affetti da sclerosi laterale amiotrofica<sup>305</sup> e attualmente in pazienti con sindromi ipereosinofile<sup>306,307</sup>. In entrambi i casi il farmaco ha mostrato un profilo di sicurezza favorevole con dosi giornaliere di 300 mg e una durata del trattamento di quasi un anno.

Su queste basi, in questo studio abbiamo valutato se la struttura benzotiazolica del DEX conferisca al composto la capacità di interagire con i canali del sodio, compresi Nav1.7 e Nav1.8, e se tale interazione possa tradursi nell'induzione di analgesia in molteplici modelli sperimentali di dolore.

### Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di MOH

Attualmente un importante ostacolo nell'identificazione di nuove terapie per l'emicrania di tipo cronico è dato dalla difficoltà di sviluppare un modello preclinico di questa complessa patologia.

Per questo lo scopo iniziale del nostro studio è stato quello di studiare l'effetto della somministrazione cronica di differenti farmaci antiemicranici sia sull'espressione genica a livello del ganglio trigeminale, associato alla patogenesi emicranica, e nei neuroni DRG

toracici, che funzionale, concentrandoci in particolar modo sulle possibili alterazioni delle soglie nocicettive e sulla capacità di rilascio di CGRP.

Nella cefalea da abuso di farmaci, l'unica terapia attualmente valida è quella della sospensione dell'assunzione del farmaco antiemigranico. Questa sospensione causa un immediato peggioramento della qualità di vita del paziente con sintomi che vanno dalla nausea, all'insonnia, ansia e ipotensione ma soprattutto un netto peggioramento dell'emigrania primaria preesistente per un periodo di tempo variabile e che può arrivare a durare alcune settimane a seconda del farmaco di cui si abusa. Perciò, nella seconda fase dello studio abbiamo testato la possibilità di utilizzare dei farmaci che potessero contrastare l'alterata regolazione dell'espressione genica indotta da questi trattamenti cronici, senza sospendere l'assunzione del farmaco antiemigranico.

Date le evidenze sul ruolo delle modificazioni epigenetiche in patologie quali depressione ed epilessia, che hanno un'alta comorbidità con l'emigrania e ipotizzando che anche nei processi di cronicizzazione dell'emigrania stessa esista una componente epigenetica, abbiamo cercato di ridurre, o auspicabilmente revertire, le alterazioni indotte dal trattamento cronico con il farmaco antiemigranico con dei farmaci che agissero a livello dell'epigenoma.

Abbiamo quindi testato l'effetto di due pan-inibitori delle HDAC, il panobinostat e il givinostat. Il primo è stato già approvato nell'uso clinico per il trattamento del mieloma multiplo mentre il secondo è attualmente in fase di sperimentazione per il trattamento della leucemia recidiva e del mieloma. Abbiamo quindi valutato l'effetto di questo co-trattamento a livello funzionale e trascrittomico.

# Materiali e metodi

## Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.

### Animali

Tutte le procedure sugli animali sono state condotte secondo le Linee guida della Comunità Europea per la cura degli animali, DL 116/92, applicazione della Direttiva del Consiglio della Comunità Europea (86/609/CEE) e approvate dal Comitato per la cura degli animali e l'uso sperimentale dell'Università degli studi di Firenze. Gli studi sugli animali sono stati approvati dal Department of Veterans Affairs West Haven Medical Center (VAMC) Animal Use Committee. Per gli esperimenti sono stati utilizzati topi maschi CD-1 (20-25 gr), cuccioli di ratto SD provenienti dalli Charles River (Calco, Italia) e topi Nav1.8-null (ottenuti mediante sistema Cre-LoxP, come descritto in letteratura<sup>308</sup>) o topi C57BL/6 (Envigo). Gli animali durante l'intero periodo di stabulazione hanno avuto libero accesso al cibo e all'acqua e sono stati tenuti in ambiente con un ciclo di 12 h luce/buio in una stanza ventilata ad una temperatura costante di 24°C. I test comportamentali sono stati eseguiti dopo un'ora di acclimatazione dei topi nella stanza adibita al test e a temperatura controllata (20-22°C) tra le 9.00 e le 17.00 con un ordine randomizzato da parte di operatori in cieco.

### Preparazioni delle colture cellulari di DRG

I neuroni DRG primari sono stati isolati e coltivati come precedentemente descritto<sup>309</sup>. I gangli sono stati prelevati bilateralmente da cuccioli di ratto di 5 giorni o da ratti adulti di 3 mesi e digeriti enzimaticamente con 2 mg/ml di collagenasi tipo 1A e 1 mg/ml di tripsina (Sigma-Aldrich) diluita in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (25-35 min a 37°C). Le cellule sono state poi fatte precipitare mediante centrifugazione e risospese in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) integrato dal 10% di siero di cavallo, 100 U/ml di penicillina, 0,1 mg/ml di streptomina e 2 mM di L-glutammina. Dopo la centrifugazione (1.200 g, 5 min), i neuroni sono stati ri-sospesi nel mezzo di coltura di cui sopra contenente 2,5 mM di citarabina e poi seminati su vetrini coprioggetto da 13 mm precedentemente

trattati con poli-L-lisina (8,3 mM) e laminina (5 mM) al fine di favorire l'adesione. I neuroni DRG prelevati dai topi wildtype e dai topi Nav1.8-null, per testare la selettività del DEX verso l'isoforma Nav1.8, sono stati isolati come descritto in precedenza<sup>310</sup>, e coltivati in assenza di fattori di crescita a 37°C in un'incubatrice di CO<sub>2</sub> umidificata al 5%. I DRG sono stati messi in coltura per 24-48 ore prima di essere utilizzati per gli esperimenti.

### Registrazioni elettrofisiologiche

Le registrazioni in patch-clamp dai DRG di ratto sono state eseguite su cellule mantenute a -60 mV come descritto in precedenza<sup>311</sup>. Per i DRG di ratto sono state utilizzate le seguenti soluzioni: soluzione extracellulare (mM): NaCl 147; KCl 4; MgCl<sub>2</sub> 1; CaCl<sub>2</sub> 2; HEPES (4-(2-idrossietil)-1-piperazinazione-etansulfonico acido) 10; D-glucosio 10 (pH 7,4 con NaOH). Soluzione di pipette (mM): CsCl 120; Mg<sup>2+</sup>-ATP 3; EGTA 10; HEPES 10 (pH regolato a 7,4 con CsOH).

Le registrazioni elettrofisiologiche dai neuroni DRG dei topi wildtype e da quelli knock-out per il canale Nav1.8 sono state condotte come precedentemente riportato<sup>310</sup>. Sono state utilizzate le seguenti soluzioni: soluzione extracellulare (mM) NaCl 70; colina cloruro 70; KCl 3; MgCl<sub>2</sub> 2; CaCl<sub>2</sub> 2; HEPES 10; CsCl 5; TEA-Cl 20; CdCl<sub>2</sub> 0,1; 4-AP 1 (pH 7,3 con TEA-OH, osmolarità regolato a 325 mOsm con destrosio). Soluzione intracellulare (mM): CsF 135; NaCl 5; CsCl 10; EGTA 5; Mg<sup>2+</sup>-ATP 3; HEPES 10 (pH 7,3 con KOH, osmolarità regolata a 315 mOsm con destrosio).

La TTX (300 nM) è stata aggiunta alla soluzione extracellulare per bloccare i canali di sodio sensibili alla tossina.

Le cellule sono state trasferite in una camera di registrazione da 1 ml montata sulla piattaforma di un microscopio invertito, e superfuse ad una portata di 1-2 ml/min da un regolatore a tre vie con valvola di perfusione (Harvard Apparatus). Gli elettrodi in vetro borosilicato (Harvard Apparatus, Holliston, MA) sono stati tirati con un tira-elettrodi Sutter Instruments (modello P-87) ad una resistenza finale della punta di 1-3 MΩ. I dati sono stati acquisiti mediante un amplificatore Axopatch 200B (Axon Instruments, CA), filtrati a 10 kHz, memorizzati ed analizzati con il software pClamp 9.2 (Axon Instruments, CA), o con un doppio amplificatore EPC10 e il software Patchmaster (HEKA Elektronik). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti a temperatura ambiente (20-22°C). La resistenza in serie

(Rs), la resistenza della membrana (Rm) e la capacità della membrana (Cm) sono state regolarmente misurate con impulsi di tensione iperpolarizzanti veloci (da -60 a -70 mV, con una durata di 40 ms). La compensazione della resistenza in serie (80-85%) è stata applicata per ridurre gli errori di tensione. Solo le cellule che mostravano un Cm e Rs stabile prima, durante e dopo l'applicazione del farmaco sono state incluse nell'analisi.

Le correnti al Na<sup>+</sup> sono state isolate aggiungendo 100 μM NiCl<sub>2</sub> e 200 μM CdCl<sub>2</sub> alla soluzione extracellulare e sono state evocate da un protocollo di step di tensione a 0 mV (40 ms) a partire da un potenziale di mantenimento (Vh) di -90 mV una volta ogni 5 s (salvo diversa indicazione). Dopo aver acquisito una corrente I<sub>Na</sub> di ampiezza stabile, è stato aggiunto il DEX alla soluzione extracellulare. Le tracce I-V della corrente I<sub>Na</sub> sono state ottenute con un protocollo di depolarizzazione a step di tensione (step di 10 mV da -50 mV a +40 mV, 30 ms ciascuno, 2 s di intervallo tra gli step; Vh=-90 mV). Per ottenere le curve di attivazione-attivazione, abbiamo monitorato i picchi di I<sub>Na</sub> generati dal seguente protocollo: 18 step depolarizzanti (da -130 a + 50 mV, durata 40 ms, intervallo tra gli step di 2 s) sono stati applicati da una Vh = - 90 mV (il picco I<sub>Na</sub> misurato ad ogni step è stato utilizzato per la curva di attivazione) e sono stati seguiti da uno step di 15 ms a 0 mV (il picco I<sub>Na</sub> misurato ad ogni step è stato utilizzato per la curva di inattivazione). Le curve G-V normalizzate sono state mediate e inserite in un'equazione di Boltzmann:  $G/G_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}$ . L'ampiezza della corrente (misurata come pA) è stata normalizzata alla rispettiva capacità della cellula (misurata in pF) ed espressa come densità di corrente (pA/pF). Tutti i farmaci sono stati applicati per superfusione con un regolatore a tre vie della valvola di perfusione (Harvard Apparatus) dopo aver ottenuto una corrente basale stabile. Il ricambio completo della soluzione di bagno nella camera di registrazione avviene entro 15 s.

Le correnti al sodio nelle colture primarie dei cardiomiociti ventricolari del topo sono state studiate come descritto in precedenza<sup>312</sup>.

### Analisi del docking molecolare

Il software USCF Chimera (ver. 1.13.1) [42] è stato utilizzato per preparare, analizzare e visualizzare i calcoli di docking molecolare. I software LePro e LeDock (ver. 1.0, LePhar

Research, [www.lephar.com](http://www.lephar.com)) sono stati poi utilizzati per la preparazione dei file e le simulazioni del docking.

Il modello di omologia del canale umano Nav1.8 è stato prelevato dal repository SWISS-MODEL [7] (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q9Y5Y9>, adesione febbraio 2019). Il modello è stato costruito automaticamente sulle coordinate 3D della catena A del Nav1.4 cristallizzato<sup>313</sup> (codice pdb 6agf, 61% dell'identità della sequenza). Il software LePro è stato quindi utilizzato per elaborare automaticamente il corrispondente file PDB scaricato dal repository SWISS-MODEL aggiungendo atomi di idrogeno alla proteina modellata. Le coordinate 3D DEX sono state importate dal database PubChem<sup>314</sup> con il codice 59868 di USCF Chimera. Il ligando è stato poi ridimensionato e sono state aggiunte le cariche con lo strumento AM1-BBC Antechamber<sup>315</sup> e salvate come file di tipo SYBYL mol2.

Il software LeDock è stato impiegato per le simulazioni di docking del DEX nel canale umano Nav1.8. La casella di ricerca a griglia era centrata sulle seguenti coordinate 3D della proteina (y:130, y: 130, z: 130) con un grande box impostato in modo tale da includere tutti i pori interni (30x30x60 Å). Per la precisione, sono state eseguite 100 esecuzioni di docking, RMSD è stato impostato a 2.0, e altre impostazioni erano come predefinite. Infine, la posa rappresentativa del cluster più grande (più popolato) è stata selezionata ed analizzata utilizzando USCF Chimera. LigPlot+ (ver. 2.1)<sup>316</sup> è stato ulteriormente impiegato per l'analisi e la visualizzazione del complesso proteina-ligando.

### Modelli animali di dolore

#### Test della formalina e writhing test

Il test della formalina è stato condotto come descritto<sup>317</sup>. In breve, i topi hanno ricevuto un'iniezione intraplantare di 20 µl di una soluzione di formalina allo 0,5% utilizzando un ago da 20G, e sono stati immediatamente collocati singolarmente in delle scatole trasparenti (10x15x15cm, con uno specchio posto sul pannello posteriore per facilitarne l'osservazione). I topi sono stati osservati dal minuto 0 a 10 (fase iniziale) e dal minuto 11 a 60 (fase finale) ed è stato preso nota il tempo trascorso dagli animali in comportamenti associati ad algesia (per esempio il leccare, mordere e battere la zampa iniettata). DEX è stato iniettato 1 h prima del test per via intraperitoneale (ip) o orale (per os) alla dose di 3



o 10 mg/kg, oppure 10 min. prima dell'inizio del test per via sottocutanea nella zampa posteriore alla dose di 20, 70 o 140 µg/20 µl. L'indometacina è stata utilizzata come controllo positivo alla dose di 10 mg/Kg, i.p., 1h prima del test, mentre i topi di controllo hanno ricevuto una iniezione di pari volume di soluzione salina. Ad ogni gruppo sperimentale sono stati assegnati venti topi CD-1 (20-25 gr), randomizzati prima del test della formalina.

Il writhing test è stato condotto in topi maschi e femmine trattati con DEX (10 o 20 mg/Kg via ip) o con soluzione salina. Un'ora dopo, i topi hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di acido acetico (200 µl, 0,6%) e dopo altri 5 minuti lo sperimentatore in cieco, ha preso nota del numero di stiramenti prodotti nell'animale, intesi come inarcamento della schiena, allungamento del corpo ed estensione degli arti posteriori, per un tempo totale di 10 minuti. Ogni gruppo sperimentale è stato formato da 10 topi maschi CD-1 (20-25 gr), randomizzati prima del test.

#### Legatura del nervo sciatico e artrite cronica

La legatura del nervo sciatico è stata eseguita come già riportato in letteratura<sup>318</sup>. In breve, nei topi anestetizzati (1,5% isoflurano in 70% di protossido d'azoto e 30% di ossigeno) è stato esposto il nervo sciatico, sezionando attraverso il bicipite femorale. Vicino alla triforcazione del nervo, sono state eseguite quattro legature (con filo di seta 7,0) intorno al nervo sciatico a circa 1 mm di distanza, stringendole attorno al nervo sino a suscitare una breve contrazione nella zampa posteriore. Lo strato muscolare è stato poi cucito e il sito di taglio suturato. Dieci giorni più tardi, l'allodinia della zampa è stata valutata per mezzo del Von Frey elettronico. La soglia di allodinia meccanica della zampa con la legatura è stata confrontata con la zampa controlaterale non operata. In entrambi i gruppi sperimentali, la soglia della stimolazione meccanica della zampa controlaterale non differisce dal suo valore di soglia di base. Ad ogni gruppo sperimentale sono stati assegnati 10 topi maschi CD-1 (20-25 gr).

Per indurre l'artrite cronica, i topi hanno ricevuto 5µl di una soluzione di 1 mg/ml di adiuvante completo di Freund (CFA) nella caviglia destra e l'allodinia meccanica nella zampa posteriore corrispondente è stata valutata al settimo, quattordicesimo e ventunesimo giorno dopo l'iniezione di CFA per mezzo del Von Frey elettronico (Ugo Basile,

Varese, Italia). Dieci minuti prima del test, nella zampa posteriore è stato iniettato sottocute DEX (70 µg/20µl) o un pari volume di soluzione fisiologica. Al settimo giorno dopo l'operazione di legatura, 8 animali sono stati assegnati in maniera casuale ad ogni gruppo sperimentale.

### Neuropatia da oxaliplatino

L'allodinia al freddo è stata valutata mediante lo strumento Hot/Cold Plate (Ugo Basile, Milano, Italia). Sono stati adottati due protocolli di iniezione di oxaliplatino.

Protocollo 1: 40 µg di oxaliplatino in 20 µl sono stati iniettati nel dorso della zampa posteriore per via sottocutanea. L'allodinia a freddo è stata valutata a 1, 2, 3, 4, 5 ore dopo l'iniezione<sup>319</sup>.

Protocollo 2: l'oxaliplatino alla dose di 2,4 mg/kg è stato iniettato i.p. dal giorno 1 al giorno 5 e dal giorno 8 al 12. L'allodinia al freddo è stata misurata al giorno 21<sup>320</sup>. La temperatura della piastra è stata mantenuta costante a 5±1°C. Comportamenti associati al dolore (quali il sollevamento e il leccare una delle zampe posteriori) sono stati osservati per 5 minuti. Ogni prova è stata ripetuta tre volte a intervalli di 10 minuti, e un tempo di cut-off di 300 secondi è stato utilizzato per prevenire danni ai tessuti. Prima del test, per entrambi i protocolli, 8 topi CD-1 sono stati assegnati in modo casuale al gruppo di controllo o a quello trattato con DEX.

Il DEX è stato iniettato i.p. alla dose di 10 mg/kg, 1h prima del test o sottocute alla dose di 70 µg/20 µl 10 min. prima del test.

### Neuropatia diabetica

Il diabete di tipo I è stato indotto in topi a digiuno da 5 ore, mediante un'iniezione quotidiana (i.p.) di streptozotocina (STZ, 50 mg/kg) solubilizzata in tampone citrato 0,1 N (pH 4,2), per 5 giorni consecutivi. Il gruppo di controllo ha ricevuto un'iniezione di pari volume di tampone citrato ogni giorno, per 5 giorni consecutivi. La glicemia è stata misurata il giorno prima dell'inizio del protocollo di trattamento e misurata nuovamente 1, 2 e 3 settimane dopo le iniezioni di STZ, utilizzando un sistema di monitoraggio della glicemia (FreeStyle Optium Neo, Abbott, Illinois). Gli animali sono stati classificati come diabetici per valori di glucosio nel sangue superiori ai 250 mg/dl ed esclusivamente i topi diabetici sono

stati sottoposti al successivo test della piastra calda. Tutti i confronti sperimentali tra topi diabetici e non diabetici sono stati effettuati 3 settimane dopo la somministrazione di STZ. Un totale di 24 topi CD-1 sono stati divisi in maniera casuale in due gruppi: 8 topi nel gruppo di controllo e 16 topi nel gruppo STZ. 1 ora prima del test, i topi del gruppo STZ sono stati divisi casualmente in 2 gruppi uguali, uno dei quali ha ricevuto la somministrazione intraperitoneale di DEX (10mg/Kg).

Il test della piastra calda è stato condotto come descritto in letteratura<sup>321</sup>. I topi sono stati collocati in una camera di osservazione in plexiglass sopra la piastra calda (Hto/cold plate, Ugo Basile, Milano, Italia). Gli animali sono stati fatti acclimatare sulla piastra ad una temperatura di 28°C per 15 minuti. La temperatura della piastra durante il test è stata impostata a 50°C con un cut-off di 30 secondi, al fine di evitare i danni tissutali derivanti da un'esposizione prolungata all'alta temperatura. Ogni topo è stato rimosso dalla piastra calda quando si è verificata una risposta di fuga saltando o dopo essersi leccato le zampe posteriori. Il periodo intercorso tra l'inizio del test e la risposta dell'animale (o il raggiungimento del cut-off) è stato considerato come indice del dolore provato dall'animale.

### Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando il programma di rianalisi Winltp 1.11 e il pacchetto software Graphpad prism (versione 4.0; software Graphpad, San Diego, CA, USA). Tutti i dati numerici sono espressi come media  $\pm$  SEM. La distribuzione della normalità dei dati è stata valutata prima con il test di normalità Shapiro-Wilk e poi è stato applicato il t-test di Student accoppiato a due code o il test Mann-Whitney. Le differenze sono state considerate significative per  $p < 0,05$ .

## Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di

### MOH

#### Animali

In questo studio sono stati utilizzati ratti del ceppo Wistar di sesso femminile con un peso compreso tra 230 e 250 g (Charles River, Milano, Italia). Gli animali, secondo le attuali

normative, sono stati stabulati in un numero massimo di tre esemplari per gabbia, in un locale climatizzato ad una temperatura costante di  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un ciclo luce/buio di 12 ore, con libero accesso a cibo e acqua. Tutte le manipolazioni degli animali sono state eseguite secondo le linee guida della Comunità Europea per la cura degli animali (DL 116/92, applicazione della Direttiva 86/609/CEE del Consiglio della Comunità Europea).

### Trattamento farmacologico

I ratti sono stati trattati quotidianamente per via orale, per 30 giorni consecutivi, con 0,8 mg/kg di eletriptan (ELE) e 2 mg/kg di indometacina (INDO) solubilizzati in 100  $\mu\text{L}$  di acqua. Gli animali di controllo hanno ricevuto un pari volume di acqua. Entrambi i farmaci sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Gli animali trattati quotidianamente con gli inibitori HDAC hanno ricevuto una dose pari a 2,5 mg/Kg di panobinostat (PAN) o givinostat (GIV) per via orale a partire dal 15 giorno dall'inizio del trattamento con il farmaco antiemivico.

Alla fine dei trattamenti, i ratti sono stati anestetizzati con isoflurano e sacrificati per l'estrazione dei tessuti. Il ganglio del trigemino e i DRG toracici sono stati rimossi e congelati in Trizol al  $-80^{\circ}\text{C}$  per l'estrazione di RNA.

### Analisi mediante gene array

Le fasi di marcatura e ibridazione sono state eseguite secondo il protocollo Agilent 2-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis versione 5.7.

L'insieme degli RNA estratti dai gangli trigeminali dei ratti trattati con ELE o INDO è stato confrontato con l'RNA di riferimento ottenuto dalla messa in comune di pari quantità di RNA da animali di controllo, sul genoma intero di ratto Agilent 8x60K array 8x60K.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software Cluster 3.0 e Treeview. L'analisi dei pathways è stata effettuata con il software GO-Elite, versione 1.2, utilizzando come dati di input l'elenco dei geni espressi differenzialmente da ogni confronto, impostando una soglia pari a 3 e una significatività statistica pari a 0.05.

## Analisi mediante rt-PCR

L'RNA totale estratto dai gangli trigeminali e quello estratto dai DRG toracici è stato isolato utilizzando il Trizol Reagent (Life Technologies, Monza, Italia).

Il processo di retrotrascrizione e l'amplificazione mediante PCR real time sono state eseguite come riportato in letteratura. Per l'amplificazione dei singoli geni sono stati utilizzati i primers della seguente tabella:

<b>GENE</b>	<b>FORWARD</b>	<b>REVERSE</b>
VIP	5'-CAGTTCCTGGGCGGATCCTGACA-3'	5'-GGGGCGTGTTCATTCTCCGCTAAGG-3'
PACAP	5'-TCAGTTCCTCCGGGATCAGACC-3'	5'-GGGTCCAAGACACTTTGGGGGTAGGGCTT-3'
CGRP $\alpha$	5'-GGCATGCGGGGCCCTCCAGGCAG-3'	5'-AGAGCCCCCTCAGCCTCCTGTTGTTCCCT-3'
SST	5'-AAGTCTCTGGGCGGGGCGCTGCCACC-3'	5'-GCAGCCAGCTGTTGCGTTCCCCG-3'
TRPV1	5'-GCCATGCTCTCAATCTGCACATTGGGG-3'	5'-GCTCCATTCTCCACCAAGAGGG-3'
5HT1B	5'-CATCTCTGTGCATCGCCCCCGGACGGAC-3'	5'-CGTGGTCGGTGTTCACAAGCAGT-3'
5HT1D	5'-CGAGGAGGAGATGTCTGACTGCCCTGGTGGT-3'	5'-CAGAGAGCCCGTCGATAAGCTGTGGTGCTG-3'
COX1	5'-GGCCTCGGACCACTACCAATGGTGAC-3'	5'-AGTACCAGGCGCGCATGAGTACTTACCTCG-3'
COX2	5'-GCCGGGGTCTGATGATGATGATGATGC-3'	5'-TGGAA-CAGTCGGCTCGTCATCCATCC-3'
18S	5'-GGGGAATCAGGGTTCGTTTCGATTCCGGG-3'	5'-GGCACCAGACTTGCCCTCAATGG-3'
RAMP1	5'-CTCACTGCACCAAACCTCGTGGCAAAC-3'	5'-CACCAGGGCAGTCATGAGCAGTG-3'
CLR	5'-CCTGTGAGCTGCAAGGTGTTCCA-3'	5'-GTAATACAAGCTTCTGGCGATGGCATG-3'
RCP	5'-CAGCAATGAAGAGCCACAAGCTGACC-3'	5'-TTTGCTCTGCTCATCCTCTGGACCTG-3'

## Test comportamentali

I differenti test comportamentali sono stati svolti da un operatore in cieco. Il giorno del test gli animali sono stati portati nella stanza in cui si sarebbe tenuto il test almeno 1 ora prima test.

### Valutazione dell'allodinia meccanica

Per testare l'allodinia cutanea sia a livello periorbitale sia a livello periferico sono stati utilizzati i filamenti di Von Frey, seguendo il metodo *Up and Down*, come già riportato in letteratura. Brevemente gli animali sono stati fatti ambientare in un apparato di contenimento progettato per la valutazione dell'allodinia meccanica. L'apparato consiste in una gabbia in plexiglass trasparente (10A x 10L x 15L cm) con due aperture per consentire all'operatore di accedere all'area periorbitale. Lo spazio a disposizione dell'animale

consente il suo movimento. Nei tre giorni precedenti al test gli animali sono stati posti all'interno dell'apparato in modo che vi si abituassero. La PMA è stata valutata nella regione periorbitale sopra la porzione rostrale dell'occhio (cioè l'area della regione periorbitale rivolta verso il rostro sfenoidale), mentre quella a livello periferico è stata valutata sul palmo di una delle zampe posteriori.

### Valutazione dell'iperalgia e Grimace Score

La valutazione dell'iperalgia orofacciale è stata condotta mediante iniezione sopraorbitale di una bassa concentrazione di formalina (0,2%, 20  $\mu$ L).

Subito dopo le iniezioni periorbitali, i ratti sono stati collocati all'interno della gabbia di plexiglass e il tempo trascorso a grattare la regione iniettata consistente in un periodo iniziale di breve durata (0-10 minuti) seguito da una seconda fase tonica (10-60 minuti) è stato monitorato con un cronometro manuale e considerato come indicativo del dolore provato dall'animale. Contemporaneamente è stata compilata una tabella in modo da assegnare un grimace score (GS), ovvero una valutazione del dolore provato dall'animale che si basa su un punteggio oggettivo e in cieco delle espressioni facciali.

La valutazione dell'allodinia è stata fatta al termine del protocollo di trattamento e successivamente è stata valutata l'iperalgia a livello periorbitale.

### Rilascio di CGRP e aumento del flusso dermico indotto da capsaicina

Per misurare il rilascio di CGRP indotta da capsaicina, i ratti hanno ricevuto un volume pari a 10 $\mu$ L di una soluzione 10mM di capsaicina (Sigma Aldrich, Milano, Italia) sulla lingua e dopo 3 minuti è stato prelevato il sangue dalle vene sublinguali. La quantità di CGRP presente nei campioni è stata quantificata mediante kit ELISA (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, Francia).

Per la valutazione della variazione del flusso dermico (DBF) in risposta a capsaicina abbiamo utilizzato un eco-doppler Perimed PeriFlux 5000 equipaggiato con probe 407. Brevemente, il doppler è stato fissato mediante apposito holder sul padiglione auricolare dell'animale sedato ed è stato registrato il flusso basale. Senza interrompere la registrazione è stata applicato 1mg di capsaicina disciolto in un volume di 20  $\mu$ L sulla cute intorno doppler ed è

stato monitorato il DBF per la successiva mezzora. La variazione del flusso è stata espressa in percentuale rispetto al valore basale di ogni animale.

### Valutazione della fotofobia

Per valutare la sensibilità alla luce abbiamo utilizzato un apparato adibito al dark/light test con alcune modifiche. In una delle due camere abbiamo lasciato una luce naturale mentre nella seconda camera abbiamo messo una luce forte (200 LUX). Gli animali sono stati posti nell'apparato per 10 min. nei due giorni precedenti il giorno del test. Il giorno del test gli animali sono stati portati un'ora prima nella stanza in cui si sarebbe svolto il test. Una volta posto nell'apparato, i movimenti dell'animale sono stati monitorati e registrati mediante videocamera (GoPro Hero 3+, GoPro Inc., USA). Per valutare l'avversione alla luce forte è stato quantificato il tempo speso nell'ambiente con la luce più forte, sulla durata totale del test (10 min.).

### Analisi statistica

Tutti i dati numerici sono espressi come  $media \pm SEM$ . Per ogni singolo gene, le differenze nei livelli di espressione sono state valutate statisticamente confrontando i differenti gruppi sperimentali utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) più il test Tukey post hoc. Nei test comportamentali i dati sono stati confrontati utilizzando il test ANOVA più il test Tukey post hoc.

# Risultati

## Studio dell'effetto del dexpramipexolo in modelli animale di dolore acuto e cronico.

### Il dexpramipexolo è in grado di inibire la corrente veicolata dai Nav 1.8 nei neuroni DRG

La prima parte di questo studio è stata quella di analizzare l'effetto del DEX sulle correnti al sodio isolate nei neuroni DRG di ratto in coltura. Come mostrato in Figura 13A e B, la superfusione con DEX ha ridotto reversibilmente l'ampiezza della corrente di sodio, mostrando un IC50 di 294,4 nM (CI: 122,3 - 709,1 nM) (Figura 13C). I grafici I-V plot mostrano che il DEX è stato in grado di ridurre le correnti di sodio in tutti i potenziali di membrana testati (Figura 13D, E). Il DEX non ha alterato i parametri di attivazione/inattivazione dei canali al sodio nei neuroni DRG. In particolare, l'attivazione semi-massimale ( $V_{1/2}$ ) è stata di  $-31,4 \pm 0,7$  mV (pendenza  $2,3 \pm 1$  mV) e di  $-31,3 \pm 0,9$  mV (pendenza  $3,9 \pm 1,8$  mV), mentre l'inattivazione semi-massimale ( $V_{1/2}$ ) è stata pari  $-35,0 \pm 0,5$  mV (pendenza  $3,3 \pm 0,4$  mV) e  $-35,3 \pm 0,8$  mV (pendenza  $3,9 \pm 0,4$  mV) rispettivamente nei neuroni di controllo e neuroni trattati con DEX ( $p > 0,05$ , t-test dello studente accoppiato,  $n=4$ ) (Figura 13F). Questi risultati indicano la capacità di DEX di modulare le conduttanze del sodio senza interferire con la voltaggio-dipendenza del canale. È noto che i DRG di dimensione ridotta esprimono sia correnti al sodio con cinetiche veloci, che si inattivano rapidamente, sensibili alla TTX (TTX-S) (per lo più veicolate dai canali Nav1.7), sia conduttanze al sodio con cinetiche lente, che si inattivano lentamente, resistenti alla TTX (TTX-R) (per lo più a carico dai canali Nav1.8)<sup>300</sup>. Come mostrato nella Figura 13G-I, DEX riduce l'ampiezza della corrente al sodio anche in presenza di TTX, suggerendo così un impatto di DEX sui canali al sodio TTX-R. Su queste basi, abbiamo valutato l'effetto di DEX sui neuroni DRG prelevati da topi wildtype o Nav1.8-null. Abbiamo isolato le correnti Nav1.8 imponendo un potenziale di membrana di -70 mV, inattivando le correnti Nav1.9 e abbiamo aggiunto la TTX alla soluzione di perfusione per bloccare tutte le correnti al sodio sensibili alla tossina<sup>322</sup>. Questi esperimenti ci hanno mostrato che DEX è in grado di ridurre le conduttanze al sodio TTX-R nei DRG wildtype (Figura 13J) ma non ha nessun effetto sulle



correnti al sodio nei neuroni DRG dei topi Nav1.8-null (Figura 13K). Successivamente, abbiamo isolato le correnti Nav1.9 nei neuroni DRG dei topi Nav1.8-null, imponendo un potenziale di -100 mV in presenza di TTX<sup>322</sup>. In queste condizioni, il DEX non ha influenzato le correnti Nav1.9.

Nel complesso, questi risultati suggeriscono una selettività del DEX verso i canali Nav1.8. Come ulteriore prova, abbiamo anche testato gli effetti del DEX sui canali Nav1.7 trasfettati nelle cellule HEK293<sup>323</sup>, e anche in questo caso il DEX non ha mostrato nessun effetto sull'ampiezza della corrente di sodio Nav1.7 (Figura 13L).

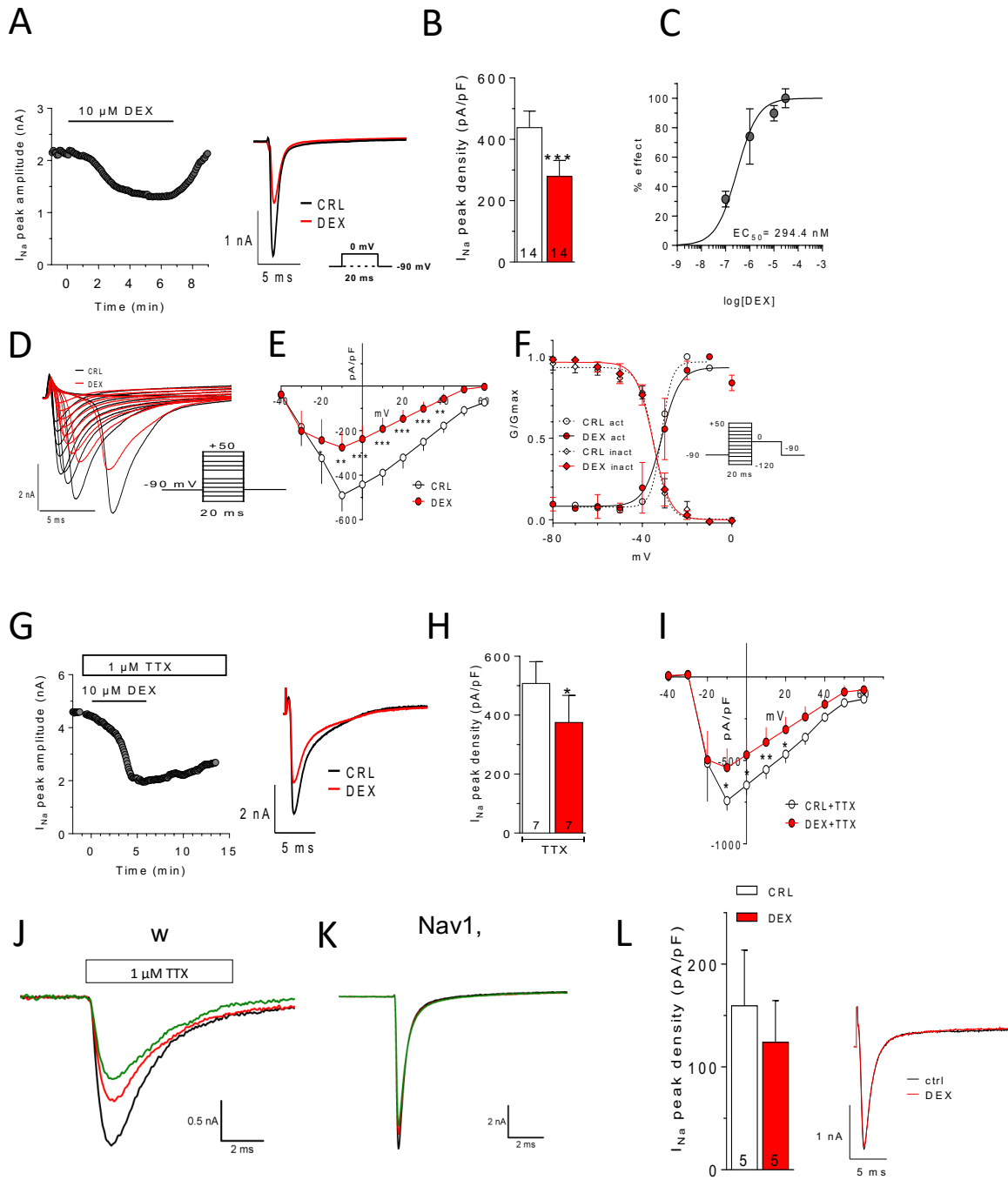


Figura 13 - Blocco delle correnti Nav1.8 nei neuroni DRG di topo e ratto. (A) Time course dell'ampiezza della corrente di sodio (pannello sx) e delle tracce di corrente originali (pannello dx) registrate in un DRG di ratto con la tecnica del patch clamp, prima, durante e dopo l'applicazione di 10  $\mu$ M DEX. (B) Dati aggregati delle correnti  $I_{Na}$  misurate prima o dopo 5 minuti di applicazione di 10  $\mu$ M DEX in 14 celle testate.  $***p < 0,0001$ , t-test dello studente accoppiato. (C) Curva concentrazione-effetto del DEX sulle correnti  $I_{Na}$  nei neuroni DRG di ratto (limite di confidenza: da 122,3 a 709,0 nM). (D) Tracce originali  $I_{Na}$  evocate mediante step di voltaggio prima o dopo l'applicazione di 10  $\mu$ M DEX in un neurone DRG di ratto. (E) Rapporti medi tra corrente e tensione delle correnti di picco  $I_{Na}$  prima o dopo l'applicazione di 10  $\mu$ M DEX in 12 celle testate.  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ , t-test di Student. (F) Le curve di attivazione e inattivazione delle correnti  $I_{Na}$  con l'applicazione di 10  $\mu$ M DEX. (G) L'andamento temporale degli effetti di 10  $\mu$ M DEX in presenza di 1  $\mu$ M di TTX su correnti  $Na^+$  (pannello sx) e tracce delle  $I_{Na}$  originali (pannello dx) registrate in un neurone DRG di ratto prima, durante e dopo l'applicazione di DEX. (H) Dati agglomerati di correnti  $I_{Na}$  misurate prima o dopo (5 min) 10  $\mu$ M DEX in 7 celle testate in presenza di 1  $\mu$ M di TTX.  $*p < 0,05$ , t-test di Student. (I) Media dei rapporti corrente-tensione di  $I_{Na}$  evocati da step di voltaggio depolarizzanti e misurati prima o dopo l'applicazione di 10  $\mu$ M DEX in 5 cellule testate in presenza di TTX extracellulare (1  $\mu$ M).  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ , t-test di Student. (J) Correnti rappresentative Nav1.8 registrate in un tipico neurone DRG isolato da topi wild-type. Correnti Nav1.8 sono stati isolate mediante TTX extracellulare (1  $\mu$ M) e mantenendo il potenziale della membrana a -70 mV per consentire l'inattivazione dei canali Nav1.9 (K) Tracce  $I_{Na}$  registrate da neuroni DRG Nav1.8-KO con un potenziale di -120 mV per attivare l' $I_{Na}$  totale. Traccia nera: linea di base; traccia rossa: 10  $\mu$ M DEX; traccia verde: lavaggio. (L) Pannello di sinistra: insieme dei dati di  $I_{Na}$  registrati su cellule HEK293 trasfettate con Nav1.7 prima o dopo 5 minuti di applicazione di 10  $\mu$ M DEX.  $p = 0,0998$ , t-test di Student,  $n = 5$ . Pannello di destra: tracce  $I_{Na}$  registrate da HEK293 trasfettate con Nav1.7 in assenza (ctrl) o presenza di 10  $\mu$ M DEX.

## Analisi del docking molecolare

Ad ulteriore riprova della capacità di interagire con i canali Nav1.8 del DEX, abbiamo poi effettuato uno studio di docking molecolare. Poiché attualmente non esistono le strutture cristalline del canale Nav1.8 umano, abbiamo adottato un *Homology model* (ovvero una predizione della struttura terziaria del canale Nav1.8 modellata sui dati dell'isoforma Nav1.4) costruito utilizzando il server SWISS-MODEL e mantenuto nel repository corrispondente [<https://swissmodel.expasy.org>]<sup>324</sup> e il programma di docking LeDock (vedi Metodi). Abbiamo prima controllato le possibili posizioni di docking del DEX su tutta la porzione transmembrana della proteina umana Nav1.8 e abbiamo trovato una tendenza della molecola a legarsi esclusivamente all'interno del poro del canale (Figura 14A). Abbiamo quindi limitato, mediante software, la regione di aggancio al poro e abbiamo trovato 11 distinti cluster di possibili pose. Da notare che la posa più probabile (più di 40 pose su 100 percorsi, -4,77 Kcal/mol come energia di interazione) e rappresentativa all'interno del poro che viene mostrata in Figura 14C, si trova vicino ai residui di Phe1710, Gln355, Thr1658, Ser1660, Ser1660, Ile1706 e Ser1709, con un aminoacido addizionale, Tyr1717, che crea un legame di idrogeno con il gruppo di amminoacidi della catena laterale del DEX (Figura 14C). Inoltre, Phe1710 è il residuo chiave legato sia dalla tetracaina, bloccante non specifico dei canali Nav, ma anche dell'A-8034637, bloccante selettivo per il canale Nav1.8 e la cui mutagenesi altera l'inattivazione del canale da parte dei due composti<sup>325</sup>. Di conseguenza, è stata trovata una posa di legame sovrapposta per DEX e A-8034637 sui canali Nav1.8 (Figura 14D ed E).

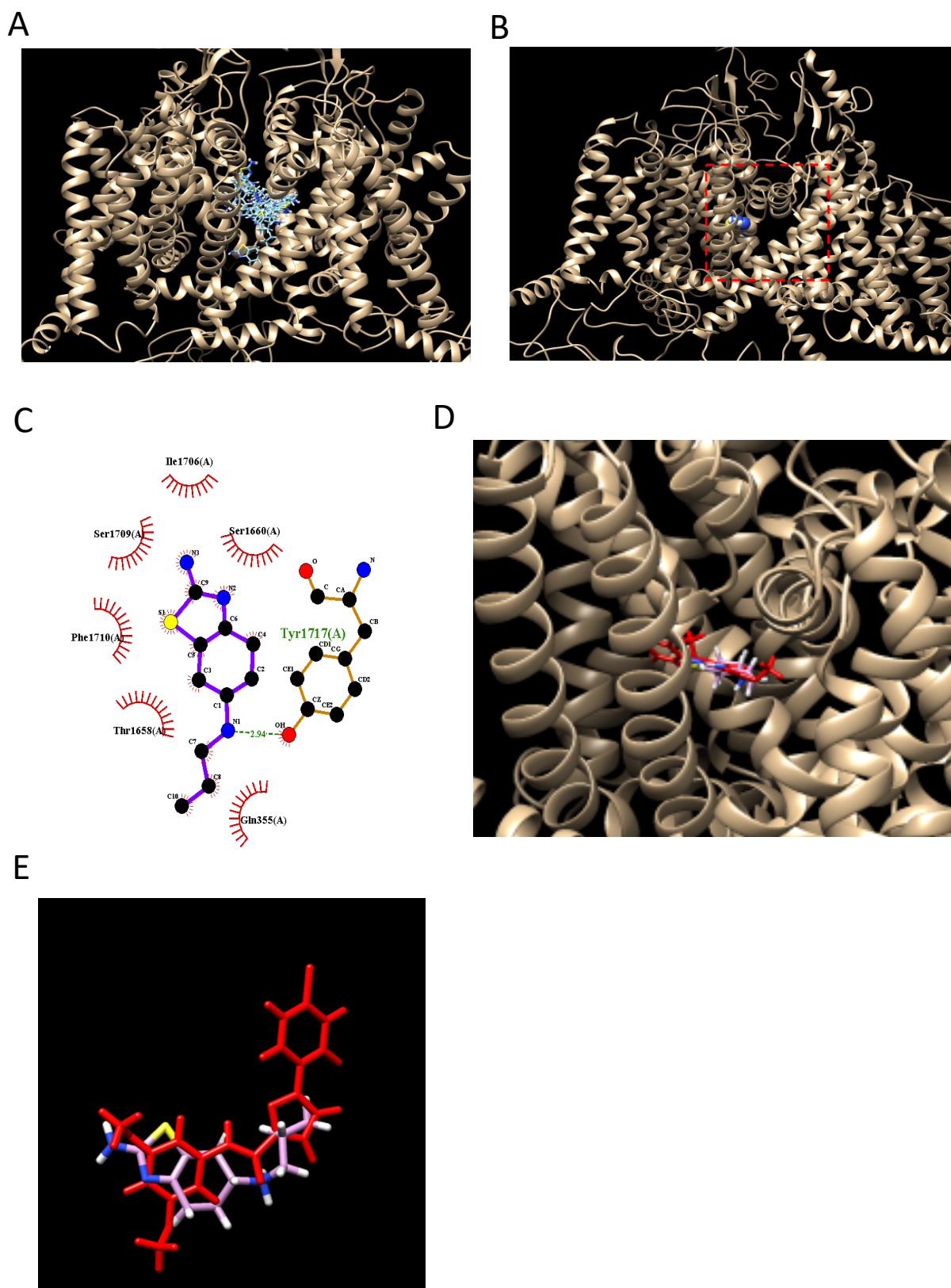


Figura 14 - Interazione del DEX con canale Nav1.8 umano. (A) possibili posizioni del docking del DEX nel modello del canale Nav1.8 umano (vista laterale). (B) Binding del DEX nel poro interno del canale Nav1.8 umano. (C) Diagramma LigPlot dell'interazione del DEX. Sono evidenziati gli aminoacidi che interagiscono con la molecola di DEX, il legame intermolecolare di idrogeno è rappresentato dalla linea tratteggiata. (D) Ingrandimento della figura (B) che mostra la modalità di legame prevista per il DEX e per il bloccante selettivo A-8034637 (in rosso). (E) Sovrapposizione di DEX (colori per tipo di elemento) e A-8034637 (colore rosso) nelle presunte migliori pose di aggancio all'interno del canale Nav1.8 umano.

## Il DEX non altera le correnti al sodio nei neuroni ippocampali e nei cardiomiociti

La scoperta della selettività del DEX verso i canali Nav1.8 senza influenzare i canali Nav1.7 nei neuroni DRG ci ha spinto a indagare se il farmaco bloccasse in maniera aspecifica anche le altre isoforme della famiglia Nav, non espresse a livello dei DRG. Le colture primarie dei neuroni ippocampali dei ratti esprimono tipicamente i canali Nav1.1, Nav 1.2, Nav 1.3 e Nav 1.6<sup>326</sup>. Abbiamo quindi testato gli effetti del DEX sulle correnti di sodio in questi neuroni e non abbiamo trovato alcun effetto del farmaco sulle conduttanze isolate (Figura 15A e B). Le correnti al sodio nei cardiomiociti sani sono veicolate principalmente dall'isoforma Nav1.5<sup>327</sup> anche se il contributo di Nav1.8 è ancora dibattuto<sup>299</sup>.

Il DEX, tuttavia, non ha alterato la densità di corrente di sodio (Figura 15C e D) né la cinetica di inattivazione (Figura 15E e F) nelle colture primarie di cardiomiociti ventricolari di topo. Collettivamente, questi risultati confermano la selettività del DEX sui canali Nav1.8.

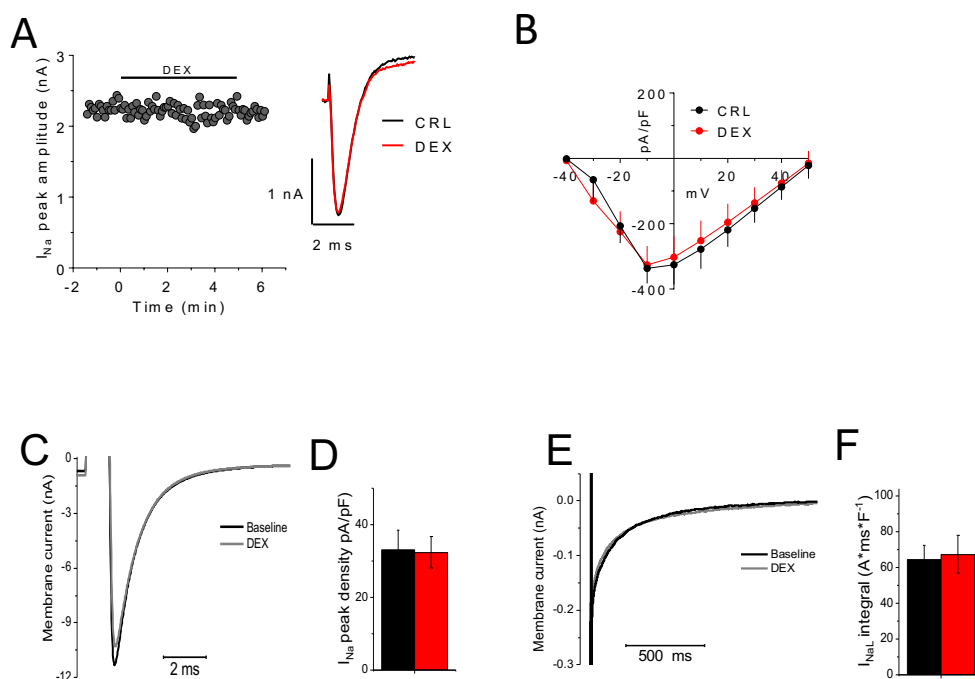


Figura 15 - Effetti del DEX nei neuroni ippocampali di ratto e nei cardiomiociti ventricolari di topo (A) Time course dell'ampiezza di corrente di picco del Na<sup>+</sup> misurata in un neurone dell'ippocampo di ratto in coltura. Pannello di destra: tracce rappresentative sovrapposte di correnti di Na<sup>+</sup> registrate nella stessa cellula prima (CRL) o dopo (DEX) l'applicazione di 10 $\mu$ M DEX. (B) Rapporto corrente-voltaggio della densità di corrente di picco del sodio misurata in assenza (CRL) o in presenza di 10  $\mu$ M DEX (DEX) (n= 6). (C) Tracce rappresentative delle correnti Na<sup>+</sup> registrate in un cardiomiocita ventricolare del topo, in assenza (Baseline) e presenza (DEX) di 10  $\mu$ M DEX. (D) Densità media di picco I<sub>Na</sub> in assenza e presenza di DEX. (E) Tracce rappresentative della corrente Na<sup>+</sup> registrate in assenza e presenza di 10  $\mu$ M DEX e focalizzate sulla fase di inattivazione (corrente di sodio tardiva, I<sub>NaL</sub>). (F) Integrali di densità I<sub>NaL</sub> media, calcolata da 25 a 750 ms dopo l'inizio di una fase di depolarizzazione di 2s da -120mV a -10mV registrata in assenza e presenza di 10  $\mu$ M DEX. (D) e (F) rappresentano la media $\pm$ S.E.M. di 12 cardiomiociti derivanti da 4 topi.

## Effetto del DEX nei modelli animali di dolore nocicettivo

La capacità del DEX di bloccare le conduttanze Nav1.8, insieme al fatto che i bloccanti Nav1.8 inducano una condizione di analgesia<sup>299</sup>, ci ha spinto a verificare se il DEX fosse efficace in differenti modelli animali di dolore. A tal fine, abbiamo prima valutato il composto nel test della formalina come modello di dolore nocicettivo/infiammatorio. Il DEX è stato somministrato alla dose di 3 e 10 mg/kg o per via i.p. o per os, coerentemente con i regimi di dosaggio già adottati e ben tollerati nei pazienti arruolati durante gli studi clinici (150 mg, bid)<sup>305,306,328</sup>. Come mostrato nella Figura 16A, DEX ha ridotto il dolore percepito dall'animale durante la fase acuta che segue l'iniezione di formalina sottodermica solo quando somministrato per via orale alla dose di 10 mg/kg. L'effetto analgesico è risultato paragonabile a quello indotto dalla stessa dose di indometacina somministrata via i.p. ed utilizzata come controllo positivo. Inoltre, durante la seconda fase del test (tipicamente caratterizzata da dolore infiammatorio)<sup>329</sup>, l'analgesia indotta dal DEX è dose-dipendente sia quando somministrato per os sia i.p. Anche in questo caso, l'effetto analgesico è paragonabile a quello di una dose identica di indometacina (Figura 16B). Successivamente, alla luce del ruolo dei canali Nav1.8 nel contribuire alla fase ascendente del potenziale d'azione potenziale nei terminali periferici dei neuroni primari sensoriali<sup>330</sup>, ci siamo chiesti se il DEX fosse in grado di indurre analgesia anche quando somministrato per via topica. Così, 10 minuti prima dell'iniezione di formalina, il DEX è stato iniettato per via intradermica (20, 70 o 140 µg/20 µl) direttamente nella zampa posteriore destra del topo, mentre la zampa controlaterale ha ricevuto lo stesso volume di soluzione fisiologica. Gli animali di controllo hanno ricevuto prima la soluzione salina e poi la formalina in entrambe le zampe posteriori (vedi Figura 16C). I topi del gruppo di controllo hanno passato lo stesso tempo a mordere/leccare la zampa posteriore destra o sinistra sia nella fase iniziale che in quella finale (Figura 16D ed E), indicando un'identica gravità del dolore delle due zampe. Al contrario, i topi trattati con DEX (alle dosi di 70 o 140 µg) in una sola delle due zampe, non hanno mostrato alcuna preferenza per la zampa nella fase iniziale del dolore (Figura 16D), ma hanno invece passato più tempo a mordere/leccare la zampa trattata con il veicolo piuttosto che la zampa pretrattata con il DEX nella fase finale del test (Figura 16E). Nell'insieme, questi risultati hanno indicato che un'azione periferica contribuisce, almeno in parte, all'analgesia indotta dal DEX nel dolore di tipo

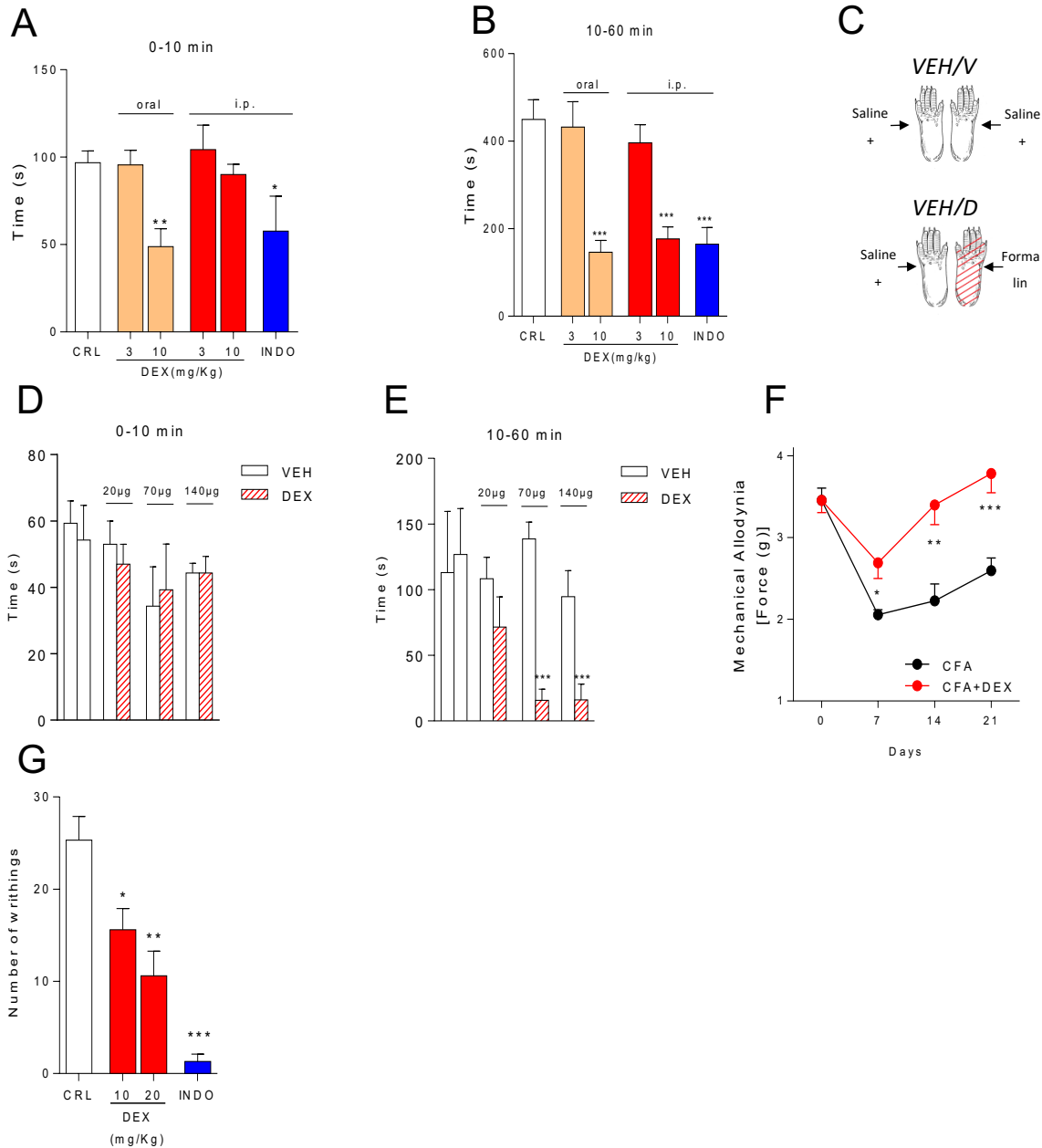


Figura 16 - Effetti del DEX in modelli animali di dolore nocicettivo. Effetti del DEX (3 o 10 mg/kg per os o i.p., 1 h prima del test) o dell'indometacina (INDO, 10 mg/kg, i.p., 1 h prima del test) sulla fase del dolore (A) acuta (0-10 min) e (B) ritardata (10-60 min) provocata nei topi mediante iniezione di formalina (20 µl di 0,5%) nella zampa posteriore destra. Il dolore è stato misurato come il tempo totale trascorso nel mordere la zampa iniettata. (C) Disegno schematico che rappresenta il protocollo di somministrazione topica di DEX o salina trattata nella zampa posteriore destra e sinistra prima dell'iniezione di formalina (20 µl di 0,5%). Effetti del pretrattamento mostrato in (C) sul tempo totale trascorso nel mordere/sgonfiare le zampe posteriori iniettate in formalina pretrattate o meno con iniezione subdermica di DEX (20, 70 o 140 µg/20 µl) o veicolo (VEH, 20 µl di soluzione salina) durante la fase acuta (0-10 min, D) o ritardata (10-60 min, E). (F) Effetti dell'iniezione sottocutanea di 20 µl di soluzione salina o DEX (70 µg/20 µl) su allodinia della zampa posteriore provocata nei topi con artrite cronica a causa dell'iniezione del coadiuvante completo di Freund (CFA) nella caviglia corrispondente. L'allodinia della zampa è stata misurata con il test di von Frey nei punti temporali indicati, DEX è stato somministrato 10 minuti prima del test il giorno 7, 14 e 21. (G) Effetti del DEX (10 o 20 mg/kg, i.p.) o dell'indometacina (INDO, 10 mg/kg, i.p.) sul dolore viscerale valutato mediante il test di scrittura. Ogni colonna/punto rappresenta la media ± SEM di almeno due esperimenti con almeno 6 animali per gruppo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , t-test di Student.

infiammatorio. Per corroborare la capacità del farmaco di ridurre il dolore infiammatorio, abbiamo anche valutato i suoi effetti nei topi affetti da artrite cronica. Anche in questo caso, l'iniezione subdermica di DEX (70µg/20µl) 10 minuti prima della valutazione dell'allodinia della zampa ha ridotto le soglie di allodinia meccaniche in tutti i punti

temporali testati (Figura 16F). Nel complesso, i nostri risultati hanno indicato che il dolore infiammatorio, sia acuto che cronico, può essere modulato dal DEX sia quando somministrato per via sistemica sia per via topica.

Abbiamo poi cercato di confermare gli effetti analgesici del DEX testando il farmaco nel writhing test, un modello di dolore viscerale acuto. Come mostrato nella Figura 16G, il DEX ha ridotto significativamente il numero di stiramenti addominali in modo dose-dipendente, mostrando un effetto analgesico anche se inferiore a quello offerto da una dose simile di indometacina.

### Effetto del DEX in modelli animali di dolore neuropatico

Il dolore provato dai pazienti durante la chemioterapia è una forma comune di dolore neuropatico nei pazienti neoplastici e rappresenta un'esigenza terapeutica tuttora insoddisfatta. I composti del platino sono tra i farmaci chemioterapici che causano più frequentemente sia la neuropatia periferica che quella centrale<sup>331</sup>. Abbiamo quindi testato gli effetti analgesici del DEX in un modello murino di neuropatia indotta dall'oxaliplatino, adottando programmi di trattamento sia acuti che cronici. In linea con il lavoro precedente<sup>320</sup>, l'iniezione intraplantare di oxaliplatino ha provocato un tipico condizione di allodinia, evidenziato dall'attività di licking/flinking della zampa iniettata durante il test della piastra fredda (Figura 17A), mentre nessuna manifestazione di dolore è stata osservata negli animali del gruppo controllo, dopo aver ricevuto un'iniezione di soluzione fisiologica intraplantare (dato non mostrato). L'iniezione i.p. di DEX 30 min prima della somministrazione di oxaliplatino ha ridotto l'allodinia in tutti i punti temporali valutati (Figura 17A). Inoltre, quando il DEX è stato somministrato adottando lo stesso schema di pretrattamento ma per via sottocutanea (70 µg/20µl,) l'effetto analgesico è stato più marcato nella prima fase ma ha mostrato un minore durata d'azione (Figura 17A), spiegabile con la rapida redistribuzione del farmaco nei tessuti. Da notare che l'iniezione intraperitoneale di DEX alla dose di 10 mg/kg ha anche ridotto l'allodinia al freddo nei topi esposti cronicamente all'oxaliplatino (Figura 17B). In questo modello di dolore, abbiamo valutato nel tempo l'effetto di una dose identica (10 mg/Kg) di DEX somministrato per via orale, trovando che l'effetto analgesico era paragonabile a quello indotto dall'iniezione intraperitoneale, con una durata di circa 3 ore dopo la somministrazione (Figura 17C).



Per dimostrare ulteriormente il potenziale analgesico del DEX nel dolore neuropatico, abbiamo anche valutato gli effetti del DEX in un modello di neuropatia meccanica, mediante la legatura del nervo sciatico, valutando l'allodinia meccanica cutanea nella zampa posteriore corrispondente. La Figura 17D mostra che DEX (10 mg/kg i.p., 1h prima del test) ha ridotto l'allodinia meccanica cutanea della zampa con la legatura. Infine, alla luce della rilevanza clinica del dolore neuropatico per i pazienti diabetici, abbiamo anche testato il farmaco in un modello murino di neuropatia diabetica. Anche in questo modello DEX (10 mg/kg, i.p., 1 ora prima del test) (Figura 17E) è risultato efficace nel ridurre l'allodinia misurata mediante il test della piastra calda, effettuato ad un mese di distanza dalla somministrazione di STZ.

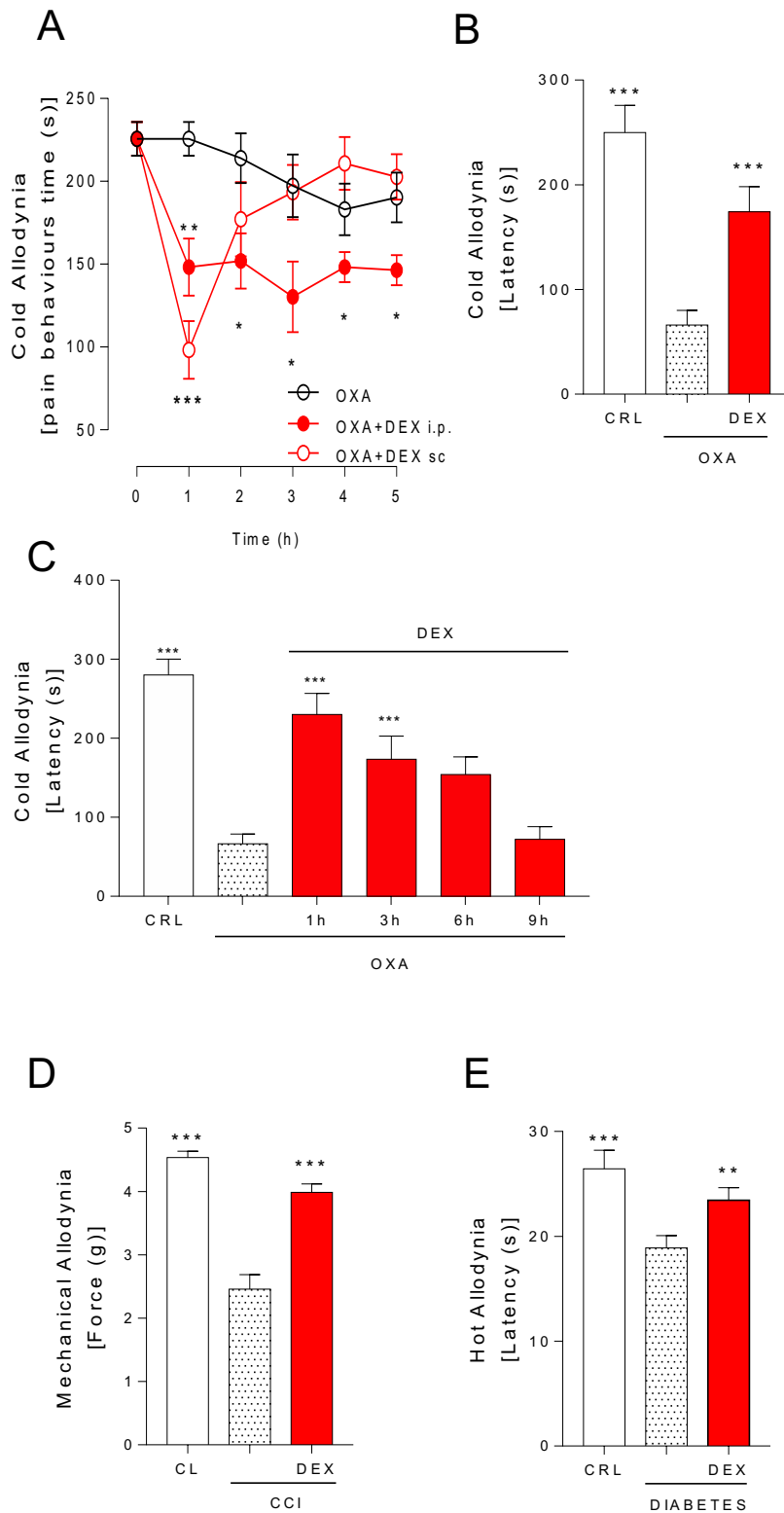


Figura 17 - Effetti del DEX in modelli animali di dolore neuropatico. (A) Effetti del DEX sull'allodinia al freddo indotta dall'iniezione subdermica di oxaliplatino (OXA, 40  $\mu$ g/20  $\mu$ l) misurata mediante il test della piastra fredda (CPT). Il dolore è stato misurato come il tempo totale trascorso nel leccare/agitare la zampa iniettata di OXA. DEX è stato somministrato sia per iniezione sistemica (10 mg/kg, i.p., 30 min dopo OXA intraplantare) che topica (70  $\mu$ g/20  $\mu$ l, 50 min dopo OXA intraplantare). L'allodinia è stata misurata ai tempi indicati. Effetto del DEX (10 mg/kg) sull'allodinia al freddo indotta dall'OXA (2,4 mg/kg i.p., vd metodi) nei topi trattati i.p. (B) o per os (C). DEX è stato somministrato 1 ora prima del CPT e, in caso di somministrazione orale, il comportamento correlato al dolore è stato valutato nel tempo a 1, 3, 6, e 9 ore dopo il trattamento. (D) Effetto del DEX sull'allodinia meccanica causata dalla costrizione cronica (CCI) del nervo sciatico nei topi. DEX è stato somministrato a 10 mg/kg, i.p., 1 ora prima del von Frey test. (E) Effetti di DEX su allodinia al caldo in topi diabetici trattati con streptozotocina. DEX è stato somministrato a 10 mg / kg, i.p. e allodinia valutata 1 h più tardi per mezzo della prova piastra calda. Ogni colonna/punto rappresenta la media  $\pm$  SEM di almeno due esperimenti con 5 animali per gruppo. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs OXA, ANOVA più il test di Tukey post hoc.18

## Studio degli effetti degli HDAC inibitori in un modello preclinico di

### MOH

#### Analisi mediante gene array dei gangli trigeminali

Per poter sviluppare un modello di MOH, abbiamo trattato quotidianamente per via orale ratti di sesso femminile appartenenti al ceppo Wistar con eletriptan (ELE) o indometacina (INDO) per un periodo totale di un mese. In questo studio, ELE è stato scelto perché rappresenta un triptano efficace e ampiamente utilizzato e che si caratterizza per una buona biodisponibilità in seguito alla somministrazione orale<sup>332</sup>, mentre l'INDO è stato selezionato tra i diversi FANS perché è uno dei farmaci antiemcranici più comunemente usati e spesso sovrautilizzato dai pazienti con MOH in formulazioni singole o in associazione ad altri farmaci. L'ELE è stato somministrato alla dose di 0,8 mg/kg, mentre l'INDO alla dose di 2 mg/kg, in modo da riprodurre negli animali, un moderato abuso nell'uomo, che ammonterebbe a 60 mg/giorno di ELE (tra 1 e 2 compresse da 40 mg) e 140 mg/giorno di INDO (tra 1 e 2 compresse da 100 mg/giorno) nei pazienti.

Il possibile impatto di entrambi i farmaci sul profilo di espressione genica nel ganglio del trigemino di ratto è stato valutato mediante l'analisi del trascrittoma. Successivamente al controllo qualità della sonda, dei 30.367 geni presenti sull'array, sono stati selezionati 27.297 e 28.393 geni rispettivamente per ELE e INDO. Per comprendere il grado di coerenza dei cambiamenti indotti dai due farmaci, abbiamo confrontato gli aspetti quantitativi e qualitativi dei risultati ottenuti utilizzando un valore soglia di variazione di 1,4 e 3. Come mostrato nella Figura 7, abbiamo trovato una coerenza negli effetti indotti dai due farmaci per entrambe le soglie di variazione scelte. In particolare, con una soglia di 1,4, il numero di geni indotti è risultato pari a 7664 (28,1%) per ELE e 6580 (23,2%) per INDO. Aumentando la soglia a 3, il numero di geni indotti è stato pari a 2043 (7,5%) per ELE e 1621 (5,7%) per INDO. In maniera analoga, il numero di geni la cui espressione è stata invece ridotta di 1,4 volte è stato pari a 7695 (28,2%) per ELE e 6898 (24,3%) per INDO, mentre con la soglia fissata a 3 il numero di geni ridotti è stato di 1719 (6,3%) per ELE e 1489 (5,2%) per INDO (Figura 18 A).

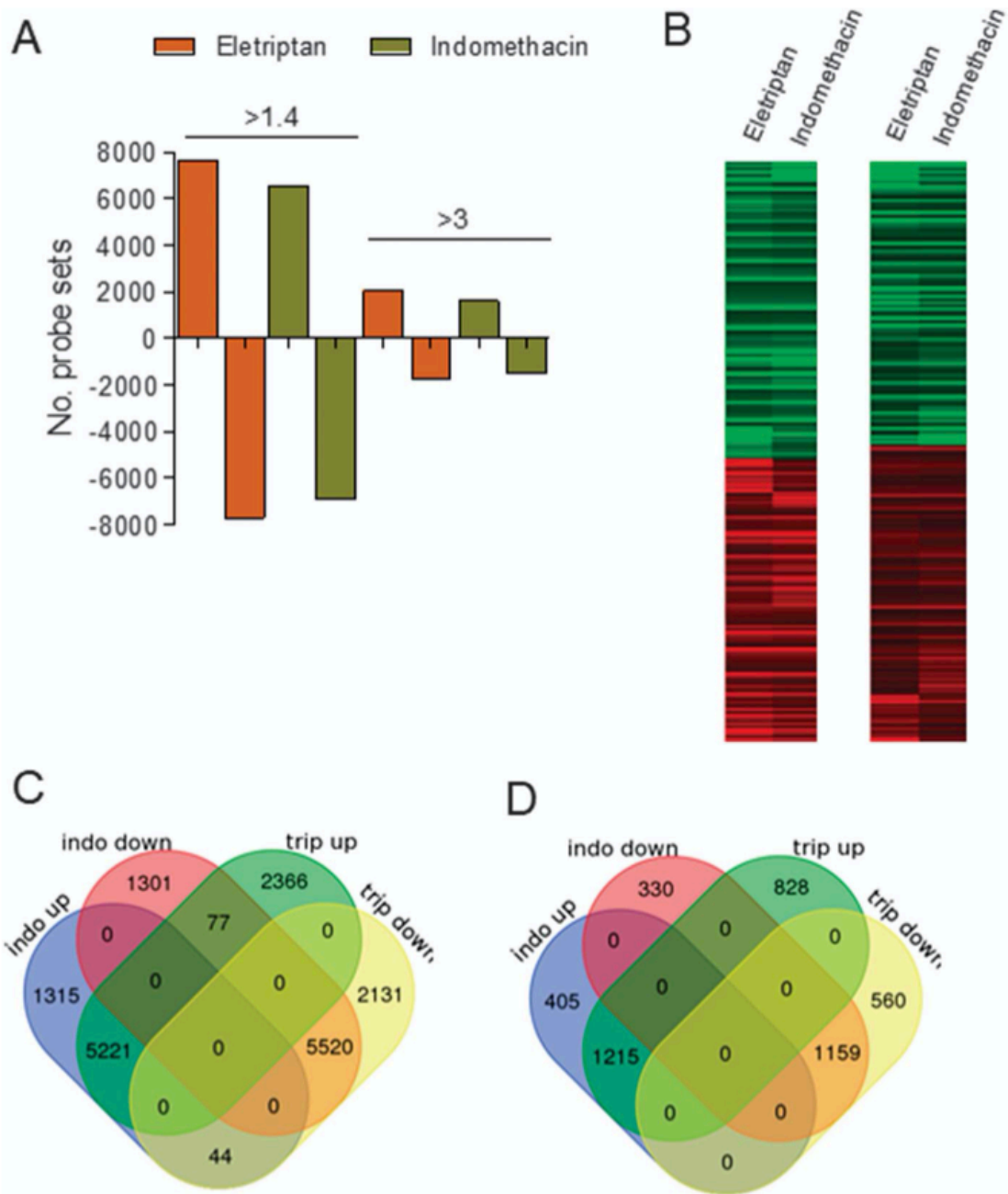


Figura 18 - Analisi trascrittomico del ganglio trigeminale in ratti esposti a trattamento cronico con ELE o INDO. (A) Il numero di geni trovati aumentato o diminuito di 1,4 o 3 volte per mezzo di analisi trascrittomico gene array trascrittomico nel ganglio del trigemino di ratti esposti un trattamento quotidiano della durata di 1 mese con ELE (0,8 mg / kg) o INDO (2 mg / kg) rispetto agli animali di controllo, come mostrato. Si notino i cambiamenti simili indotti dai 2 diversi trattamenti. (B) Analisi gerarchica eseguita sui geni del ganglio del trigemino che mostra un cambiamento di espressione di almeno 1,4 (a sinistra) o 3 (a destra) tra gli animali trattati (ELE o INDO) e di controllo. Geni in rosso = upregolati; geni verdi = downregolati. Si noti la corrispondenza tra i geni upregolati o downregolati nei ratti esposti all'ELE e INDO. Il diagramma di Venn mostra il numero di geni upregolati o downregolati, così come il grado di sovrapposizione tra gli effetti dei trattamenti farmacologici, nel ganglio trigeminale dei ratti esposti a ELE o INDO adottando una soglia di 1,4 (C) o 3 (D). ELE, ele triptan; INDO, indometacina.

Effettuando un'analisi gerarchica dei cluster, abbiamo scoperto che i geni up-regolati e down-regolati dall'ELE sono stati influenzati in modo simile dall'INDO. Da notare che i profili dei geni la cui espressione è stata alterata a livello del ganglio del trigemino, sono quasi identici con la soglia di 1,4 e 3 (Figura 18 B). Per confermare questa constatazione, abbiamo

analizzato i dati mediante diagramma di Venn, che descrive il grado di sovrapposizione delle variazioni trascrittomiche indotte dai due trattamenti farmacologici.

Il diagramma evidenzia come, con una soglia di 1,4, un gran numero di geni up-regolati o down-regolati dall'ELE sono stati influenzati in modo simile dall'INDO (Figura 18 C). Un alto grado di sovrapposizione è stato riscontrato anche quando la soglia è stata fissata a 3 (Figura 18 D). Viceversa, il ridotto numero di geni inversamente modulati trovati con la soglia di 1,4 si è annullato fissando una soglia di variazione pari a 3 (Figura 18 C e D), suggerendo un elevato grado di coerenza nella riprogrammazione genica all'interno del ganglio trigeminale.

Abbiamo poi eseguito un'analisi dei pathways a cui appartengono i geni la cui espressione è risultata alterata adottando una soglia pari a 3. Anche in questo caso si evidenzia una coerenza tra alcuni dei pathways alterati in maniera più significativa. In particolare, i pathways non affetti dal trattamento con ELE e INDO sono quelli coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e dei recettori nucleari, così come la via di segnalazione di Hedgehog, implicata nel processo di differenziazione cellulare. Tra i processi up-regolati da entrambi i trattamenti, abbiamo trovato i pathways di sintesi e regolazione della prostaglandina, i geni associati a lesioni del midollo spinale e la via di segnalazione relativa ai peptidi che agiscono sui recettori accoppiati con proteine G (Tabella 5 e 6).

Gene-set name	No. of altered genes	Total no. of genes	P	Gene symbols
Pathways downregulated				
Cell cycle: WP429	18	74	0.001	Bub1 Bub1b Ccn2 Ccnb1 Ccn2 Cdc6 Cdk1 Cdk4 Cdk6 Cdkn2a Esp1 Hdac7 Mad2 Mcm2 Mcm4 Mcm5 Mcm6 Pkm1
G1 to S cell cycle control: WP348	14	58	0	Ccnb1 Ccn2 Cdk1 Cdk4 Cdk6 Cdkn2a Creb3 Mcm2 Mcm4 Mcm5 Mcm6 Myc Myl1 Pole2
Hedgehog signaling pathway: WP574	5	17	0.014	Ccnb1 Cdk1 Gli2 Ihh Skt36
Nuclear receptors: WP217	7	36	0.014	ArlEsr1 Nr0b1 Nr5a1 Pgr Rorc Thrb
DNA replication: WP484	7	37	0.019	Cdc6 Mcm10 Mcm2 Mcm4 Mcm5 Mcm6 Pole2
Pathways upregulated				
Prostaglandin synthesis and regulation: WP303	7	24	0.002	Anxa8 Edn1 Ednrb Pla2g4a Ptger3 Ptgis Ptgs1
Spinal cord injury: WP2433	19	92	0.025	Aqp4 Ccl2 Cxcl1 Epha4 Gap43 Gfap Gja1 LOC102550316 Ltb Mag Ngfr Pla2g2a Pla2g5l PrkcalRho Selp Sema6a Vim Xylt1
GPCRs, class C metabotropic glutamate, pheromone: WP42	5	15	0.008	Gprc5a Gprc5b Gprc5c Grm4 Grm8
Keap1-Nrf2: WP1280	4	11	0.0075	Gsta2 Gsta5 Maf Nqo1 Prkca
Eicosanoid synthesis: WP293	5	16	0.006	Alox5 Pla2g2a Ptges Ptgis Ptgs1
Wnt signaling pathway and pluripotency: WP1288	16	80	0.0375	Fzd1 Lef1 Nkd1 Nkd2 Plau Ppm1 Jpp2r2b Prkcal Prkcd Prkcq Tcf7 Wnt1 Ob Wnt11 Wnt16 Wnt2b Wnt6
Peptide GPCRs: WP131	11	50	0.048	Ccr1 Oprm1 Ednrb Galr1 Npy1r Npy5r Oprk1 Oprl1 Tacr3 Sstr4 Oprl

ELE, eletriptan.

Tabella 5 - Geni up- e downregolati nei differenti pathways dopo il trattamento cronico con eletriptan

Gene-set name	No. of altered genes	Total no. of genes	P	Gene symbols
Pathways downregulated				
Cell cycle: WP429	14	74	0.001	Bub1 Bub1b Ccn2 Ccnb1 Cdc6 Cdk1 Cdk6 Cdkn2a Esp1 Mcm4 Mcm5 Mcm6 Pkm1 Skp2
G1 to S cell cycle control: WP348	10	58	0.003	Ccnb1 Cdk1 Cdk6 Cdkn2a Creb3l1 Mcm4 Mcm5 Mcm6 Myc Myt1
Hedgehog signaling pathway: WP574	4	17	0.022	Ccnb1 Cdk1 Gli2 Ihh
GPCRs, class B secretin-like: WP378	4	18	0.039	Cd97 Crrh1 Gcgrl Ghrhr
Nuclear receptors: WP217	6	36	0.0235	ArlEsr1 Nr0b1 Nr4a2 PgrlRorc
GPCRs, other: WP409	8	59	0.0385	Cckbr1 Celsr3 Drd4 Ghrhr Gnrhr Gpr143 Grm1 Rxfp1
Pathways upregulated				
Eicosanoid synthesis: WP293	6	16	0	Alox15 Alox5 Pla2g2a Ptges Ptgis Ptgs1
GPCRs, class C metabotropic glutamate, pheromone: WP42	5	15	0.0035	Gprc5a Gprc5b Gprc5c Grm3 Grm8
Prostaglandin synthesis and regulation: WP303	6	24	0.002	Anxa3 Anxa8 Ednrb Pla2g4a Ptgis Ptgs1
Matrix metalloproteinases: WP278	6	24	0.0025	Mmp13 Mmp14 Mmp15 Mmp19 Mmp2 Mmp23
Peptide GPCRs: WP131	10	50	0.001	Ccr1 Ccr6 Ednrb Gair1 Npy1r Npy5r Oprk1 Oprl1 Sstr4 Tac4
Spinal cord injury: WP2433	16	93	0.038	Aqp4 Ccl2 Fcgr2a Gfap Gja1 LOC102550316 ILtb Mag Ngfr Pla2g2a Pla2g5 PrkcalRhocl Sema6a Tnfsf13 Vim

INDO, indomethacin.

Tabella 6 - Geni up- e downregolati nei differenti pathways dopo il trattamento con indometacina

L'elevata corrispondenza dei geni upregolati e downregolati dai 2 farmaci antiemcranici, ci ha spinto a concentrarci sui livelli di espressione di specifici geni di rilevanza patogenetica per l'emicrania e la cefalea in generale (Figura 19). Ciò ci ha portato a scoprire che l'espressione dei geni che codificano per i neuropeptidi è stata alterata positivamente ed in maniera simile da ELE e INDO. In particolare, ELE e INDO hanno incrementato la trascrizione del gene codificante il CGRP $\alpha$  (Calca) rispettivamente di 4,52 e 3,90 volte. Incrementi maggiori sono stati registrati per il CGRP $\beta$  (Calcb) aumentato di 7,66 con ELE e 5,8 volte con INDO. La trascrizione di PACAP (Adcyap1) è aumentata nel ganglio del trigemino di 4,11 e 2,87 volte con ELE o INDO. VIP (Vip) è aumentato drasticamente negli animali esposti all'ELE e all'INDO di 17,15 e 30,88 volte, rispettivamente. Allo stesso modo, i livelli di trascrizione della sostanza P (Tac1) sono stati di 3,68 e 3,43 volte superiori al controllo nei ratti trattati con ELE e INDO. I livelli di mRNA di NPY (Npy) hanno mostrato un aumento di 5,91 volte con ELE e 5,67 volte con INDO. Per quanto riguarda la somatostatina (Sst), anche in questo caso abbiamo trovato che i livelli di trascrizione sono aumentati di 1,7 volte dal trattamento con ELE e di 1,68 volte da quello con INDO. Allo stesso modo, i livelli di trascrizione del precursore del neuropeptide ipocretino (Hcrt, che porta alla sintesi delle orexine A e B) sono stati ridotti sia dall'ELE (22,2 volte) che dall'INDO (21,82 volte). I livelli di trascrizione della subunità del recettore del CGRP, CLR, (calcitonin receptor-like receptor) non sono stati alterati da ELE, mentre il trattamento con INDO ha prodotto un aumento di 1,82 volte. Viceversa, i livelli di trascrizione dell'altra subunità recettoriale,

Ramp1, sono stati aumentati sia dall'ELE che dall'INDO rispettivamente di 3,45 e 3,64 volte. I livelli di espressione del recettore serotoninergico 5HT1BR (Htr1b) sono apparsi leggermente diminuiti. Al contrario, i livelli di 5HT1DR (Htr1d) hanno mostrato aumenti di 6,07 e 4,72 volte con ELE e INDO, rispettivamente.

La trascrizione dei principali trasduttori del segnale nocicettivo nella cefalea, i recettori TRPV1 e TRPA1, risulta aumentata. I livelli trascrizionali di COX1 e COX2 sono risultati influenzati in maniera differente dai trattamenti. Infatti, mentre la trascrizione della COX1 è stata aumentata da ELE (3,89 volte) e da INDO (3,28 volte), mentre quelle della COX2 non hanno mostrato cambiamenti sostanziali. Da notare che gli mRNA per le prostaglandine sintasi che si trovano immediatamente a valle della COX e sono responsabili della sintesi di effettori vasodilatatori prostanoidi, risultano anch'essi incrementati dopo il trattamento con i 2 farmaci. In particolare, la sintasi PGE2 (Ptges) è aumentata di 3,79 (ELE) e 3,97 volte (INDO), mentre un aumento più pronunciato della sintasi PGI2 (Ptgis) è stato indotto da ELE (18,5 volte) e INDO (19,56 volte). Infine, i livelli di trascrizione di eNOS (Nos3) sono aumentati sia con i trattamenti ELE (3,31 volte) che INDO (1,83 volte); quelli che codificano per nNOS (Nos1) sono apparsi leggermente aumentati solo con INDO (1,59 volte), mentre quelli che codificano per iNOS (Nos2) non hanno raggiunto la soglia di 1,4 con nessuno dei due farmaci (Figura 19).

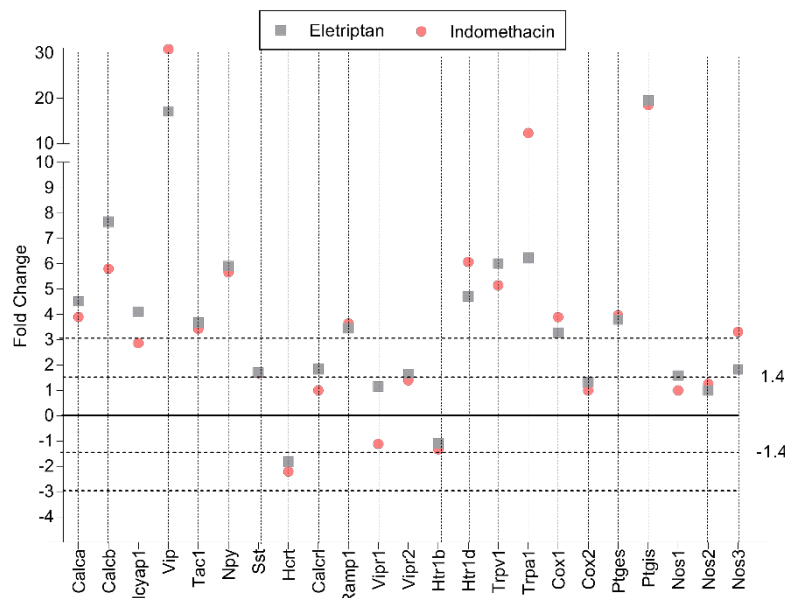


Figura 19 - Analisi trascrittomico dei geni correlati alla cefalea nei gangli trigeminali dei ratti esposti a trattamento cronico con eletriptan o indometacina. Il diagramma mostra la variazione dei geni coinvolti nella patogenesi della cefalea. Le soglie di 1,4 e 3 sono mostrate come linee tratteggiate orizzontali. Calca, CGRPA; Calcb, CGRPb; Adcyap1, PACAP; Vip, VIP; Tac1, sostanza P; Npy, NPY; Sst, somatostatina; Hcrt, ipocretina; Calcl, recettore della calcitonina; Ramp1, RAMP1; Vipr1, recettore VIP 1; Vipr2, recettore VIP 2; Htr1b, recettore 5HT1B; Htr1d, recettore 5HT1D; Trpv1, recettore TRPV1; Trpa1, recettore TRPA1; Ptgs1, COX1; Ptgs2, COX2; Ptges, sintasi PGE; Ptgis, sintasi PGI; Nos1, nNOS; Nos2, iNOS; Nos3, eNOS.

## Valutazione mediante rtPCR dei dati ottenuti mediante gene array

Per confermare i dati ottenuti mediante gene array, abbiamo analizzato, l'espressione di quei geni che hanno un ruolo nella patologia emicranica e la cui espressione è stata modificata in maniera significativa dai trattamenti farmacologici mediante l'analisi rtPCR. Abbiamo quindi selezionato i neuropeptidi (CGRP $\alpha$ , PACAP, VIP e somatostatina), il canale TRPV1, le ciclossigenasi (COX1 e COX2) e i recettori della serotonina (5HT1BR e 5HT1DR). Abbiamo esteso questa analisi ai DRG a livello cervicale e toracico per capire se i cambiamenti di espressione genica indotti da ELE e INDO fossero limitati al ganglio del trigemino.

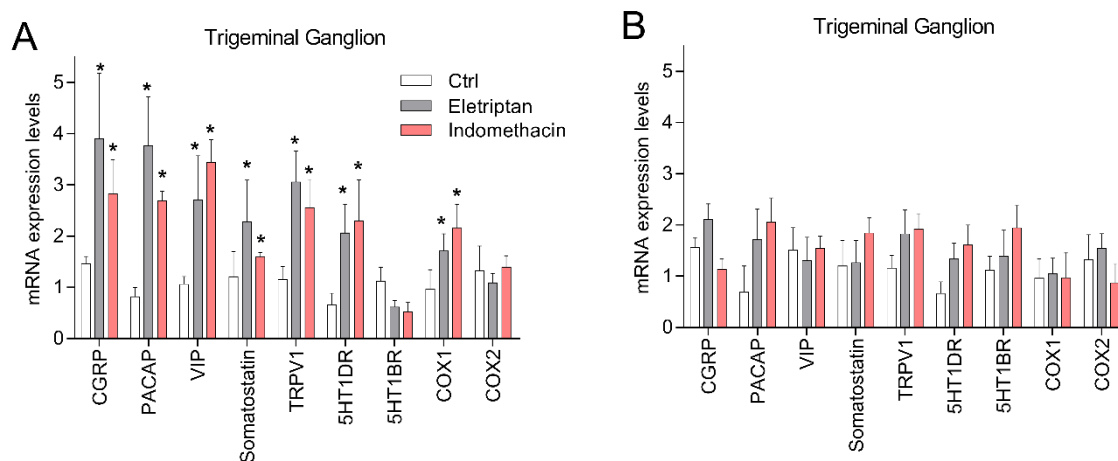


Figura 20 - Conferma dei dati ottenuti dal gene array mediante rtPCR. I livelli di trascrizione dei geni sono stati quantificati mediante rtPCR nel ganglio trigemino (A) dei ratti esposti all'ELE o all'INDO e confrontati con gli animali di controllo. (B) Analisi dell'espressione a livello dei gangli trigeminali 10 giorni dopo l'interruzione del trattamento di 1 mese con ELE o INDO. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  SEM di 10 ratti. \* $P \leq 0,05$  vs controllo, il test t di Student

Come mostrato in Figura 20A, la PCR ha confermato pienamente l'aumento dell'espressione di quei geni identificati dall'analisi del gene array. In linea con i dati del gene array, l'espressione genica di 5HT1BR e COX2 non è risultata aumentata nell'analisi mediante rtPCR. Per imitare ciò che avviene in clinica durante la terapia, abbiamo analizzato gli stessi geni 10 giorni dopo aver interrotto il trattamento di 30 giorni con i due farmaci antiemicranici. Come mostra la Figura 20B, dieci giorni dopo l'interruzione del trattamento, si verifica un completo recupero dell'omeostasi dell'espressione genica. Quando abbiamo esaminato i livelli di trascrizione degli stessi geni la cui espressione era risultata incrementata a livello trigeminale, nei DRG toracici, solo PACAP e il TRPV1 hanno mostrato una tendenza all'aumento, anche se senza raggiungere la significatività statistica (Figura 21).



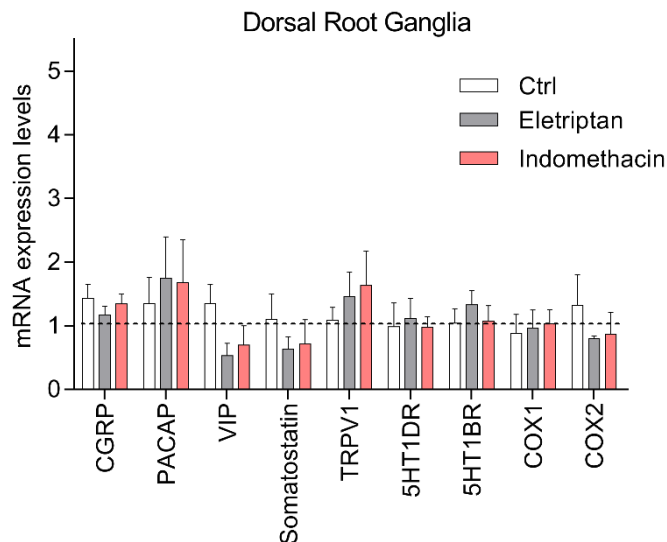


Figura 21 - Analisi rtPCR dei geni correlati alla cefalea nei DRG toracici.

### Analisi delle soglie nocicettive in seguito al trattamento cronico con ELE o INDO

A questo punto dello studio abbiamo indagato se ci fossero e quali potessero essere i riflessi funzionali di queste alterazioni pronocicettive del ganglio trigeminale, indotte dal trattamento cronico con ELE o INDO. Per fare ciò abbiamo analizzato la soglia nocicettiva di questi animali sia a livello periorbitale che a livello periferico. La misura dell'allodinia periorbitale ha rivelato uno stato simile di allodinia nei ratti trattati con i due farmaci INDO ed ELE (Figura 22A). Al contrario, andando a valutare l'iperalgisia di questi animali, mediante la somministrazione di una bassa concentrazione di formalina i ratti trattati cronicamente con ELE ma non INDO sono risultati iperalgesici, mostrando una consistente attività di licking/rubbing orofacciale sia nella fase di dolore acuto (0-10 min.) sia in quella di dolore infiammatorio (10-60 min.) indotte dalla formalina (Figura 22B). Per corroborare questo risultato, abbiamo analizzato l'espressione di questi animali al fine di assegnare un GS (secondo tabelle già presenti in letteratura<sup>333</sup>) e abbiamo scoperto che solo il gruppo di animali trattati con ELE hanno ottenuto il GS più elevato in seguito all'iniezione della formalina (Figura 22C e D). Date le note proprietà analgesiche dell'indometacina, al fine di escludere l'ipotesi che queste fossero alla base della mancanza di sensibilizzazione periorbitale, abbiamo analizzato l'intensità del dolore orofacciale nei ratti iniettati con formalina alla concentrazione dello 0,5%. In questo caso, i ratti cronicamente esposti a INDO hanno avuto un comportamento paragonabile al gruppo ELE. I risultati di questi test, parimenti al fatto che l'espressione del gene Calca codificante per il CGRP risulta aumentata a livello dei gangli trigeminali, ci ha spinto a indagare se anche il rilascio di CGRP risultasse

alterato. Abbiamo quindi indotto il rilascio di CGRP mediante capsaicina prelevando il sangue dalle vene sublinguali. In linea con i dati trascrizionali, i livelli plasmatici di CGRP risultano più alti nei ratti trattati con ELE e INDO rispetto ai controlli (Figura 22E). Ampliando la nostra indagine abbiamo analizzato l'allodinia periferica e solo gli animali trattati con indometacina sono risultati allodinici (Figura 22F). Entrambi i gruppi sono invece risultati allodinici al freddo quando sono stati valutati con il test della piastra fredda (Figura 22G).

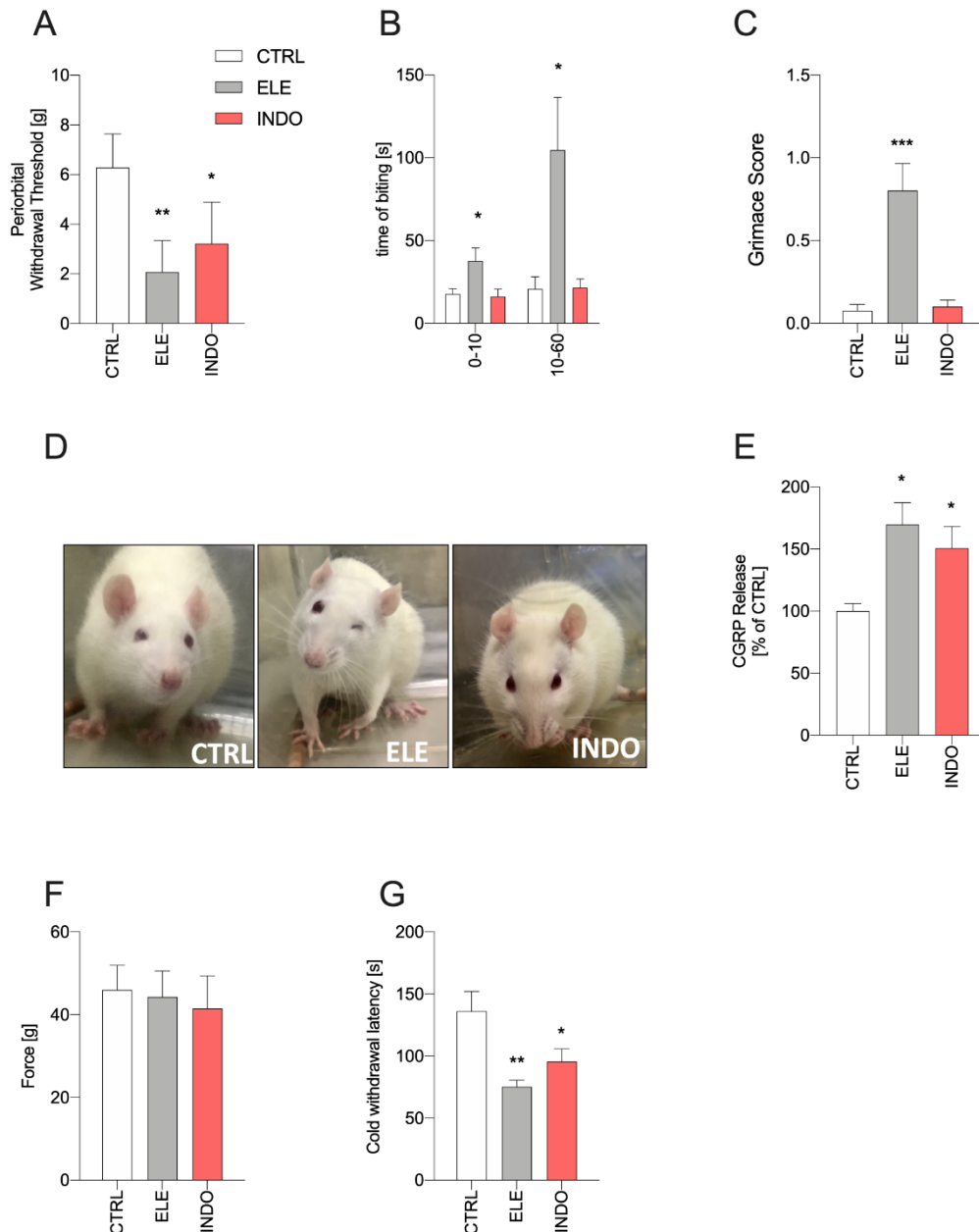


Figura 22 - Allodinia e iperalgesia nei ratti esposti cronicamente all'ELE o all'INDO. (A) Misurazione dell'allodinia meccanica (mediante filamenti di Von Frey) e (B) dell'iperalgesia (0,2% di formalina) a livello periorbitale nei gruppi CTRL, ELE o INDO. (C) Grimace Score durante il test della formalina. (D) Immagini rappresentative di ratti durante il Grimace Score. (E) Livello CGRP plasmatico indotto da capsaicina. Allodinia tattile (G) e al freddo (H) periferica nei ratti di controllo o trattati con ELE, o INDO. Ogni colonna rappresenta la media  $\pm$  6 SEM di 20 ratti. \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  vs CTRL. ANOVA più il test Tukey post hoc.

## Effetti degli HDACI sul modello di MOH indotto da eletriptan

A questo punto, appurato che il trattamento cronico con due differenti farmaci antiemcranici causa alterazioni simili a livello trascrizionale e che queste si traducono in delle alterazioni a livello soglia nocicettiva, abbiamo testato quale potesse essere l'effetto della somministrazione degli HDACI. Onde evitare l'effetto analgesico indotto dall'indometacina, abbiamo testato queste molecole sul modello indotto da eletriptan. Inoltre, data l'importanza che il CGRP ha nella patofisiologia dell'emicrania, ci siamo concentrati specificatamente sulle eventuali alterazioni a carico di questo peptide e delle subunità che compongono il suo recettore a livello del nervo trigemino e dei nuclei trigeminali nel tronco cefalico.

L'analisi rt-PCR a livello dei gangli trigeminali conferma che il trattamento con eletriptan induce l'espressione del CGRP come anche della subunità RAMP1 che fa parte del recettore, mentre non altera in maniera significativa l'espressione della subunità CLR e della subunità intracellulare RCP. Il co-trattamento con panobinostat (PAN) e givinostat (GIV) annulla questo effetto sia per il CGRP sia per la subunità recettoriale, ripristinando i

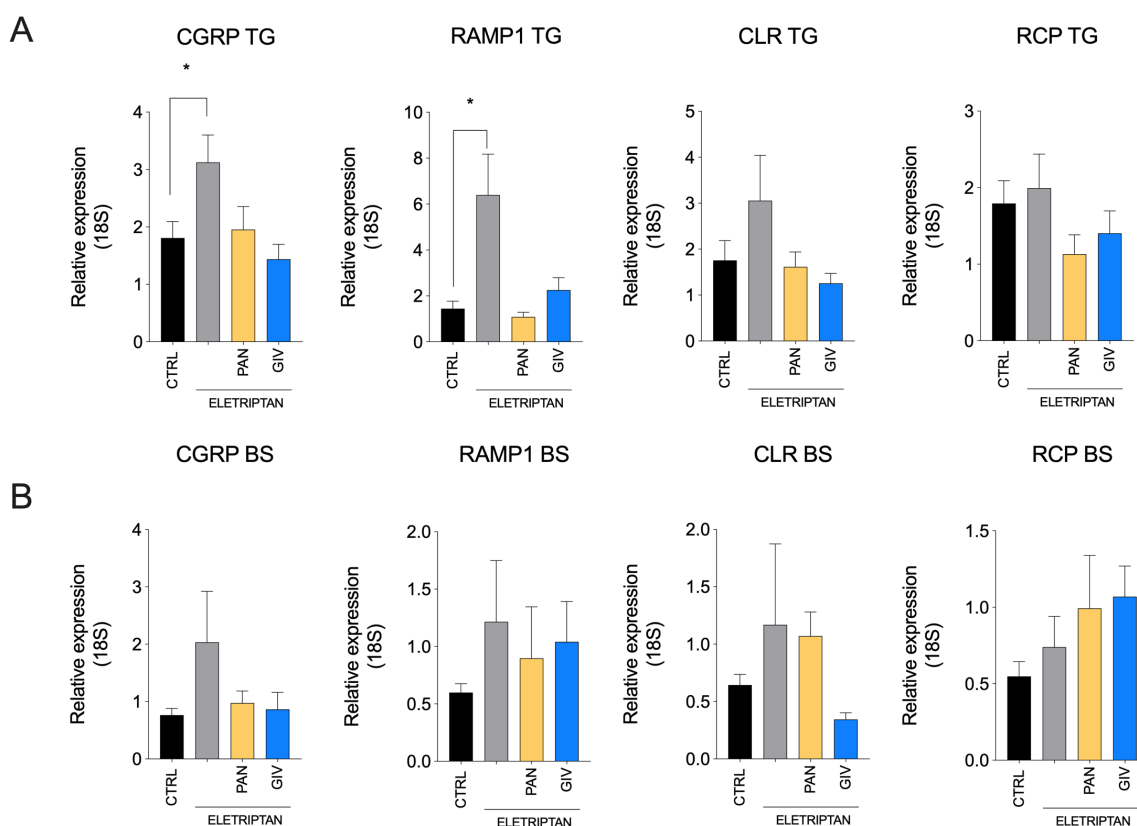


Figura 23 - Analisi rtPCR dell'espressione del CGRP e delle subunità recettoriali a livello del ganglio trigeminale (A) e del tronco encefalico (B). \* $P \leq 0,05$  vs CTRL. ANOVA più il test Tukey post hoc

valori di controllo (Figura 23A). A livello dei nuclei trigeminali, nel tronco cefalico, l'analisi non ha mostrato nessuna differenza significativa tra i gruppi sperimentali, anche se è possibile notare un incremento nell'espressione del CGRP (Figura 23B).

A livello funzionale siamo andati a valutare dapprima l'allodinia a livello periorbitale: gli animali trattati con ELE risultano essere allodinici rispetto ai controlli, mentre il gruppo panobinostat e quello givinostat sembrano avere un grado di allodinia più ridotto, ma non completamente annullato dal co-trattamento (Figura 24A).

Negli stessi animali abbiamo valutato il comportamento in presenza di un classico trigger emicranico, la luce. Per valutare questo parametro abbiamo modificato quello che nella letteratura viene indicato come *dark/light box test*, valutando la preferenza di ogni animale tra un ambiente con una luce naturale e quello con una luce forte. Sul tempo totale di osservazione, gli animali del gruppo ELE trascorrono circa il 30% di tempo in meno nell'ambiente con la luce più intensa rispetto agli animali di controllo. Gli animali trattati con i due HDACi, viceversa, mostrano un'inibizione minore, trascorrendo nell'ambiente con una luce più forte un tempo assimilabile a quello del gruppo CTRL (Figura 24B).

Il rilascio di CGRP risulta superiore al gruppo CTRL esclusivamente per il gruppo ELE, mentre i gruppi co-trattati con panobinostat e givinostat hanno livelli assimilabili a quelli di controllo (Figura 24C). Il CGRP rilasciato, a livello fisiologico, può indurre un effetto di tipo vasodilatatorio. Inducendo il rilascio di CGRP mediante una soluzione di capsaicina, la misurazione del flusso dermico ha rivelato che il gruppo ELE risponde con un incremento maggiore rispetto ai propri valori basali rispetto al gruppo CTRL, mentre il gruppo PAN ha un incremento del DBF in linea con i controlli ed il gruppo GIV mostra addirittura un incremento inferiore (Figura 24D).

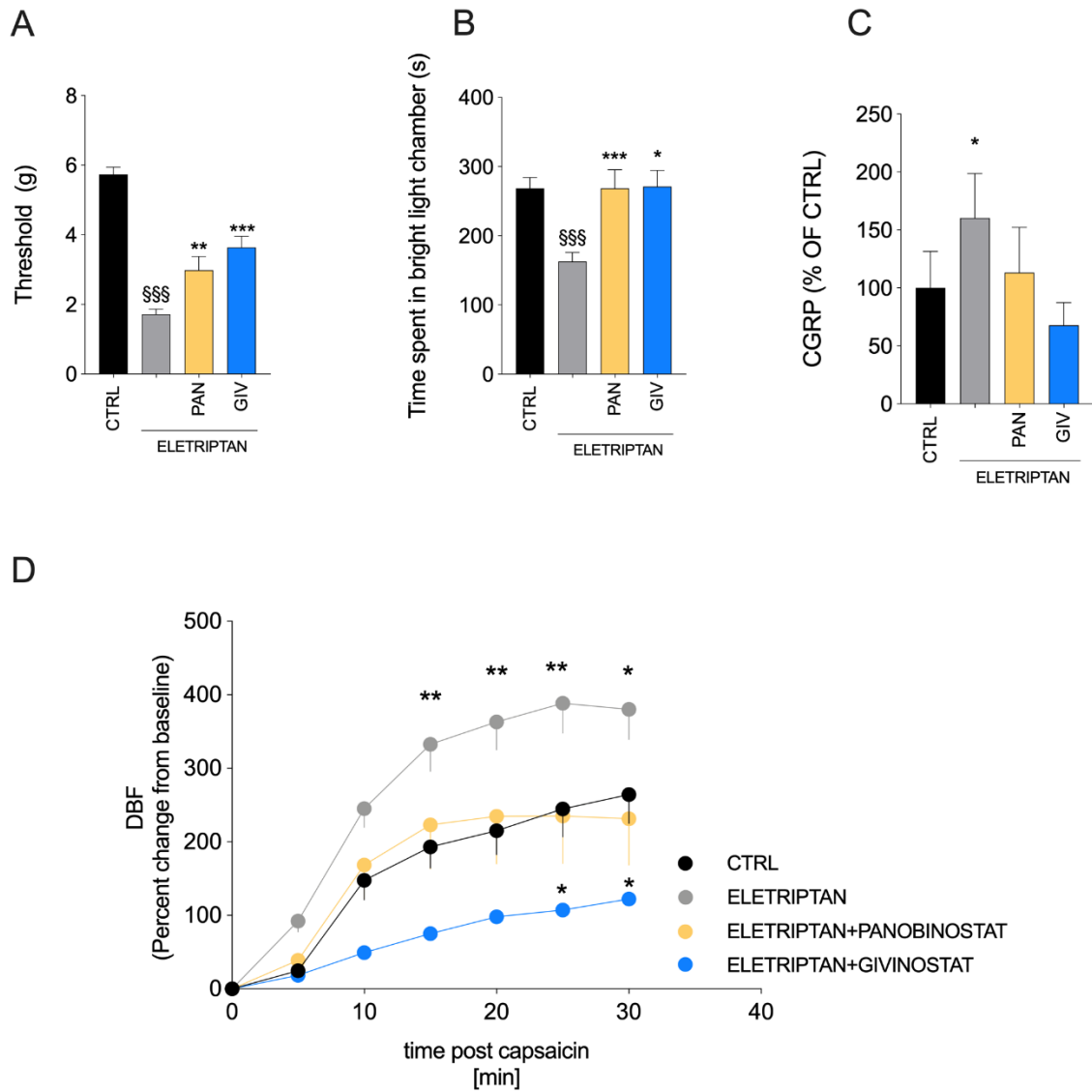


Figura 24 - Allodinia e rilascio di CGRP nei ratti dopo 1 mese di trattamento con ELE o ELE+HDACI. (A) Allodinia tattile cutanea nella regione periorbitale, misurata con i filamenti di Von Frey, viene parzialmente revertita dal co-trattamento con PAN e GIV. (B) La sensibilità alla luce, misurata come tempo totale trascorso nell'ambiente con la luce più intensa, viene annullata dal co-trattamento con gli HDACI. (C) Gli animali, dopo il trattamento di un mese con ELE, in seguito alla somministrazione di capsaicina rilasciano più CGRP rispetto al gruppo CTRL e rispetto agli animali che sono stati trattati anche con gli HDAC e questo si traduce (D) in un maggior incremento del flusso dermico. (A, B, C) \$\$\$ $P \leq 0,001$  vs CTRL, \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  vs ELE. ANOVA più il test Tukey post hoc; (D) \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$  vs CTRL ANOVA 2way Geisser-Greenhouse correction più test Tukey post hoc

# DISCUSSIONE

Mentre le terapie attualmente disponibili sono in grado di fornire un sufficiente sollievo dal dolore acuto, le terapie utilizzate per il trattamento del dolore cronico sono in genere limitate da effetti collaterali, tra cui la tolleranza, la dipendenza e la costipazione.

Sebbene nei decenni precedenti siano state condotte intense ricerche sui meccanismi neurobiologici del dolore cronico, questo disturbo è ancora mal gestito dai farmaci attuali, come gli oppioidi e i farmaci antinfiammatori non steroidei.

I due progetti che compongono il presente lavoro di tesi offrono due approcci innovativi nella terapia del dolore, andando a modulare la trasmissione del segnale nocicettivo dalla periferia a livello centrale nel primo caso e quei meccanismi epigenetici che, recenti studi, indicano come attori centrali nel dolore di tipo cronico.

In linea con il fenomeno del *drug repurposing*, che offre la possibilità di nuove soluzioni terapeutiche partendo da molecole che si sono già dimostrate non tossiche nell'uomo (molecole che hanno superato la fase 1 ma che per un nuovo utilizzo dovrebbero superare i test di fase 2 e 3), per la prima volta, nel corso di questo studio, abbiamo dimostrato che DEX è un bloccante del canale Nav1.8 ed è in grado di fornire analgesia nei modelli di dolore nocicettivo e neuropatico. I nostri risultati sono in accordo con la capacità dei composti benzotiazolici di bloccare i canali al sodio<sup>302</sup>. Studi precedenti condotti dal nostro gruppo di ricerca dimostrano che il DEX aumenta la resistenza del cervello di fronte al danno ischemico, grazie alla sua capacità di potenziare la F1Fo ATP-sintasi e la bioenergetica mitocondriale<sup>334,335</sup>. Recentemente inoltre, è stata dimostrata la capacità di DEX di inibire la corrente al potassio (K<sup>+</sup>) mediata da canali voltaggio dipendenti di tipo A, che ha una inattivazione molto rapida, a livello dei neuroni ippocampali della regione CA1, promuovendo così la plasticità sinaptica ippocampale, l'apprendimento e la memoria<sup>336</sup>. L'inibizione di queste correnti da parte di DEX, avendo un effetto pro-eccitatorio potrebbe, in linea di principio, contrastare gli effetti anti-eccitatori del farmaco mediati dal blocco del canale Nav1.8. Nel complesso quindi il DEX emerge come un composto neuroattivo con proprietà farmacodinamiche pleiotropiche e clinicamente rilevanti.

I vari risultati ottenuti in questo studio ci portano a concludere che il DEX blocca i canali Nav1.8. L'opportunità di testare la molecola, anche se solo da un punto di vista elettrofisiologico, sul modello knock-out in possesso del team del Professor Waxmann,

presso l'università di Yale, ha certamente contribuito in maniera determinante ad individuare la specificità dell'azione del DEX tra le differenti isoforme dei canali Nav. In primo luogo, l'inibizione prodotta sulle conduttanze al sodio è insensibile alla TTX, e non si manifesta sui neuroni DRG degli animali knockout per il canale Nav1.8 a -70 mV, escludendo così un impatto su Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7. In secondo luogo, le correnti Nav1.9 sono insensibili al DEX. In terzo luogo, il farmaco non influisce sulla conduttanza al sodio nei neuroni ippocampali di ratto o nei cardiomiociti umani, escludendo anche un impatto sugli altri canali espressi da queste cellule tra cui Nav1.1, Nav1.2 e Nav1.5. Sebbene gli effetti del DEX sull'isoforma Nav1.4 del muscolo scheletrico siano ancora da chiarire, l'evidenza che il farmaco non compromette (e in alcuni casi addirittura migliora<sup>337</sup>), le funzioni del muscolo scheletrico nei pazienti dei vari studi clinici, ci permette di ipotizzare che DEX non abbia un impatto clinicamente rilevante su questo canale. Ciò è anche coerente con il profilo di tollerabilità del bloccante Nav1.8 PF-01247324 nei modelli murini di dolore<sup>338</sup>. Quest'ultimo studio mostra un IC<sub>50</sub> di 448 nM su correnti resistenti al TTX dei neuroni DRG dei roditori<sup>338</sup>, un valore superiore a quello calcolato nel nostro studio per il DEX, pari a 299 nM.

Lo studio di docking molecolare supporta ulteriormente la capacità di DEX di legarsi ai canali Nav1.8 e suggerisce che il sito di docking del DEX sia sovrapponibile a quello del bloccante Nav1.8 A-8034637 e degli anestetici locali.

Anche se i risultati dello studio di docking non consentono una piena comprensione dei determinanti molecolari del profilo di selettività, essi forniscono una visione d'insieme sulla modalità di docking dei composti simili al benzotiazolo e possono essere strumentali per lo sviluppo di nuovi bloccanti di canale selettivi Nav1.8.

Il potente effetto analgesico del DEX nei differenti modelli di dolore è in buon accordo con il ruolo chiave stabilito di Nav1.8 nella nocicezione. Infatti, anche se inizialmente identificato come mediatore esclusivo del dolore infiammatorio, vari studi evidenziano il ruolo centrale di Nav1.8 nel dolore neuropatico<sup>299,300</sup>. La capacità di DEX di ridurre l'allodinia nei topi diabetici è coerente con la facilitazione fosfo-dipendente dell'attivazione di Nav1.8<sup>339</sup> e con gli effetti anti-allodinici del bloccante Nav1.8 A-803467 in un modello murino di diabete<sup>340</sup>. A questo proposito, vale la pena notare che, sebbene la capacità del DEX di migliorare la bioenergetica dei neuroni<sup>334,335</sup> potrebbe, in linea di principio, contrastare l'assonopatia diabetica e la relativa allodinia, è ipotizzabile che un tale effetto

derivi da un trattamento di tipo cronico piuttosto che da una somministrazione acuta come quella adottata nel nostro modello. Uno dei risultati più rilevanti è quello di aver dimostrato la capacità del DEX di indurre l'analgia non solo quando è somministrato per via intraperitoneale, ma anche quando somministrato per via orale o topica. Quando somministrato per via topica, il farmaco è stato capace di indurre ugualmente un effetto analgesico ma di più breve durata rispetto a quello indotto quando somministrato per via orale o per via i.p., in linea con il rapido assorbimento sistemico del farmaco e l'elevato volume di distribuzione<sup>341</sup>. È comunque interessante paragonare le dosi utilizzate nel nostro studio rispetto a quelle già presenti in letteratura per bloccanti Nav1.8 selettivi: DEX ha prodotto l'effetto analgesico con iniezioni sottocutanee di 70 µg, mentre il potente bloccante Nav1.8 A-863467 offre analgesia solo quando ne viene iniettato per via sottocutanea 1 mg<sup>340</sup>. Negli studi clinici, i pazienti che hanno ricevuto una dose orale di 300 mg di DEX raggiungono un C<sub>max</sub> plasmatica di circa 750 ng/ml<sup>326</sup>. Ciò corrisponde a circa 3,5 µM, una concentrazione circa 10 volte superiore all'IC<sub>50</sub> del DEX sulle conduttanze del sodio nei neuroni DRG (294,4 nM). Da notare che il DEX mostra un'elevata permeabilità attraverso la barriera ematoencefalica (rapporto cervello/plasma di circa 5), suggerendo concentrazioni libere all'interno del sistema nervoso centrale potenzialmente superiori a 3,5 µM. Vale anche la pena di notare che, secondo l'AUC definita nell'uomo<sup>341</sup>, le concentrazioni di DEX nel plasma rimarrebbero superiori all'IC<sub>50</sub> del DEX sui canali Nav1.8, fino a 30h dopo una singola dose orale di 300 mg.

Mentre la ricerca sulla possibilità di modulare target fondamentali nella trasmissione del segnale nocicettivo, quali le isoforme 1.7 e 1.8 canali al sodio voltaggio dipendenti, vanno avanti da circa 20 anni, la correlazione tra terapia del dolore e meccanismi epigenetici è recente e gli studi di questo tipo sono ancora in numero ridotto. Negli ultimi anni alcuni studi hanno evidenziato come l'infiammazione periferica e le lesioni nervose inducano cambiamenti trascrizionali e traslazionali nell'espressione di recettori, degli enzimi, dei canali ionici, dei neurotrasmettitori, dei neuromodulatori e delle proteine strutturali nei DRG, nel midollo spinale e in altre strutture centrali correlate alla percezione del dolore<sup>342,343</sup>. Questi cambiamenti contribuiscono sia all'induzione sia al mantenimento del dolore cronico. Studi recenti hanno mostrato come esista una correlazione tra dolore cronico e alterazioni nei livelli di metilazione del DNA e nel pattern di modificazioni delle



proteine istoniche: queste evidenze hanno portato i ricercatori ad esplorare gli effetti di alcune molecole, definiti farmaci epigenetici, nella terapia del dolore.

Il dolore cronico può portare i pazienti ad un sovrautilizzo del farmaco regolarmente prescritto. Questo abuso, oltre ai rischi che derivano dagli effetti collaterali propri di una certa tipologia di farmaco, può portare in specifici casi ad un peggioramento della patologia preesistente. Questo è il caso dell'emicrania da abuso di farmaci (MOH) che rappresenta l'evoluzione più frequente della cefalea cronica e porta ad una condizione clinica che espone i pazienti a gravi effetti farmacologici secondari e rafforza il processo di cronicizzazione della cefalea<sup>344-346</sup>. Il nostro studio mostra che l'esposizione cronica a due diversi rimedi per la cefalea, come un triptano o un FANS, è in grado di alterare in maniera significativa l'omeostasi dell'espressione genica del ganglio trigeminale, come anche le soglie nocicettive nella regione periorbitale che il trigemino innerva. È importante notare che l'alterazione prodotta dai due farmaci, sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo, dei profili di espressione genica è molto simile, nonostante il loro diverso meccanismo d'azione. Analizzando la letteratura, questa è la prima volta che viene mostrato come, in seguito all'esposizione cronica a due differenti rimedi sintomatici per la cefalea, a livello del ganglio del trigemino venga attivato lo stesso programma trascrizionale che conduce, in ultima analisi, ad una condizione di aumentata sensibilità agli stimoli nocicettivi. In particolare, i dati preclinici ottenuti in questo studio sono in linea con la clinica dei pazienti affetti da MOH che, sebbene abusino di differenti tipologie di farmaci sintomatici, presentano la medesima sintomatologia<sup>344-346</sup>. I nostri risultati sono anche in linea con altri studi preclinici, che mostrano come l'esposizione ripetuta di ratti al sumatriptan provoca una condizione di sensibilizzazione latente a stimoli nocicettivi concomitanti con l'aumento dell'espressione del CGRP all'interno dei gangli del trigemino<sup>167-169,347</sup>.

Attualmente, le vie neuroanatomiche e i meccanismi molecolari che partecipano alla riprogrammazione trascrizionale dei gangli del trigemino in seguito all'esposizione cronica all'ELE o all'INDO sono ancora sconosciuti. Una spiegazione potrebbe essere che ogni farmaco agisce sul suo rispettivo bersaglio farmacodinamico a livello dei neuroni dei gangli trigeminali, andando ad attivare in maniera continuativa differenti vie di segnalazione che poi convergono per sollecitare la stessa riprogrammazione epigenetica.

L'inibizione persistente della sintesi dei prostanoidei dovuto all'INDO, all'interno della dura madre e di altre strutture craniche, così come i cambiamenti nelle dinamiche dei vasi meningei dovute alla somministrazione cronica di ELE, possono essere "percepiti" dalle afferenze periferiche del nervo trigeminale che mandano un segnale di riprogrammazione al trigemino stesso. È anche ipotizzabile che l'azione dei due farmaci sui due rispettivi target, COX e 5HT1DR, a livello del nucleo caudale del trigemino possa essere rilevato dalle afferenze trigeminali centrali, e possa condurre ad una riprogrammazione genica del trigemino.

Alla luce dell'elevata omogeneità tra gli effetti prodotti dai due trattamenti cronici sulla riprogrammazione genica, si ritiene che i segnali provenienti dal targeting cronico del recettore 5HT1DR e della COX vengano integrati da strutture cerebrali superiori come la sostanza grigia periaqueduttale, l'ipotalamo, il talamo e la corteccia<sup>345</sup> che poi reimpostano, come una sorta di feedback omeostatico, il trascrittoma e, di conseguenza, il funzionamento del ganglio del trigemino. Indipendentemente dalle strutture cerebrali coinvolte, vale la pena notare che l'alto grado di coerenza del reset genico innescato dai due farmaci nel ganglio del trigemino è il primo indizio sperimentale che un percorso neuroanatomico/neurochimico comune è condiviso dai differenti farmaci che inducono l'MOH. Inoltre, dato che le caratteristiche cliniche del MOH indotta dall'abuso di triptani e quelle dell'MOH indotta dall'abuso di FANS sono essenzialmente le stesse, è probabile che almeno alcuni dei geni, la cui espressione risulta alterata nei nostri modelli, siano effettivamente rilevanti per la patogenesi nei pazienti affetti da MOH.

Il presente studio indica che la riprogrammazione trascrizionale nel ganglio del trigemino stimola la sensibilizzazione al dolore ed è un substrato neurobiologico chiave della MOH. Di conseguenza, abbiamo scoperto che l'esposizione cronica a farmaci quali INDO o ELE porta ad uno stato pronocicettivo di allodinia periorbitale e iperalgesia, in buona sintonia con gli studi precedenti del gruppo del professor Frank Porreca presso l'Università dell'Arizona<sup>167,169,347</sup>. Vale la pena notare, tuttavia, che nonostante simili alterazioni del trascrittoma, le soglie nocicettive sono state alterate in maniera diversa dai due trattamenti con ELE e INDO. Entrambe i trattamenti hanno causato una condizione di allodinia a livello periorbitale, mentre l'iperalgesia nella stessa regione è stata riscontrata solo nel gruppo di animali esposti all'ELE. È ragionevole supporre che le proprietà analgesiche dell'INDO possano ridurre l'iperalgesia e/o che gli eventi di plasticità sinaptica alla base sia

dell'allodinia che dell'iperalgia non portino ad una condizione statica, ma che vi sia un'evoluzione temporale che potrebbe non essere identica per i due trattamenti. L'insieme di queste considerazioni permette di ipotizzare che la MOH abbia origine da una risposta omeostatica del sistema nervoso all'esposizione cronica a farmaci come i FANS o i triptani che, alla fine, causano una alterazione nel funzionamento del sistema trigemino-vascolare. La MOH potrebbe essere quindi una sorta di stato compensativo dal punto di vista nocicettivo del trigemino, quando quest'ultimo è costantemente represso da farmaci sintomatici per il mal di testa. Da un punto di vista neurofisiologico, la riprogrammazione del sistema trigeminovascolare con induzione di geni pronocicettivi potrebbe essere quindi un meccanismo di feedback nel tentativo di ristabilire le soglie del dolore, "innalzate" dai trattamenti farmacologici.

Le profonde alterazioni indotte da ELE e INDO sul ganglio trigeminale sono in contrasto con la mancanza di riprogrammazione genica nei DRG toracici. Studi preclinici, tuttavia, dimostrano che i ratti cronicamente esposti a sumatriptan mostrano allodinia non solo nella regione periorbitale ma anche a livello periferico<sup>347</sup>. Coerentemente, i ratti esposti a INDO o ELE e che non mostrano alcuna alterazione apparente nei profili di espressione genica dei DRG che innervano la zampa anteriore sviluppano allodinia al freddo. Una possibile spiegazione per questa apparente incoerenza è quella che spiega la sensibilizzazione a meccanismi spinali e/o sovraspinali e non ad eventi che si verificano al livello dei DRG. Infatti, nei pazienti affetti da MOH è stata dimostrata la compromissione dell'elaborazione del dolore spinale e la riduzione del controllo delle vie discendenti sovraspinali che contribuiscono alla modulazione della trasmissione del dolore<sup>348</sup>. Questi risultati suggeriscono, in linea con un rapporto molto recente<sup>349</sup>, che il ganglio del trigemino mostra una particolare, stereotipata (cioè indipendente dal tipo di farmaco che la induce) risposta omeostatica ai farmaci per la cefalea, che rende il sistema trigemino-vascolare un *unicum* tra le altre vie nocicettive. Questa interpretazione è anche in linea con uno studio (e con la pratica clinica di routine) che mostra che tra i pazienti che assumono regolarmente analgesici, compresi i FANS, per i disturbi reumatologici, nessuno sviluppa una condizione di dolore periferico spontaneo associata ad un consumo compulsivo di farmaci. Tuttavia, l'8% di questi pazienti reumatologici che assumono analgesici per lunghi periodi, ha sviluppato la MOH, ma tutti venivano già da una condizione di cefalea primaria<sup>132</sup>. Allo stesso modo, i pazienti che assumono oppioidi cronici per la colite ulcerosa

vanno incontro allo sviluppo di MOH solo se sono già affetti da emicrania<sup>133</sup>. Queste informazioni cliniche, insieme ai dati ottenuti in questo studio preclinico sulla riprogrammazione genica nel ganglio trigeminale dei ratti, suggeriscono che i pazienti con cefalea hanno un tratto neurofisiologico che li predispone a sviluppare l'MOH una volta che il loro sistema trigemino-vascolare si trova in uno stato di sensibilizzazione pronocicettiva latente. Infatti, è importante sottolineare che i ratti utilizzati in questo studio non divengono "emicranici", nonostante la loro diffusa riprogrammazione dei gangli trigeminali dei profili di espressione genica. Si può quindi ipotizzare che i cambiamenti neuro-genomici che portano alla sensibilizzazione pronocicettiva potrebbero in gran parte verificarsi in tutti gli individui esposti all'assunzione ripetitiva di analgesici. Tuttavia, quando si verificano in un soggetto sensibile alla cefalea, il substrato neurofisiologico specifico è sufficiente per causare la trasformazione da una condizione pronocicettiva latente allo sviluppo dell'MOH. L'epigenetica è una nuova area di ricerca e finora sono stati svolti pochi studi su pazienti affetti da emicrania. Recentemente, è stato pubblicato il primo studio a livello genomico sulla metilazione del DNA nella cronicizzazione del mal di testa<sup>350</sup>. Uno studio pilota svolto presso l'Università di Bologna ha cercato di identificare i cambiamenti nella metilazione del DNA associata alla cronicizzazione delle cefalee, caratterizzando i livelli di metilazione del DNA a livello genomico nei pazienti con emicrania episodica e nei pazienti affetti da MOH, prima e dopo il programma di disintossicazione. Sebbene non sia stata trovata alcuna rilevanza statistica tra i gruppi, sono stati identificati alcuni siti CpG (ovvero regioni nel DNA in cui una citosina si trova vicino ad una guanina) che si pensa possano essere coinvolti nei meccanismi di tossicodipendenza e nelle malattie neuropsichiatriche associate all'emicrania<sup>351</sup>.

Questi dati, anche se ancora preliminari, che sembrano sostenere un ruolo dei processi epigenetici dell'emicrania e l'evidenza della riprogrammazione genica nei nostri studi a seguito del trattamento cronico con farmaci antiemicranici, ci ha spinto a investigare quale potesse essere l'effetto sul nostro modello di una categoria di molecole attorno alla quale c'è un grande interesse, gli HDACI. Per testarne l'effetto abbiamo deciso di iniziare il trattamento con l'HDACI dopo il raggiungimento di un livello significativo di allodinia, che dalle misurazioni effettuate nella prima parte dello studio, si sviluppa tra la seconda e la terza settimana di trattamento con l'ELE. In questo modo abbiamo simulato l'effetto degli

HDACI a scopo “curativo”, quando le trasformazioni indotte dell’abuso del farmaco antiemicranico sono già in atto.

Per avere maggiori possibilità di valutare un possibile effetto abbiamo scelto due inibitori ad ampio spettro, definiti anche pan-inibitori, in grado di inibire tutti gli enzimi della famiglia HDAC ma caratterizzati da una potenza differente<sup>265</sup>. Effettivamente, usati alla stessa dose, gli effetti dei due inibitori sono risultati sovrapponibili, sia dal punto di vista trascrittomico sia da quello funzionale. La caratteristica davvero interessante è che gli HDACI sono stati in grado di ridurre solo l’overespressione indotta dal trattamento cronico con ELE, senza avere nessun effetto su quei geni, come ad esempio la subunità RCP, che non sono stati indotti dal trattamento cronico con il farmaco antiemicranico. Ciò appare in linea con quanto già riportato in letteratura, infatti la repressione dell’espressione genica da parte degli HDACI sembra avvenire preferenzialmente su quei geni la cui espressione viene fortemente indotta piuttosto che su quelli la cui espressione non viene alterata<sup>352</sup>.

L’efficacia dei due HDACI nel ridurre anche le alterazioni a livello funzionale rafforza la nostra convinzione che le alterazioni a livello trascrittomico causino una pronunciata sensibilizzazione, rendendo il sistema trigemino-vascolare più pronò ai differenti triggers emicranici.

A sostegno della nostra ipotesi su un ruolo di alcuni attori epigenetici nei processi di cronicizzazione dell’emicrania, un recente studio ha evidenziato come l’inibizione selettiva della HDAC6, il cui target è l’ $\alpha$ -tubulina, possa essere efficace nel trattamento antiemicranico, in quanto l’azione deacetilasi di questa particolare isoforma porterebbe ad una ridotta dinamicità del citoscheletro, fondamentale nei processi di plasticità neuronale e, secondo gli autori, coinvolta nei processi di cronicizzazione dell’emicrania<sup>353</sup>.

Se da un lato l’utilizzo di pan-inibitori ci ha dato più chances di poter osservare un effetto sul nostro modello, dall’altra ci ha precluso la possibilità di capire se gli effetti del trattamento cronico con i farmaci anti-emicranici vedano la compartecipazione di una particolare HDAC o siano coinvolte tutte in uguale misura. Dai dati presenti in letteratura, è improbabile che l’azione sia dovuta all’inibizione generale su tutte le isoforme HDACs, dato che le differenti isoforme si caratterizzano per avere ruoli diversi<sup>354</sup>.

## Conclusioni

Nel complesso i risultati presentati in questa tesi, ci indicano come nuovi approcci nella terapia del dolore siano possibili, aprendo una finestra su nuove strategie terapeutiche. Nella riproposizione del dexpramipexolo come analgesico, abbiamo sottolineato il potenziale traslazionale di questo farmaco come bloccante Nav1.8. L'opportunità di evitare effetti collaterali sistemici e del sistema nervoso centrale attraverso l'applicazione topica offre vantaggi significativi in termini di tolleranza ai farmaci e di sicurezza. Infine, l'evidenza che il bloccante selettivo PF-01247324 agisca allo stesso modo sui canali Nav1.8 di ratto e umani<sup>338</sup> tende a far escludere la possibilità che le proprietà analgesiche del DEX nei roditori non possano essere tradotte nell'uomo. Piuttosto, i risultati dei nostri studi di docking su un modello omologo al canale Nav1.8 umano, insieme alle prove che i canali Nav1.8 abbiano un ruolo maggiore nella generazione di potenziale d'azione negli esseri umani rispetto ai roditori<sup>355</sup>, giustificano ulteriormente la candidatura del DEX per il trattamento del dolore, e indicano il DEX come un composto di partenza per lo sviluppo di più potenti antidolorifici.

In maniera differente, nel secondo studio, l'applicazione di farmaci epigenomici può darci un'idea di quello che potrebbe essere un interessante sviluppo nelle terapie del dolore cronico.

Infatti, i risultati ottenuti nello studio sulla MOH, anche se con i limiti di un modello preclinico, possono aiutarci a capire la complessa fisiopatologia del sistema trigemino-vascolare in condizioni di esposizione cronica a farmaci sintomatici per il mal di testa.

I risultati ottenuti nella seconda parte dello studio, utilizzando gli inibitori HDAC, ci suggeriscono come queste molecole abbiano la capacità di ripristinare gli adattamenti indotti dall'assunzione cronica dei farmaci a livello trigeminale.

La grande necessità di nuovi ed efficaci farmaci antiemicranici, unitamente al fatto che appaia sempre più chiaro il ruolo di modificazioni epigenetiche nei processi di cronicizzazione del dolore<sup>356</sup> e che vi sia un grande interesse, sia da parte del mondo della ricerca sia da parte delle aziende farmaceutiche, nello sviluppo di nuovi HDAC inibitori, sempre più selettivi ed efficaci, rende i risultati del presente studio ancora più interessanti in ottica futura anche da un punto di vista traslazionale.



# Bibliografia

1. American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice Guidelines for Acute Pain Management in the. *Anesthesiology* (2012).
2. Turk, D. C. Pain management. in *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology* (2016). doi:10.1016/B978-0-12-809324-5.05656-X.
3. Haanpää, M. & Treede, R.-D. Diagnosis and Classification of Neuropathic Pain. *Pain Clin. Updat.* (2010).
4. Breivik, H. *et al.* Assessment of pain. *British Journal of Anaesthesia* (2008) doi:10.1093/bja/aen103.
5. Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat. New Biol.* (1971) doi:10.1038/newbio231232a0.
6. Kopp, E. & Ghosh, S. Inhibition of NF- $\kappa$ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* (80-). (1994) doi:10.1126/science.8052854.
7. Botting, R. & Ayoub, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. in *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (2005). doi:10.1016/j.plefa.2004.10.005.
8. Williams, C. M. *et al.* Efficacy of paracetamol for acute low-back pain: A double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* (2014) doi:10.1016/S0140-6736(14)60805-9.
9. Daly, F. F. S., Fountain, J. S., Murray, L., Graudins, A. & Buckley, N. A. Guidelines for the management of paracetamol poisoning in Australia and New Zealand - Explanation and elaboration. *Med. J. Aust.* (2008) doi:10.5694/j.1326-5377.2008.tb01625.x.
10. Cherny, N. I. Opioid Analgesics: Comparative Features and Prescribing Guidelines. *Drugs* (1996) doi:10.2165/00003495-199651050-00002.
11. Chou, R. *et al.* Management of postoperative pain: A clinical practice guideline from the American pain society, the American society of regional anesthesia and pain medicine, and the American society of anesthesiologists' committee on regional anesthesia, executive commi. *J. Pain* (2016) doi:10.1016/j.jpain.2015.12.008.
12. Hadley, G., Derry, S., Moore, R. A. & Wiffen, P. J. Transdermal fentanyl for cancer pain. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2013) doi:10.1002/14651858.CD010270.pub2.
13. Leppert, W. Pain management in patients with cancer: Focus on opioid analgesics. *Curr. Pain Headache Rep.* (2011) doi:10.1007/s11916-011-0201-7.
14. Noble, M. *et al.* Long-term opioid management for chronic noncancer pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2010) doi:10.1002/14651858.cd006605.pub2.
15. Schneider, J. P. Chronic musculoskeletal pain: Rational use of opioid analgesics, Part 2. *Consultant* (2010).
16. Krantz, M. J. & Mehler, P. S. Synthetic Opioids and QT Prolongation. *Arch. Intern. Med.* (2003) doi:10.1001/archinte.163.13.1615-a.
17. Tammela, T., Kontturi, M. & Lukkarinen, O. Postoperative urinary retention: I. Incidence and predisposing factors. *Scand. J. Urol. Nephrol.* (1986)



- doi:10.3109/00365598609024494.
18. Moore, P. & Dimsdale, J. E. Opioids, sleep, and cancer-related fatigue. *Med. Hypotheses* (2002) doi:10.1054/mehy.2001.1461.
  19. Basbaum, A. & Jessell, T. Chapter 24: The Perception of Pain. *Princ. Neural Sci.* (2000).
  20. Purves, D. *3,4 Neuroscience Third Edition. Vascular* (2004).
  21. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* (2001) doi:10.1038/35093019.
  22. Chatzigeorgiou, M. *et al.* Specific roles for DEG/ENaC and TRP channels in touch and thermosensation in *C. elegans* nociceptors. *Nat. Neurosci.* (2010) doi:10.1038/nn.2581.
  23. *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals* (2010). doi:10.17226/12526.
  24. Melzack, R. & Wall, P. D. Pain mechanisms: A new theory. *Science* (80-. ). (1965) doi:10.1126/science.150.3699.971.
  25. Koeppen, B. M. & Stanton, B. A. *Berne & Levy Physiology. Berne & Levy Physiology* (2018).
  26. Koneru A; Satyanarayana S; Rizman S. Endogenous Opioids : Their Physiological Role and Receptors. *Glob. J. Pharmacol.* (2009).
  27. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Bull. Math. Biol.* (1990) doi:10.1007/BF02459568.
  28. Jiang, Y. *et al.* X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* (2003) doi:10.1038/nature01580.
  29. Tombola, F., Pathak, M. M. & Isacoff, E. Y. How does voltage open an ion channel? *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2006) doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020404.145837.
  30. Jiang, Q. X., Wang, D. N. & MacKinnon, R. Electron microscopic analysis of KvAP voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in an open conformation. *Nature* (2004) doi:10.1038/nature02735.
  31. Lipkind, G. M. & Fozzard, H. A. Voltage-gated Na channel selectivity: The role of the conserved domain III lysine residue. *Journal of General Physiology* (2008) doi:10.1085/jgp.200809991.
  32. Scheuer, T. Regulation of sodium channel activity by phosphorylation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* (2011) doi:10.1016/j.semcd.2010.10.002.
  33. West, J. W. *et al.* A cluster of Hydrophobic amino acid residues required for fast Na<sup>+</sup>-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1992) doi:10.1073/pnas.89.22.10910.
  34. Mitrovic, N., George, A. L., Horn, R. & Horn, D. Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. *J. Gen. Physiol.* (2000) doi:10.1085/jgp.115.6.707.
  35. O'Reilly, J. P., Wang, S. Y. & Wang, G. K. Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Nav1.4 sodium channels. *Biophys. J.* (2001) doi:10.1016/S0006-3495(01)75858-4.
  36. Vilin, Y. Y., Fujimoto, E. & Ruben, P. C. A single residue differentiates between human cardiac and skeletal muscle Na<sup>+</sup> channel slow inactivation. *Biophys. J.* (2001)

- doi:10.1016/S0006-3495(01)76195-4.
37. Armstrong, C. M. Time course of TEA(+)-induced anomalous rectification in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.* (1966) doi:10.1085/jgp.50.2.491.
  38. Armstrong, C. M. Interaction of tetraethylammonium ion derivatives with the potassium channels of giant axons. *J. Gen. Physiol.* (1971) doi:10.1085/jgp.58.4.413.
  39. Cahalan, M. D. Local anesthetic block of sodium channels in normal and pronase-treated squid giant axons. *Biophys. J.* (1978) doi:10.1016/S0006-3495(78)85449-6.
  40. Cahalan, M. D. & Almers, W. Block of sodium conductance and gating current in squid giant axons poisoned with quaternary strychnine. *Biophys. J.* (1979) doi:10.1016/S0006-3495(79)85202-9.
  41. O'Leary, M. E. & Horn, R. Internal block of human heart sodium channels by symmetrical tetra-alkylammoniums. *J. Gen. Physiol.* (1994) doi:10.1085/jgp.104.3.507.
  42. O'Leary, M. E., Kallen, R. G. & Horn, R. Evidence for a direct interaction between internal tetra-alkylammonium cations and the inactivation gate of cardiac sodium channels. *J. Gen. Physiol.* (1994) doi:10.1085/jgp.104.3.523.
  43. Strichartz, G. R. The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. *J. Gen. Physiol.* (1973) doi:10.1085/jgp.62.1.37.
  44. Yeh, J. Z. & Narahashi, T. Kinetic analysis of pancuronium interaction with sodium channels in squid axon membranes. *J. Gen. Physiol.* (1977) doi:10.1085/jgp.69.3.293.
  45. Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science (80- )*. (1998) doi:10.1126/science.280.5360.69.
  46. Jiang, Y. *et al.* The open pore conformation of potassium channels. *Nature* (2002) doi:10.1038/417523a.
  47. Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996) doi:10.1073/pnas.93.17.9270.
  48. Ahern, C. A., Eastwood, A. L., Dougherty, D. A. & Horn, R. Electrostatic contributions of aromatic residues in the local anesthetic receptor of voltage-gated sodium channels. *Circ. Res.* (2008) doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.160663.
  49. Pless, S. A., Galpin, J. D., Frankel, A. & Ahern, C. A. Molecular basis for class Ib antiarrhythmic inhibition of cardiac sodium channels. *Nat. Commun.* (2011) doi:10.1038/ncomms1351.
  50. Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T. & Catterall, W. A. Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup> channels by local anesthetics. *Science (80- )*. (1994) doi:10.1126/science.8085162.
  51. Yu, F. H., Yarov-Yarovoy, V., Gutman, G. A. & Catterall, W. A. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacological Reviews* (2005) doi:10.1124/pr.57.4.13.
  52. Lipkind, G. M. & Fozzard, H. A. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol. Pharmacol.* (2005) doi:10.1124/mol.105.014803.
  53. O'Connor, A. B. & Dworkin, R. H. Treatment of Neuropathic Pain: An Overview of Recent Guidelines. *Am. J. Med.* (2009) doi:10.1016/j.amjmed.2009.04.007.

54. Butterworth, J. & Hammon, J. W. Lidocaine for neuroprotection: More evidence of efficacy. *Anesthesia and Analgesia* (2002) doi:10.1097/00000539-200211000-00001.
55. Van Genderen, P. J. J. *et al.* Hereditary erythromelgia and acquired erythromelgia [3]. *American Journal of Medical Genetics* (1993) doi:10.1002/ajmg.1320450426.
56. Cheng, X., Dib-Hajj, S. D., Tyrrell, L. & Waxman, S. G. Mutation I136V alters electrophysiological properties of the Nav1.7 channel in a family with onset of erythromelgia in the second decade. *Mol. Pain* (2008) doi:10.1186/1744-8069-4-1.
57. Yang, Y. *et al.* Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythromelgia. *J. Med. Genet.* (2004) doi:10.1136/jmg.2003.012153.
58. Dib-Hajj, S. D. *et al.* Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* (2005) doi:10.1093/brain/awh514.
59. Choi, J. S., Dib-Hajj, S. D. & Waxman, S. G. Inherited erythromelgia: Limb pain from an S4 charge-neutral Na channelopathy. *Neurology* (2006) doi:10.1212/01.wnl.0000231514.33603.1e.
60. Djouhri, L. *et al.* Sensory and electrophysiological properties of guinea-pig sensory neurones expressing Nav 1.7 (PN1) Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$  subunit protein. *Journal of Physiology* (2003) doi:10.1113/jphysiol.2002.026559.
61. Fischer, T. Z. & Waxman, S. G. Familial pain syndromes from mutations of the Nav1.7 sodium channel. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2010) doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05110.x.
62. Fertleman, C. R. *et al.* SCN9A Mutations in Paroxysmal Extreme Pain Disorder: Allelic Variants Underlie Distinct Channel Defects and Phenotypes. *Neuron* (2006) doi:10.1016/j.neuron.2006.10.006.
63. Dib-Hajj, S. D. *et al.* Paroxysmal extreme pain disorder M1627K mutation in human Nav 1.7 renders DRG neurons hyperexcitable. *Mol. Pain* (2008) doi:10.1186/1744-8069-4-37.
64. Fertleman, C. R. *et al.* Paroxysmal extreme pain disorder (previously familial rectal pain syndrome). *Neurology* (2007) doi:10.1212/01.wnl.0000268065.16865.5f.
65. Cox, J. J. *et al.* An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature05413.
66. Lai, J. *et al.* Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, Nav1.8. *Pain* (2002) doi:10.1016/S0304-3959(01)00391-8.
67. Dib-Hajj, S., Black, J. A., Felts, P. & Waxman, S. G. Down-regulation of transcripts for Na channel  $\alpha$ -SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996) doi:10.1073/pnas.93.25.14950.
68. Thériault, O. & Chahine, M. Correlation of the electrophysiological profiles and sodium channel transcripts of individual rat dorsal root ganglia neurons. *Front. Cell. Neurosci.* (2014) doi:10.3389/fncel.2014.00285.
69. Dib-Hajj, S. D., Black, J. A. & Waxman, S. G. Na v 1.9: A sodium channel linked to human pain. *Nat. Rev. Neurosci.* (2015) doi:10.1038/nrn3977.
70. Phatarakijirund, V. *et al.* Congenital insensitivity to pain: Fracturing without

- apparent skeletal pathobiology caused by an autosomal dominant, second mutation in SCN11A encoding voltage-gated sodium channel 1.9. *Bone* (2016) doi:10.1016/j.bone.2015.11.022.
71. Han, C. *et al.* Familial gain-of-function Nav1.9 mutation in a painful channelopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2017) doi:10.1136/jnnp-2016-313804.
  72. Okuda, H. *et al.* Infantile pain episodes associated with novel Nav1.9 mutations in familial episodic pain syndrome in Japanese families. *PLoS One* (2016) doi:10.1371/journal.pone.0154827.
  73. Leipold, E. *et al.* Cold-aggravated pain in humans caused by a hyperactive NaV1.9 channel mutant. *Nat. Commun.* (2015) doi:10.1038/ncomms10049.
  74. Han, C. *et al.* The Domain II S4-S5 Linker in Nav1.9: A Missense Mutation Enhances Activation, Impairs Fast Inactivation, and Produces Human Painful Neuropathy. *NeuroMolecular Med.* (2015) doi:10.1007/s12017-015-8347-9.
  75. Huang, J. *et al.* Gain-of-function mutations in sodium channel NaV1.9 in painful neuropathy. *Brain* (2014) doi:10.1093/brain/awu079.
  76. Rasmussen, B. K., Jensen, R., Schroll, M. & Olesen, J. Epidemiology of headache in a general population-A prevalence study. *J. Clin. Epidemiol.* (1991) doi:10.1016/0895-4356(91)90147-2.
  77. Stovner, L. J. & Andree, C. Prevalence of headache in Europe: A review for the Eurolight project. *Journal of Headache and Pain* (2010) doi:10.1007/s10194-010-0217-0.
  78. Edmeads, J. *et al.* Impact of Migraine and Tension-Type Headache on Life-Style, Consulting Behaviour, and Medication Use: A Canadian Population Survey. *Can. J. Neurol. Sci. / J. Can. des Sci. Neurol.* (1993) doi:10.1017/S0317167100047697.
  79. Stang, P., Von Korff, M. & Galer, B. S. Reduced labor force participation among primary care patients with headache. *J. Gen. Intern. Med.* (1998) doi:10.1046/j.1525-1497.1998.00094.x.
  80. Stovner, L. J. *et al.* The global burden of headache: A documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia* (2007) doi:10.1111/j.1468-2982.2007.01288.x.
  81. Linde, M. *et al.* The cost of headache disorders in Europe: The Eurolight project. *Eur. J. Neurol.* (2012) doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03612.x.
  82. Levin, M. The international classification of headache disorders, 3rd Edition (ICHD III) - Changes and challenges. *Headache* (2013) doi:10.1111/head.12189.
  83. Olesen, J. *et al.* New appendix criteria open for a broader concept of chronic migraine. *Cephalalgia* (2006) doi:10.1111/j.1468-2982.2006.01172.x.
  84. Katsarava, Z. *et al.* Chronic migraine: Classification and comparisons. *Cephalalgia* (2011) doi:10.1177/0333102410383590.
  85. Olesen, J. The international classification of headache disorders. *Headache* (2008) doi:10.1111/j.1526-4610.2008.01121.x.
  86. Linde, M. Migraine: A review and future directions for treatment. *Acta Neurologica Scandinavica* (2006) doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00670.x.
  87. Kelman, L. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia* (2007) doi:10.1111/j.1468-2982.2007.01303.x.
  88. Manzoni, G. C. & Stovner, L. J. *Epidemiology of headache. Handbook of Clinical*

- Neurology* (2010). doi:10.1016/S0072-9752(10)97001-2.
89. MacGregor, E. A., Rosenberg, J. D. & Kurth, T. Sex-related differences in epidemiological and clinic-based headache studies. *Headache* (2011) doi:10.1111/j.1526-4610.2011.01904.x.
  90. Victor, T., Hu, X., Campbell, J., Buse, D. & Lipton, R. Migraine prevalence by age and sex in the United States: A life-span study. *Cephalalgia* (2010) doi:10.1177/0333102409355601.
  91. Winter, A. C., Berger, K., Buring, J. E. & Kurth, T. Associations of socioeconomic status with migraine and non-migraine headache. *Cephalalgia* (2012) doi:10.1177/0333102411430854.
  92. Cevoli, S. *et al.* Underdiagnosis and undertreatment of migraine in Italy: A survey of patients attending for the first time 10 headache centres. *Cephalalgia* (2009) doi:10.1111/j.1468-2982.2009.01874.x.
  93. Dahlöf, C. G. H. Measuring disability and quality of life in migraine. in *Drugs of Today* (2003).
  94. Lantéri-Minet, M., Radat, F., Chautard, M. H. & Lucas, C. Anxiety and depression associated with migraine: Influence on migraine subjects' disability and quality of life, and acute migraine management. *Pain* (2005) doi:10.1016/j.pain.2005.09.010.
  95. Leonardi, M., Raggi, A., Bussone, G. & D'Amico, D. Health-related quality of life, disability and severity of disease in patients with migraine attending to a specialty headache center. *Headache* (2010) doi:10.1111/j.1526-4610.2010.01770.x.
  96. Osterhaus, J. T., Townsend, R. J., Gandek, B. & Ware, J. E. Measuring the Functional Status and Well-Being of Patients with Migraine Headache. *Headache J. Head Face Pain* (1994) doi:10.1111/j.1526-4610.1994.hed3406337.x.
  97. Edmeads, J. & Mackell, J. A. The economic impact of migraine: An analysis of direct and indirect costs. *Headache* (2002) doi:10.1046/j.1526-4610.2002.04262.x.
  98. Jensen, R. Diagnosis, epidemiology, and impact of tension-type headache. *Current Pain and Headache Reports* (2003) doi:10.1007/s11916-003-0061-x.
  99. Crystal, S. C. & Robbins, M. S. Epidemiology of tension-type headache. *Current Pain and Headache Reports* (2010) doi:10.1007/s11916-010-0146-2.
  100. Oleson, J. Response to Seshia S *et al.*: The classification of chronic headache: Room for further improvement? Chronic headache classification. *Cephalalgia* (2010) doi:10.1111/j.1468-2982.2009.02005.x.
  101. Scher, A. I., Stewart, W. F., Liberman, J. & Lipton, R. B. Prevalence of frequent headache in a population sample. *Headache* (1998) doi:10.1046/j.1526-4610.1998.3807497.x.
  102. Scher, A. I., Midgette, L. A. & Lipton, R. B. Risk factors for headache chronification. *Headache* (2008) doi:10.1111/j.1526-4610.2007.00970.x.
  103. Murinova, N. & Krashin, D. Chronic Daily Headache. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America* (2015) doi:10.1016/j.pmr.2015.01.001.
  104. Castillo, J., Muñoz, P., Guitera, V. & Pascual, J. Epidemiology of chronic daily headache in the general population. *Headache* (1999) doi:10.1046/j.1526-4610.1999.3903190.x.
  105. Wakerley, B. R. Medication-overuse headache. *Practical Neurology* (2019) doi:10.1136/practneurol-2018-002048.

106. Ashina, M. *et al.* Migraine and the trigeminovascular system—40 years and counting. *The Lancet Neurology* vol. 18 795–804 (2019).
107. Nosedá, R. & Burstein, R. Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. in *Pain* (2013). doi:10.1016/j.pain.2013.07.021.
108. Burstein, R., Nosedá, R. & Borsook, D. Migraine: multiple processes, complex pathophysiology. *J. Neurosci.* **35**, 6619–6629 (2015).
109. Nosedá, R., Jakubowski, M., Kainz, V., Borsook, D. & Burstein, R. Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: Implications for migraine headache and its associated symptoms. *J. Neurosci.* (2011) doi:10.1523/JNEUROSCI.3285-11.2011.
110. Sumelahti, M. L., Mattila, K., Sillanmäki, L. & Sumanen, M. Prescription patterns in preventive and abortive migraine medication. *Cephalalgia* (2011) doi:10.1177/0333102411427602.
111. Nicholson, R. A., Buse, D. C., Andrasik, F. & Lipton, R. B. Nonpharmacologic treatments for migraine and tension-type headache: How to choose and when to use. *Curr. Treat. Options Neurol.* (2011) doi:10.1007/s11940-010-0102-9.
112. Evers, S. *et al.* EFNS guideline on the drug treatment of migraine - Revised report of an EFNS task force. *European Journal of Neurology* (2009) doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02748.x.
113. WHO | WHO Model Lists of Essential Medicines. *WHO* (2020).
114. Lampl, C., Voelker, M. & Diener, H. C. Efficacy and safety of 1,000 mg effervescent aspirin: Individual patient data meta-analysis of three trials in migraine headache and migraine accompanying symptoms. *J. Neurol.* (2007) doi:10.1007/s00415-007-0547-2.
115. Lampl, C., Voelker, M. & Steiner, T. J. Aspirin is first-line treatment for migraine and episodic tension-type headache regardless of headache intensity. *Headache* (2012) doi:10.1111/j.1526-4610.2011.01974.x.
116. Derry, S., Wiffen, P. J. & Moore, R. A. Aspirin for acute treatment of episodic tension-type headache in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2017) doi:10.1002/14651858.CD011888.pub2.
117. Bendtsen, L. *et al.* EFNS guideline on the treatment of tension-type headache - Report of an EFNS task force. *Eur. J. Neurol.* (2010) doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03070.x.
118. Tfelt-Hansen, P. & Steiner, T. J. Over-the-counter triptans for migraine: What are the implications? *CNS Drugs* (2007) doi:10.2165/00023210-200721110-00001.
119. Diener, H. C. & Limmroth, V. Medication-overuse headache: A worldwide problem. *Lancet Neurology* (2004) doi:10.1016/S1474-4422(04)00824-5.
120. Evers, S. & Jensen, R. Treatment of medication overuse headache - guideline of the EFNS headache panel. *Eur. J. Neurol.* (2011) doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03497.x.
121. Limmroth, V., Katsarava, Z., Fritsche, G., Przywara, S. & Diener, H. C. Features of medication overuse headache following overuse of different acute headache drugs. *Neurology* (2002) doi:10.1212/WNL.59.7.1011.
122. Lee, D. L., Hansen, E. H. & Holstein, B. E. Using analgesics as tools: Young women's

- treatment for headache. *Qual. Health Res.* (2008) doi:10.1177/1049732307312303.
123. Lipton, R. B. & Bigal, M. E. Chronic daily headache: Is analgesic overuse a cause or a consequence? *Neurology* (2003) doi:10.1212/WNL.61.2.154.
  124. Tepper, S. J. Debate: Analgesic overuse is a cause, not consequence, of chronic daily headache. Analgesic overuse is a cause of chronic daily headache. *Headache* (2002) doi:10.1046/j.1526-4610.2002.02133\_1.x.
  125. Zwart, J. A., Dyb, G., Hagen, K., Svebak, S. & Holmen, J. Analgesic use: A predictor of chronic pain and medication overuse headache: The head-HUNT study. *Neurology* (2003) doi:10.1212/01.WNL.0000069924.69078.8D.
  126. Katsarava, Z., Wissmann, A. & Diener, H. C. Prevalence of chronic headache in a population-based sample in Germany and incidence and predictors for headache chronicity in patients with episodic migraine and tension-type headache. *Aktuelle Neurol.* (2007) doi:10.1055/s-2007-970944.
  127. Katsarava, Z. *et al.* Incidence and predictors for chronicity of headache in patients with episodic migraine. *Neurology* (2004) doi:10.1212/01.WNL.0000113747.18760.D2.
  128. Bigal, M. E. The paradoxical effects of analgesics and the development of chronic migraine. *Arq. Neuropsiquiatr.* (2011) doi:10.1590/s0004-282x2011000400025.
  129. Diener, H. C., Holle, D., Solbach, K. & Gaul, C. Medication-overuse headache: Risk factors, pathophysiology and management. *Nature Reviews Neurology* (2016) doi:10.1038/nrneurol.2016.124.
  130. Da Silva, A. N. & Lake III, A. E. Clinical aspects of medication overuse headaches. *Headache* **54**, 211–217 (2014).
  131. Kristoffersen, E. S. & Lundqvist, C. Medication-overuse headache: A review. *Journal of Pain Research* (2014) doi:10.2147/JPR.S46071.
  132. Bahra, A., Walsh, M., Menon, S. & Goadsby, P. J. Does chronic daily headache arise de novo in association with regular use of analgesics? *Headache* (2003) doi:10.1046/j.1526-4610.2003.03041.x.
  133. Wilkinson, S. M., Becker, W. J. & Heine, J. A. Opiate use to control bowel motility may induce chronic daily headache in patients with migraine. *Headache* (2001) doi:10.1046/j.1526-4610.2001.111006303.x.
  134. Zeeberg, P., Olesen, J. & Jensen, R. Discontinuation of medication overuse in headache patients: Recovery of therapeutic responsiveness. *Cephalalgia* (2006) doi:10.1111/j.1468-2982.2006.01190.x.
  135. Cevoli, S. *et al.* Treatment of withdrawal headache in patients with medication overuse headache: a pilot study. *J. Headache Pain* (2017) doi:10.1186/s10194-017-0763-9.
  136. Bigal, M. E. & Lipton, R. B. Excessive acute migraine medication use and migraine progression. *Neurology* (2008) doi:10.1212/01.wnl.0000335946.53860.1d.
  137. Da Silva, A. N. & Lake, A. E. Clinical aspects of medication overuse headaches. *Headache* (2014) doi:10.1111/head.12223.
  138. PETERS, G. A. & HORTON, B. T. Headache; with special reference to the excessive use of ergotamine. *J. Lab. Clin. Med.* (1950).
  139. HORTON, B. T. & PETERS, G. A. CLINICAL MANIFESTATIONS OF EXCESSIVE USE OF ERGOTAMINE PREPARATIONS AND MANAGEMENT OF WITHDRAWAL EFFECT:

- REPORT OF 52 CASES. *Headache J. Head Face Pain* (1963) doi:10.1111/j.1526-4610.1963.hed0204214.x.
140. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. Headache Classification Committee of the International Headache Society. *Cephalalgia* (1988).
  141. &NA; Link between heavy consumption and inappropriate use of sumatriptan. *Inpharma Wkly.* (1998) doi:10.2165/00128413-199811360-00011.
  142. Gaist, D. *et al.* Inappropriate use of sumatriptan: Population based register and interview study. *Br. Med. J.* (1998) doi:10.1136/bmj.316.7141.1352.
  143. Gaist, D. Use and overuse of sumatriptan. Pharmacoepidemiological studies based on prescription register and interview data. *Cephalalgia* (1999) doi:10.1046/j.1468-2982.1999.019008735.x.
  144. Limmroth, V., Kazarawa, Z., Fritsche, G. & Diener, H. C. Headache after frequent use of serotonin agonists zolmitriptan and naratriptan. *Lancet* (1999) doi:10.1016/S0140-6736(05)74950-3.
  145. Tepper, S. J. The International Classification of Headache Disorders, 2nd Edition (ICHD-II) - Revision of criteria for 8.2 Medication-overuse headache: Commentary. *Headache* (2005) doi:10.1111/j.1526-4610.2005.00282.x.
  146. Grazzi, L., Andrasik, F., Usai, S. & Bussone, G. Headache with medication overuse: Treatment strategies and proposals of relapse prevention. *Neurological Sciences* (2008) doi:10.1007/s10072-008-0867-8.
  147. Wiendels, N. J. *et al.* Chronic frequent headache in the general population: Prevalence and associated factors. *Cephalalgia* (2006) doi:10.1111/j.1468-2982.2006.01210.x.
  148. Aaseth, K. *et al.* Prevalence of secondary chronic headaches in a population-based sample of 30-44-year-old persons. The Akershus study of chronic headache. *Cephalalgia* (2008) doi:10.1111/j.1468-2982.2008.01577.x.
  149. Straube, A. *et al.* Prevalence of chronic migraine and medication overuse headache in Germany - The German DMKG headache study. *Cephalalgia* (2010) doi:10.1111/j.1468-2982.2009.01906.x.
  150. Hagen, K., Linde, M., Steiner, T. J., Stovner, L. J. & Zwart, J. A. Risk factors for medication-overuse headache: An 11-year follow-up study. the Nord-Trøndelag Health Studies. *Pain* (2012) doi:10.1016/j.pain.2011.08.018.
  151. Rapoport, A. *et al.* Analgesic rebound headache in clinical practice: Data from a physician survey. *Headache* (1996) doi:10.1046/j.1526-4610.1996.3601014.x.
  152. Zwart, J. A. *et al.* Analgesic overuse among subjects with headache, neck, and low-back pain. *Neurology* (2004) doi:10.1212/01.WNL.0000123262.96132.FC.
  153. Hagen, K. *et al.* Low socio-economic status is associated with increased risk of frequent headache: A prospective study of 22 718 adults in Norway. *Cephalalgia* (2002) doi:10.1046/j.1468-2982.2002.00413.x.
  154. Atasoy, H. T., Unal, A. E., Atasoy, N., Emre, U. & Sumer, M. Low income and education levels may cause medication overuse and chronicity in migraine patients. *Headache* (2005) doi:10.1111/j.1526-4610.2005.05006.x.
  155. Lantéri-Minet, M., Duru, G., Mudge, M. & Cottrell, S. Quality of life impairment, disability and economic burden associated with chronic daily headache, focusing on



- chronic migraine with or without medication overuse: A systematic review. *Cephalalgia* (2011) doi:10.1177/0333102411398400.
156. Craig, D. G. N. *et al.* Staggered overdose pattern and delay to hospital presentation are associated with adverse outcomes following paracetamol-induced hepatotoxicity. *Br. J. Clin. Pharmacol.* (2012) doi:10.1111/j.1365-2125.2011.04067.x.
  157. Bongsebandhu-phubhakdi, S. & Srikiatkachorn, A. Pathophysiology of medication-overuse headache: implications from animal studies. *Curr.Pain Headache Rep.* **16**, 110–115 (2012).
  158. Couch, J. R. Update on chronic daily headache. *Curr. Treat. Options Neurol.* (2011) doi:10.1007/s11940-010-0104-7.
  159. Smith, T. R. & Stoneman, J. Medication overuse headache from antimigraine therapy: Clinical features, pathogenesis and management. *Drugs* (2004) doi:10.2165/00003495-200464220-00002.
  160. Bottiroli, S., Galli, F., Viana, M., Sances, G. & Tassorelli, C. Traumatic experiences, stressful events, and alexithymia in chronic migraine with medication overuse. *Front. Psychol.* (2018) doi:10.3389/fpsyg.2018.00704.
  161. Radat, F. *et al.* Psychiatric comorbidity in the evolution from migraine to medication overuse headache. *Cephalalgia* (2005) doi:10.1111/j.1468-2982.2005.00910.x.
  162. Sarchielli, P. *et al.* Psychopathological comorbidities in medication-overuse headache: A multicentre clinical study. *Eur. J. Neurol.* (2016) doi:10.1111/ene.12794.
  163. Cupini, L. M. & Calabresi, P. Medication-overuse headache: Pathophysiological insights. *J. Headache Pain* (2005) doi:10.1007/s10194-005-0184-z.
  164. Calabresi, P. & Cupini, L. M. Medication-overuse headache: similarities with drug addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 62–68 (2005).
  165. Fuh, J. L. & Wang, S. J. Dependent behavior in patients with medication-overuse headache. *Current Pain and Headache Reports* (2012) doi:10.1007/s11916-011-0240-0.
  166. De Felice, M., Ossipov, M. H. & Porreca, F. Persistent medication-induced neural adaptations, descending facilitation, and medication overuse headache. *Curr.Opin.Neurol.* **24**, 193–196 (2011).
  167. Hitomi, S., Kross, K., Kurose, M., Porreca, F. & Meng, I. D. Activation of dura-sensitive trigeminal neurons and increased c-Fos protein induced by morphine withdrawal in the rostral ventromedial medulla. *Cephalalgia* (2017) doi:10.1177/0333102416648655.
  168. De Felice, M. & Porreca, F. Opiate-induced persistent pronociceptive trigeminal neural adaptations: Potential relevance to opiate-induced medication overuse headache. *Cephalalgia* (2009) doi:10.1111/j.1468-2982.2009.01873.x.
  169. De Felice, M. *et al.* Triptan-induced enhancement of neuronal nitric oxide synthase in trigeminal ganglion dural afferents underlies increased responsiveness to potential migraine triggers. *Brain* (2010) doi:10.1093/brain/awq159.
  170. De Felice, M., Ossipov, M. H. & Porreca, F. Persistent medication-induced neural adaptations, descending facilitation, and medication overuse headache. *Curr. Opin. Neurol.* **24**, 193–196 (2011).
  171. Rossi, P., Di Lorenzo, C., Faroni, J., Cesarino, F. & Nappi, G. Advice alone vs. structured detoxification programmes for medication overuse headache: A

- prospective, randomized, open-label trial in transformed migraine patients with low medical needs. *Cephalalgia* (2006) doi:10.1111/j.1468-2982.2006.01175.x.
172. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* (2004) doi:10.1038/nature02625.
  173. Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* (2010) doi:10.1038/nbt.1685.
  174. Wessman, M., Terwindt, G. M., Kaunisto, M. A., Palotie, A. & Ophoff, R. A. Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurology* (2007) doi:10.1016/S1474-4422(07)70126-6.
  175. MacGregor, E. A. Oestrogen and attacks of migraine with and without aura. *Lancet Neurology* (2004) doi:10.1016/S1474-4422(04)00768-9.
  176. Freeman, E. W., Sammel, M. D., Lin, H., Gracia, C. R. & Kapoor, S. Symptoms in the menopausal transition: Hormone and behavioral correlates. *Obstet. Gynecol.* (2008) doi:10.1097/01.AOG.0000295867.06184.b1.
  177. Holsboer, F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* (2000) doi:10.1016/S0893-133X(00)00159-7.
  178. Wilkinson, M. B. *et al.* Imipramine treatment and resiliency exhibit similar chromatin regulation in the mouse nucleus accumbens in depression models. *J. Neurosci.* (2009) doi:10.1523/JNEUROSCI.0932-09.2009.
  179. Tsankova, N. M. *et al.* Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* (2006) doi:10.1038/nn1659.
  180. Amir, R. E. *et al.* Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* (1999) doi:10.1038/13810.
  181. Gibbons, R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2006) doi:10.1186/1750-1172-1-15.
  182. Kobow, K. *et al.* Increased reelin promoter methylation is associated with granule cell dispersion in human temporal lobe epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (2009) doi:10.1097/NEN.0b013e31819ba737.
  183. Haas, C. A. & Frotscher, M. Reelin deficiency causes granule cell dispersion in epilepsy. *Experimental Brain Research* (2010) doi:10.1007/s00221-009-1948-5.
  184. Scher, A. I., Stewart, W. F., Ricci, J. A. & Lipton, R. B. Factors associated with the onset and remission of chronic daily headache in a population-based study. *Pain* (2003) doi:10.1016/S0304-3959(03)00293-8.
  185. Passaro, D. *et al.* Epigenetic chromatin modifications in the cortical spreading depression. *Brain Res.* (2010) doi:10.1016/j.brainres.2010.03.001.
  186. Rana, G. *et al.* Cortical spreading depression differentially affects lysine methylation of H3 histone at neuroprotective genes and retrotransposon sequences. *Brain Res.* (2012) doi:10.1016/j.brainres.2012.05.043.
  187. Guo, J. U. *et al.* Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat. Neurosci.* (2011) doi:10.1038/nn.2900.
  188. Nelson, E. D. & Monteggia, L. M. Epigenetics in the mature mammalian brain: Effects on behavior and synaptic transmission. *Neurobiol. Learn. Mem.* (2011) doi:10.1016/j.nlm.2011.02.015.
  189. Leonard, B. E. The CGRP family: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) amylin and

- adrenomellullin. Edited by David Poyner, Ian Marshall and Susan D. Brain. Landes Bioscience, 2000. Pages: 261. ISBN: 1-58706-004-3. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* (2001) doi:10.1002/hup.242.
190. Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S. & Evans, R. M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* (1982) doi:10.1038/298240a0.
  191. Iyengar, S., Ossipov, M. H. & Johnson, K. W. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain* **158**, 543–559 (2017).
  192. Chen, J. Y., Campos, C. A., Jarvie, B. C. & Palmiter, R. D. Parabrachial CGRP Neurons Establish and Sustain Aversive Taste Memories. *Neuron* (2018) doi:10.1016/j.neuron.2018.09.032.
  193. Campos, C. A., Bowen, A. J., Schwartz, M. W. & Palmiter, R. D. Parabrachial CGRP Neurons Control Meal Termination. *Cell Metab.* (2016) doi:10.1016/j.cmet.2016.04.006.
  194. Höppener, J. W. M. *et al.* Detection of mRNA encoding calcitonin, calcitonin gene related peptide and proopiomelanocortin in human tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* (1986) doi:10.1016/0303-7207(86)90023-7.
  195. Steenbergh, P. H., Höppener, J. W. M., Zandberg, J., Lips, C. J. M. & Jansz, H. S. A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett.* (1985) doi:10.1016/0014-5793(85)80820-6.
  196. Höppener, J. W. M. *et al.* The second human calcitonin/CGRP gene is located on chromosome 11. *Hum. Genet.* (1985) doi:10.1007/BF00273453.
  197. Alevizaki, M. *et al.* The calcitonin-like sequence of the  $\beta$  CGRP gene. *FEBS Lett.* (1986) doi:10.1016/0014-5793(86)81338-2.
  198. Bell, D. & Mcdermott, B. J. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: Characterization of receptor populations and their (patho)physiological significance. *Pharmacol. Rev.* (1996).
  199. Russell, F. A., King, R., Smillie, S. J., Kodji, X. & Brain, S. D. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* (2014) doi:10.1152/physrev.00034.2013.
  200. Conner, A. C. *et al.* Interaction of calcitonin-gene-related peptide with its receptors. in *Biochemical Society Transactions* (2002). doi:10.1042/BST0300451.
  201. Wimalawansa, S. J. Blood Pressure and Cardiovascular Tone: Role of CGRP Family of Peptides. *Sci. World J.* (2001) doi:10.1100/tsw.2001.446.
  202. Lundberg, J. M., Franco-Cereceda, A., Hua, X., Hökfelt, T. & Fischer, J. A. Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* (1985) doi:10.1016/0014-2999(85)90456-X.
  203. Roa, M. & Changeux, J. P. Characterization and developmental evolution of a high-affinity binding site for calcitonin gene-related peptide on chick skeletal muscle membrane. *Neuroscience* (1991) doi:10.1016/0306-4522(91)90349-S.
  204. Gibson, S. J. *et al.* Calcitonin gene-related peptide messenger RNA is expressed in sensory neurones of the dorsal root ganglia and also in spinal motoneurons in man and rat. *Neurosci. Lett.* (1988) doi:10.1016/0304-3940(88)90694-5.

205. Wimalawansa, S. J. & MacIntyre, I. The presence of calcitonin gene-related peptide in human cerebrospinal fluid. *Brain* **110** ( Pt 6, 1647–1655 (1987).
206. Hagner, S. *et al.* Calcitonin receptor-like receptor is expressed on gastrointestinal immune cells. *Digestion* (2002) doi:10.1159/000068365.
207. Hagner, S. *et al.* Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin. *Peptides* (2002) doi:10.1016/S0196-9781(01)00586-1.
208. Hagner, S., Stahl, U., Knoblauch, B., McGregor, G. & Lang, R. Calcitonin receptor-like receptor: Identification and distribution in human peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* (2002) doi:10.1007/s00441-002-0616-x.
209. McLatchie, L. M. *et al.* RAMPS regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin- receptor-like receptor. *Nature* (1998) doi:10.1038/30666.
210. Fraser, N. J. *et al.* The amino terminus of receptor activity modifying proteins is a critical determinant of glycosylation state and ligand binding of calcitonin receptor-like receptor. *Mol. Pharmacol.* (1999) doi:10.1124/mol.55.6.1054.
211. Hay, D. L. *et al.* A comparison of the actions of BIBN4096BS and CGRP8-37 on CGRP and adrenomedullin receptors expressed on SK-N-MC, L6, Col 29 and Rat 2 cells. *Br. J. Pharmacol.* (2002) doi:10.1038/sj.bjp.0704844.
212. Goadsby, P. J., Lipton, R. B. & Ferrari, M. D. Migraine - Current understanding and treatment. *New England Journal of Medicine* (2002) doi:10.1056/NEJMra010917.
213. Edvinsson, L. New therapeutic target in primary headaches - Blocking the CGRP receptor. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2003) doi:10.1517/14728222.7.3.377.
214. Hasbak, P., Sams, A., Schifter, S., Longmore, J. & Edvinsson, L. CGRP receptors mediating CGRP-, adrenomedullin- and amylin-induced relaxation in porcine coronary arteries. Characterization with 'Compound 1' (WO98/11128), a non-peptide antagonist. *Br. J. Pharmacol.* (2001) doi:10.1038/sj.bjp.0704210.
215. Villalón, C. M., Centurión, D., Valdivia, L. F., De Vries, P. & Saxena, P. R. An introduction to migraine: From ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. in *Proceedings of the Western Pharmacology Society* (2002).
216. De Vries, P., Villalón, C. M. & Saxena, P. R. Pharmacological aspects of experimental headache models in relation to acute antimigraine therapy. *European Journal of Pharmacology* (1999) doi:10.1016/S0014-2999(99)00197-1.
217. Bigal, M. E., Rapoport, A. M., Sheftell, F. D. & Tepper, S. J. New migraine preventive options: an update with pathophysiological considerations. *Revista do Hospital das Clínicas* (2002) doi:10.1590/S0041-87812002000600009.
218. Tepper, S. J., Rapoport, A. M. & Sheftell, F. D. Mechanisms of action of the 5-HT 1B/1D receptor agonists. *Archives of Neurology* (2002) doi:10.1001/archneur.59.7.1084.
219. Williamson, D. J. & Hargreaves, R. J. Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc. Res. Tech.* (2001) doi:10.1002/jemt.1081.
220. VanDenBrink, A. M. *et al.* Craniovascular selectivity of eletriptan and sumatriptan in human isolated blood vessels. *Neurology* (2000) doi:10.1212/WNL.55.10.1524.
221. MaassenVanDenBrink, A., Reekers, M., Bax, W. A. & Saxena, P. R. Human isolated coronary artery contraction to sumatriptan characterised by the selective 5-HT(1B/1D) receptor antagonist GR55562. *Pharmacol. Toxicol.* (2000)

- doi:10.1111/j.0901-9928.2000.860608.x.
222. Goadsby, P. J., Hoskin, K. L., Storer, R. J., Edvinsson, L. & Connor, H. E. Adenosine A1 receptor agonists inhibit trigeminovascular nociceptive transmission. *Brain* (2002) doi:10.1093/brain/awf141.
  223. Willems, E. W., Valdivia, L. F., Saxena, P. R. & Villalón, C. M. The role of several  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes mediating vasoconstriction in the canine external carotid circulation. *Br. J. Pharmacol.* (2001) doi:10.1038/sj.bjp.0703915.
  224. Giffin, N. J. *et al.* Effect of the adenosine A1 receptor agonist GR79236 on trigeminal nociception with blink reflex recordings in healthy human subjects. *Cephalalgia* (2003) doi:10.1046/j.1468-2982.2003.00511.x.
  225. Chiba, T. *et al.* Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* (1989) doi:10.1152/ajpendo.1989.256.2.e331.
  226. Rist, B., Lacroix, J. S., Entzeroth, M., Doods, H. N. & Beck-Sickinger, A. G. CGRP 27-37 analogues with high affinity to the CGRP1 receptor show antagonistic properties in a rat blood flow assay. *Regul. Pept.* (1999) doi:10.1016/S0167-0115(98)00159-1.
  227. Reuter, U. A Review of Monoclonal Antibody Therapies and Other Preventative Treatments in Migraine. *Headache* (2018) doi:10.1111/head.13302.
  228. Taylor, F. R. Antigens and Antibodies in Disease With Specifics About CGRP Immunology. *Headache* (2018) doi:10.1111/head.13409.
  229. Digre, K. B. What's New in the Treatment of Migraine? *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* (2019) doi:10.1097/WNO.0000000000000837.
  230. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* (1997) doi:10.1038/38444.
  231. Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell* (1975) doi:10.1016/0092-8674(75)90149-X.
  232. Fan, Y. *et al.* H1 Linker Histones Are Essential for Mouse Development and Affect Nucleosome Spacing In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* (2003) doi:10.1128/mcb.23.13.4559-4572.2003.
  233. Taft, R. J., Pheasant, M. & Mattick, J. S. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays* (2007) doi:10.1002/bies.20544.
  234. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* (2011) doi:10.1038/cr.2011.22.
  235. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* (2007) doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
  236. Kumar, R., Li, D. Q., Müller, S. & Knapp, S. Epigenomic regulation of oncogenesis by chromatin remodeling. *Oncogene* (2016) doi:10.1038/onc.2015.513.
  237. Sadakierska-Chudy, A. & Filip, M. A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs. *Neurotoxicity Research* (2014) doi:10.1007/s12640-014-9508-6.
  238. Yap, K. L. & Zhou, M. M. Keeping it in the family: Diverse histone recognition by

- conserved structural folds. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (2010) doi:10.3109/10409238.2010.512001.
239. Montalban, X. *et al.* Modulation of glutamate exocytosis by presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* **7**, in-press (1994).
  240. Tsukiyama, T. The in vivo functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2002) doi:10.1038/nrm828.
  241. Euskirchen, G. M. *et al.* Diverse roles and interactions of the SWI/SNF chromatin remodeling complex revealed using global approaches. *PLoS Genet.* (2011) doi:10.1371/journal.pgen.1002008.
  242. Smith, B. C. & Denu, J. M. Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (2009) doi:10.1016/j.bbagr.2008.06.005.
  243. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* (2000) doi:10.1038/47412.
  244. Chi, P., Allis, C. D. & Wang, G. G. Covalent histone modifications-miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature Reviews Cancer* (2010) doi:10.1038/nrc2876.
  245. Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annual Review of Biochemistry* (2009) doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
  246. Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. & Côté, J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends in Genetics* (2003) doi:10.1016/S0168-9525(03)00115-X.
  247. Gu, W. & Roeder, R. G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)80521-8.
  248. Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y. & Ogryzko, V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* (1998) doi:10.1038/25166.
  249. Zhang, W. & Bieker, J. J. Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998) doi:10.1073/pnas.95.17.9855.
  250. Janke, C. & Bulinski, J. C. Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2011) doi:10.1038/nrm3227.
  251. Bannister, A. J., Miska, E. A., Görlich, D. & Kouzarides, T. Acetylation of importin- $\alpha$  nuclear import factors by CBP/p300. *Curr. Biol.* (2000) doi:10.1016/S0960-9822(00)00445-0.
  252. Falkenberg, K. J. & Johnstone, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* (2014) doi:10.1038/nrd4360.
  253. Yang, X. J. & Seto, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: From bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2008) doi:10.1038/nrm2346.
  254. Hall, J. A., Dominy, J. E., Lee, Y. & Puigserver, P. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *Journal of Clinical Investigation* (2013) doi:10.1172/JCI64094.

255. Houtkooper, R. H., Pirinen, E. & Auwerx, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2012) doi:10.1038/nrm3293.
256. Bao, J. *et al.* Characterization of the murine SIRT3 mitochondrial localization sequence and comparison of mitochondrial enrichment and deacetylase activity of long and short SIRT3 isoforms. *J. Cell. Biochem.* (2010) doi:10.1002/jcb.22531.
257. Lagouge, M. *et al.* Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.11.013.
258. Gregoret, I. V., Lee, Y. M. & Goodson, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: Functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* (2004) doi:10.1016/j.jmb.2004.02.006.
259. De Ruijter, A. J. M., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S. & Van Kuilenburg, A. B. P. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal* (2003) doi:10.1042/BJ20021321.
260. Wang, Z. *et al.* Genome-wide Mapping of HATs and HDACs Reveals Distinct Functions in Active and Inactive Genes. *Cell* (2009) doi:10.1016/j.cell.2009.06.049.
261. Yang, X.-J. & Grégoire, S. Class II Histone Deacetylases: from Sequence to Function, Regulation, and Clinical Implication. *Mol. Cell. Biol.* (2005) doi:10.1128/mcb.25.8.2873-2884.2005.
262. Sahakian, E. *et al.* Histone deacetylase 11: A novel epigenetic regulator of myeloid derived suppressor cell expansion and function. *Mol. Immunol.* (2015) doi:10.1016/j.molimm.2014.08.002.
263. Jamaladdin, S. *et al.* Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014) doi:10.1073/pnas.1321330111.
264. Ocker, M. Deacetylase inhibitors - focus on non-histone targets and effects. *World J. Biol. Chem.* (2010) doi:10.4331/wjbc.v1.i5.55.
265. Ververis, K., Hiong, A., Karagiannis, T. C. & Licciardi, P. V. Histone deacetylase inhibitors (HDACIS): Multitargeted anticancer agents. *Biologics: Targets and Therapy* (2013) doi:10.2147/BTT.S29965.
266. Xu, W. S., Parmigiani, R. B. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitors: Molecular mechanisms of action. *Oncogene* (2007) doi:10.1038/sj.onc.1210620.
267. Knoepfler, P. S. & Eisenman, R. N. Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell* (1999) doi:10.1016/S0092-8674(00)81531-7.
268. Thiel, G., Lietz, M. & Hohl, M. How mammalian transcriptional repressors work. *European Journal of Biochemistry* (2004) doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04174.x.
269. Cowell, I. G. Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem. Sci.* (1994) doi:10.1016/0968-0004(94)90172-4.
270. Hassig, C. A. *et al.* A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998) doi:10.1073/pnas.95.7.3519.
271. Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C. & Seigneurin-Berny, D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Current Opinion in Genetics and Development* (2001) doi:10.1016/S0959-437X(00)00174-X.
272. Bannister, A. J., Oehler, T., Wilhelm, D., Angel, P. & Kouzarides, T. Stimulation of c-

- Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene* (1995).
273. Yuan, W., Condorelli, G., Caruso, M., Felsani, A. & Giordano, A. Human p300 protein is a coactivator for the transcription factor MyoD. *J. Biol. Chem.* (1996) doi:10.1074/jbc.271.15.9009.
  274. Kamei, Y. *et al.* A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* (1996) doi:10.1016/S0092-8674(00)81118-6.
  275. Zhang, J. J. *et al.* Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon  $\gamma$  signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996) doi:10.1073/pnas.93.26.15092.
  276. Deckert, J. & Struhl, K. Targeted Recruitment of Rpd3 Histone Deacetylase Represses Transcription by Inhibiting Recruitment of Swi/Snf, SAGA, and TATA Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* (2002) doi:10.1128/mcb.22.18.6458-6470.2002.
  277. Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D. & Wolffe, A. P. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* (1993) doi:10.1016/0092-8674(93)90051-Q.
  278. Zima, A. V., Pabbidi, M. R., Lipsius, S. L. & Blatter, L. A. Effects of mitochondrial uncoupling on Ca<sup>2+</sup> signaling during excitation-contraction coupling in atrial myocytes. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **304**, H983–H993 (2013).
  279. Richon, V. M., Sandhoff, T. W., Rifkind, R. A. & Marks, P. A. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2000) doi:10.1073/pnas.180316197.
  280. Johnstone, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: Novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* (2002) doi:10.1038/nrd772.
  281. Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A. & Perkins, N. D. A Novel Transcriptional Repression Domain Mediates p21WAF1/CIP1 Induction of p300 Transactivation. *Mol. Cell. Biol.* (2000) doi:10.1128/mcb.20.8.2676-2686.2000.
  282. Nawaz, Z. *et al.* The yeast SIN3 gene product negatively regulates the activity of the human progesterone receptor and positively regulates the activities of GAL4 and the HAP1 activator. *MGG Mol. Gen. Genet.* (1994) doi:10.1007/BF00297279.
  283. De Nadal, E. *et al.* The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature* (2004) doi:10.1038/nature02258.
  284. Mariadason, J. M., Corner, G. A. & Augenlicht, L. H. Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: Comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res.* (2000).
  285. Chambers, A. E. *et al.* Histone acetylation-mediated regulation of genes in leukaemic cells. *Eur. J. Cancer* (2003) doi:10.1016/S0959-8049(03)00072-8.
  286. Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C. D. Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* (2003) doi:10.1038/nature02017.
  287. Jenuwein, T. & Allis, C. D. Translating the histone code. *Science* (2001) doi:10.1126/science.1063127.
  288. Duan, H., Heckman, C. A. & Boxer, L. M. Histone Deacetylase Inhibitors Down-Regulate bcl-2 Expression and Induce Apoptosis in t(14;18) Lymphomas. *Mol. Cell. Biol.* (2005) doi:10.1128/mcb.25.5.1608-1619.2005.
  289. Li, H. & Wu, X. Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/CIP1



- expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 860–867 (2004).
290. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
  291. Nakagawa, M. *et al.* Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol. Rep.* (2007) doi:10.3892/or.18.4.769.
  292. Seo, J. *et al.* Expression of histone deacetylases HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC6 in invasive ductal carcinomas of the breast. *J. Breast Cancer* (2014) doi:10.4048/jbc.2014.17.4.323.
  293. Weichert, W. *et al.* Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br. J. Cancer* (2008) doi:10.1038/sj.bjc.6604199.
  294. Fuchs, O. Classification and function of histone deacetylase inhibitors. in *Histone Deacetylase Inhibitors (HDIs): Pharmacology, Uses and Health Effects* (2015).
  295. Eckschlager, T., Plch, J., Stiborova, M. & Hrabeta, J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. *International Journal of Molecular Sciences* (2017) doi:10.3390/ijms18071414.
  296. Cox, J. J. *et al.* Congenital insensitivity to pain: Novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations. *Hum. Mutat.* (2010) doi:10.1002/humu.21325.
  297. Stewart, W. F., Ricci, J. A., Chee, E., Morganstein, D. & Lipton, R. Lost Productive Time and Cost Due to Common Pain Conditions in the US Workforce. *J. Am. Med. Assoc.* (2003) doi:10.1001/jama.290.18.2443.
  298. Waxman, S. G. & Zamponi, G. W. Regulating excitability of peripheral afferents: Emerging ion channel targets. *Nature Neuroscience* (2014) doi:10.1038/nn.3602.
  299. Bennett, D. L., Clark, X. A. J., Huang, J., Waxman, S. G. & Dib-Hajj, S. D. The role of voltage-gated sodium channels in pain signaling. *Physiol. Rev.* (2019) doi:10.1152/physrev.00052.2017.
  300. Dib-Hajj, S. D. & Waxman, S. G. Sodium Channels in Human Pain Disorders: Genetics and Pharmacogenomics. *Annual Review of Neuroscience* (2019) doi:10.1146/annurev-neuro-070918-050144.
  301. Ashburn, T. T. & Thor, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* (2004) doi:10.1038/nrd1468.
  302. Zuliani, V., Rapalli, A., Patel, M. K. & Rivara, M. Sodium channel blockers: A patent review (2010-2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (2015) doi:10.1517/13543776.2014.995628.
  303. Alavian, K. N. *et al.* Effects of dexpropamipexole on brain mitochondrial conductances and cellular bioenergetic efficiency. *Brain Res.* **1446**, 1–11 (2012).
  304. Alavian, K. N. *et al.* The mitochondrial complex V - Associated large-conductance inner membrane current is regulated by cyclosporine and dexpropamipexole. *Mol. Pharmacol.* (2015) doi:10.1124/mol.114.095661.
  305. Cudkovicz, M. E. *et al.* Dexpropamipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): A randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Neurol.* (2013) doi:10.1016/S1474-4422(13)70221-7.
  306. Dworetzky, S. I. *et al.* The targeted eosinophil-lowering effects of dexpropamipexole in

- clinical studies. *Blood Cells, Mol. Dis.* (2017) doi:10.1016/j.bcmed.2017.01.008.
307. Panch, S. R. *et al.* Dexpramipexole as an oral steroid-sparing agent in hypereosinophilic syndromes. *Blood* (2018) doi:10.1182/blood-2018-02-835330.
  308. Stirling, L. C. *et al.* Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous Na V1.8-Cre recombinase mice. *Pain* (2005) doi:10.1016/j.pain.2004.08.015.
  309. Nassini, R. *et al.* The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrrone and pyrazolone derivatives. *Br. J. Pharmacol.* (2015) doi:10.1111/bph.13129.
  310. Han, C. *et al.* The novel activity of carbamazepine as an activation modulator extends from Na V 1.7 mutations to the Na V 1.8-S242T mutant channel from a patient with painful diabetic neuropathy. *Mol. Pharmacol.* (2018) doi:10.1124/mol.118.113076.
  311. Coppi, E. *et al.* Adenosine A3 receptor activation inhibits pronociceptive N-type Ca<sup>2+</sup> currents and cell excitability in dorsal root ganglion neurons. *Pain* (2019) doi:10.1097/j.pain.0000000000001488.
  312. Coppini, R., Ferrantini, C., Mugelli, A., Poggesi, C. & Cerbai, E. Altered Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> homeostasis in human hypertrophic cardiomyopathy: Implications for arrhythmogenesis. *Front. Physiol.* (2018) doi:10.3389/fphys.2018.01391.
  313. Pan, X. *et al.* Structure of the human voltage-gated sodium channel Na v 1.4 in complex with  $\beta$ 1. *Science* (80-. ). **362**, eaau2486 (2018).
  314. Kim, S. *et al.* PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.* (2019) doi:10.1093/nar/gky1033.
  315. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* (2006) doi:10.1016/j.jmgm.2005.12.005.
  316. Laskowski, R. A. & Swindells, M. B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* (2011) doi:10.1021/ci200227u.
  317. Tjølsen, A., Berge, O. G., Hunskaar, S., Rosland, J. H. & Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* (1992) doi:10.1016/0304-3959(92)90003-T.
  318. Austin, P. J., Wu, A. & Moalem-Taylor, G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J. Vis. Exp.* (2012) doi:10.3791/3393.
  319. Deuis, J. R. *et al.* An animal model of oxaliplatin-induced cold allodynia reveals a crucial role for Nav1.6 in peripheral pain pathways. *Pain* (2013) doi:10.1016/j.pain.2013.05.032.
  320. Cavaletti, G. *et al.* Effects of different schedules of oxaliplatin treatment on the peripheral nervous system of the rat. *Eur. J. Cancer* (2001) doi:10.1016/S0959-8049(01)00300-8.
  321. Menéndez, L., Lastra, A., Hidalgo, A. & Baamonde, A. Unilateral hot plate test: A simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *J. Neurosci. Methods* (2002) doi:10.1016/S0165-0270(01)00483-6.
  322. Cummins, T. R. *et al.* A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J. Neurosci.* (1999) doi:10.1523/jneurosci.19-24-j0001.1999.
  323. Huang, J. *et al.* Depolarized inactivation overcomes impaired activation to produce DRG neuron hyperexcitability in a Nav1.7 mutation in a patient with distal limb pain. *J. Neurosci.* (2014) doi:10.1523/JNEUROSCI.2773-14.2014.
  324. Bienert, S. *et al.* The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality.

- Nucleic Acids Res.* (2017) doi:10.1093/nar/gkw1132.
325. Browne, L. E., Blaney, F. E., Yusaf, S. P., Clare, J. J. & Wray, D. Structural determinants of drugs acting on the Nav 1.8 channel. *J. Biol. Chem.* (2009) doi:10.1074/jbc.M807569200.
  326. Whitaker, W. R. J. *et al.* Distribution of voltage-gated sodium channel  $\alpha$ -subunit and  $\beta$ -subunit mRNAs in human hippocampal formation, cortex, and cerebellum. *J. Comp. Neurol.* (2000) doi:10.1002/(SICI)1096-9861(20000619)422:1<123::AID-CNE8>3.0.CO;2-X.
  327. Catterall, W. A., Goldin, A. L. & Waxman, S. G. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews* (2005) doi:10.1124/pr.57.4.4.
  328. Cudkowicz, M. *et al.* The effects of dexpramipexole (KNS-760704) in individuals with amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* **17**, 1652–1656 (2011).
  329. McNamara, C. R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007) doi:10.1073/pnas.0705924104.
  330. Vasylyev, D. V. & Waxman, S. G. Membrane properties and electrogenesis in the distal axons of small dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* (2012) doi:10.1152/jn.00091.2012.
  331. Grisold, W., Cavaletti, G. & Windebank, A. J. Peripheral neuropathies from chemotherapeutics and targeted agents: Diagnosis, treatment, and prevention. *Neuro. Oncol.* (2012) doi:10.1093/neuonc/nos203.
  332. Mandema, J. W., Cox, E. & Alderman, J. Therapeutic benefit of eletriptan compared to sumatriptan for the acute relief of migraine pain - Results of a model-based meta-analysis that accounts for encapsulation. *Cephalalgia* (2005) doi:10.1111/j.1468-2982.2004.00939.x.
  333. Langford, D. J. *et al.* Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat. Methods* (2010) doi:10.1038/nmeth.1455.
  334. Muzzi, M. *et al.* Dexpramipexole improves bioenergetics and outcome in experimental stroke. *Br. J. Pharmacol.* (2018) doi:10.1111/bph.13790.
  335. Muzzi, M., Buonvicino, D., Urru, M., Tofani, L. & Chiarugi, A. Repurposing of dexpramipexole to treatment of neonatal hypoxic/ischemic encephalopathy. *Neurosci. Lett.* **687**, 234–240 (2018).
  336. Coppi, E. *et al.* Dexpramipexole enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in the rat. *Neuropharmacology* (2018) doi:10.1016/j.neuropharm.2018.10.003.
  337. Bozik, M. E. *et al.* A post hoc analysis of subgroup outcomes and creatinine in the phase III clinical trial (EMPOWER) of dexpramipexole in ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* (2014) doi:10.3109/21678421.2014.943672.
  338. Payne, C. E. *et al.* A novel selective and orally bioavailable Nav1.8 channel blocker, PF-01247324, attenuates nociception and sensory neuron excitability. *Br. J. Pharmacol.* (2015) doi:10.1111/bph.13092.
  339. Hong, S., Morrow, T. J., Paulson, P. E., Isom, L. L. & Wiley, J. W. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat. *J. Biol. Chem.* (2004) doi:10.1074/jbc.M404167200.

340. Mert, T. & Gunes, Y. Antinociceptive activities of lidocaine and the nav1.8 blocker a803467 in diabetic rats. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* (2012).
341. Bozik, M. E., Mather, J. L., Kramer, W. G., Gribkoff, V. K. & Ingersoll, E. W. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of KNS-760704 (dexpramipexole) in healthy adult subjects. *J. Clin. Pharmacol.* (2011) doi:10.1177/0091270010379412.
342. Wang, W., Gu, J., Li, Y. Q. & Tao, Y. X. Are voltage-gated sodium channels on the dorsal root ganglion involved in the development of neuropathic pain? *Molecular Pain* (2011) doi:10.1186/1744-8069-7-16.
343. Latremoliere, A. & Woolf, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *Journal of Pain* (2009) doi:10.1016/j.jpain.2009.06.012.
344. Bigal, M. E. *et al.* Acute migraine medications and evolution from episodic to chronic migraine: a longitudinal population-based study. *Headache* **48**, 1157–1168 (2008).
345. Bongsebandhu-Phubhakdi, S. & Srikiatkachorn, A. Pathophysiology of medication-overuse headache: Implications from animal studies. *Current Pain and Headache Reports* (2012) doi:10.1007/s11916-011-0234-y.
346. Caproni, S. *et al.* Long term headache duration is a factor predicting nonresponse to detoxification and advice in medication overuse headache. *J Headache Pain* **15**, 88 (2014).
347. De Felice, M. *et al.* Triptan-induced latent sensitization a possible basis for medication overuse headache. *Ann. Neurol.* (2010) doi:10.1002/ana.21897.
348. Perrotta, A. *et al.* Sensitisation of spinal cord pain processing in medication overuse headache involves supraspinal pain control. *Cephalalgia* (2010) doi:10.1111/j.1468-2982.2009.01914.x.
349. Levy, D., Abdian, L., Dekel-Steinkeller, M. & Defrin, R. Experimental evidence for weaker endogenous inhibition of trigeminal pain than extra-trigeminal pain in healthy individuals. *Cephalalgia* (2018) doi:10.1177/0333102417735851.
350. Gerring, Z. F., McRae, A. F., Montgomery, G. W. & Nyholt, D. R. Genome-wide DNA methylation profiling in whole blood reveals epigenetic signatures associated with migraine. *BMC Genomics* (2018) doi:10.1186/s12864-018-4450-2.
351. Terlizzi, R. *et al.* Epigenetic DNA methylation changes in episodic and chronic migraine. *Neurological Sciences* (2018) doi:10.1007/s10072-018-3348-8.
352. Kim, Y. J. *et al.* HDAC inhibitors induce transcriptional repression of high copy number genes in breast cancer through elongation blockade. *Oncogene* (2013) doi:10.1038/onc.2013.32.
353. Bertels, Z. *et al.* Neuronal complexity is attenuated in chronic migraine and restored by HDAC6 inhibition. *bioRxiv* 2020.04.21.053272 (2020) doi:10.1101/2020.04.21.053272.
354. Ververis, K. & Karagiannis, T. C. Overview of the Classical Histone Deacetylase Enzymes and Histone Deacetylase Inhibitors. *ISRN Cell Biol.* (2012) doi:10.5402/2012/130360.
355. Han, C. *et al.* Human Nav1.8: Enhanced persistent and ramp currents contribute to distinct firing properties of human DRG neurons. *J. Neurophysiol.* (2015) doi:10.1152/jn.00113.2015.
356. Descalzi, G. *et al.* Epigenetic mechanisms of chronic pain. *Trends in Neurosciences*

(2015) doi:10.1016/j.tins.2015.02.001.