



UNIVERSITA' DI PISA

FACOLTÀ DI FARMACIA

**SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN
BIOCHIMICA CLINICA**

Tesi di Specializzazione

**VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA GLIALE ALLA
SOMMINISTRAZIONE DI ANTAGONISTI DEI RECETTORI
PURINERGICI IN MODELLI DI DOLORE NEUROPATICO
NEL RATTO**

Relatore

Ch.mo Prof. Antonio Lucacchini

Candidato

Dott.ssa Valentina Petrosino

Co-relatore

Ch.mo Prof. Michele Papa

matr:436185

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

INDICE

1	INTRODUZIONE	pag. 04
1.1	Il dolore	pag. 04
1.2	Fisiopatologia del dolore	pag. 05
1.3	Il dolore neuropatico	pag. 09
1.4	Neurotrasmettitori coinvolti nella modulazione del dolore	pag.15
1.5	Glutammato e nocicezione	pag. 18
1.6	Elementi cellulari coinvolti nell'induzione e nel mantenimento del dolore neuropatico	pag. 24
1.7	Sistema purinergico	pag. 29
2	SCOPO	pag. 33
3	MATERIALI E METODI	pag. 35
3.1	Animali	pag. 35
3.2	Gruppi sperimentali	pag. 36
3.3	SNI	pag. 36
3.4	pPPN	pag. 37
3.5	Somministrazione dei farmaci	pag. 38
3.6	Test comportamentali	pag. 39
3.7	Immunoistochimica	pag. 41
3.7.1	Preparazione del tessuto	pag. 41
3.7.2	Anticorpi	pag. 41
3.7.3	Immunocitochimica del midollo spinale	pag. 42
3.8	Misure e analisi statistica	pag. 42

4	RISULTATI	pag. 44
4.1	Il comportamento neuropatico SNI-indotto è revertito dalla somministrazione i.p. dei composti dialdeidici	pag. 44
4.2	I composti dialdeidici migliorano il fenotipo comportamentale dopo pPPN	pag. 47
4.3	Modulazione purinergica dell'attivazione astrocitaria e microgliale nel midollo spinale dei ratti neuropatici	pag. 49
5	DISCUSSIONE	pag. 52
6	CONCLUSIONI	pag. 60
	BIBLIOGRAFIA	pag. 61

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA GLIALE ALLA SOMMINISTRAZIONE DI ANTAGONISTI DEI RECETTORI PURINERGICI IN MODELLI DI DOLORE NEUROPATICO NEL RATTO

1. INTRODUZIONE

1.1 Il dolore

Il dolore rappresenta un segnale d'allarme che può prevenire eventuali danni all'organismo avendo un ruolo nella sopravvivenza, ma può anche essere il risultato di una disfunzione o patologia a carico del sistema nervoso. L'Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore (IASP) definisce il dolore come "una spiacevole esperienza sensoriale ed emotiva associata ad un effettivo o potenziale danno tissutale o comunque descritta come tale". Da questa definizione, emerge quindi, che il dolore può insorgere anche in assenza di una causa effettiva di danno, assumendo quindi un'accezione legata all'esperienza soggettiva e influenzata perciò da fattori anche individuali che riguardano la sfera affettiva con il coinvolgimento di strutture limbiche e corticali. Risulta chiaro quindi che il dolore non rappresenta solo un fenomeno legato alla percezione sensoriale, ma un'esperienza di tipo cosciente e che coinvolge l'attivazione di

componenti psichiche e corticali. Esistono due forme di dolore: il dolore fisiologico (acuto) e il dolore patologico (cronico). Il primo non rappresenta una patologia vera e propria, ma soltanto un sintomo che allerta l'organismo sulla presenza di stimoli nocivi (es. una ferita, un'ustione, una degenerazione d'organo) rappresentando un sistema di protezione. Il dolore patologico, al contrario, non rappresenta più un sistema di protezione volto alla sopravvivenza dell'organismo, ma una vera e propria patologia, che deriva da un alterato funzionamento del sistema nervoso. L'alterazione può essere dovuta ad un danno diretto del sistema nervoso (*dolore neuropatico*) o da situazioni che non presentano alcun danno ma che sono caratterizzate esclusivamente da un'alterata funzionalità (*dolore disfunzionale*).

1.2 Fisiopatologia del dolore

La trasmissione del dolore inizia con l'attivazione di recettori specializzati nell'integrazione di stimoli di diversa natura chiamati *nocicettori*, che genera impulsi nervosi la cui conduzione avviene attraverso tre gruppi principali di fibre, denominate A, B e C. Tali fibre sono distinte in base alla funzione, somatica o viscerale, al grado di mielinizzazione, al calibro e alla velocità di conduzione. Le fibre A sono ulteriormente distinte in quattro sottogruppi in base al diametro e

alla velocità di conduzione in α , β , γ e δ . Le fibre che svolgono un ruolo primario nella conduzione del dolore sono le fibre $A\delta$ e le fibre C. Le prime, distribuite più superficialmente a livello cutaneo, sono coinvolte prevalentemente nella conduzione del dolore acuto (fisiologico), ma anche in alcune forme di iperreattività meccanica legate alla stimolazione pressoria (allodinia) e in alcune forme di dolore patologico (neuropatico). Le fibre C hanno una distribuzione periferica sia superficiale che profonda e integrano stimoli nocicettivi con localizzazione diffusa ma con caratteristiche di un dolore poco localizzato. Le fibre deputate alla propagazione dell'impulso nocicettivo terminano nelle corna dorsali del midollo spinale, diviso in dieci lamine in base alla citologia e funzione dei neuroni in esso presenti. I neuroni deputati alla nocicezione risiedono nelle lamine superficiali (I-III) che costituiscono l'area recettrice primaria e ricevono stimoli dalle fibre $A\delta$ e C. In particolare, i neuroni della lamina I rispondono alla stimolazione nocicettiva, proiettando ai centri superiori del cervello; quelli della lamina II sono quasi esclusivamente interneuroni, sia eccitatori che inibitori. Quest'area trasmette i messaggi ai centri encefalici grazie a immediate proiezioni ascendenti. La percezione del dolore, quindi, non si limita ad una semplice afferenza ma anche ad un controllo a livello del midollo, per questo

motivo è necessario un'organizzazione coinvolta nella modulazione delle afferenze affinché queste non siano obbligatoriamente e in maniera immodificabile dirette verso l'alto ma possano essere modulate già a livello spinale. A questo livello in effetti si ha un'analisi degli *input* sensitivi, determinando quali tipi di impulsi in arrivo possano produrre sensazioni che dal cervello saranno interpretate come dolorifiche (Fig.1)

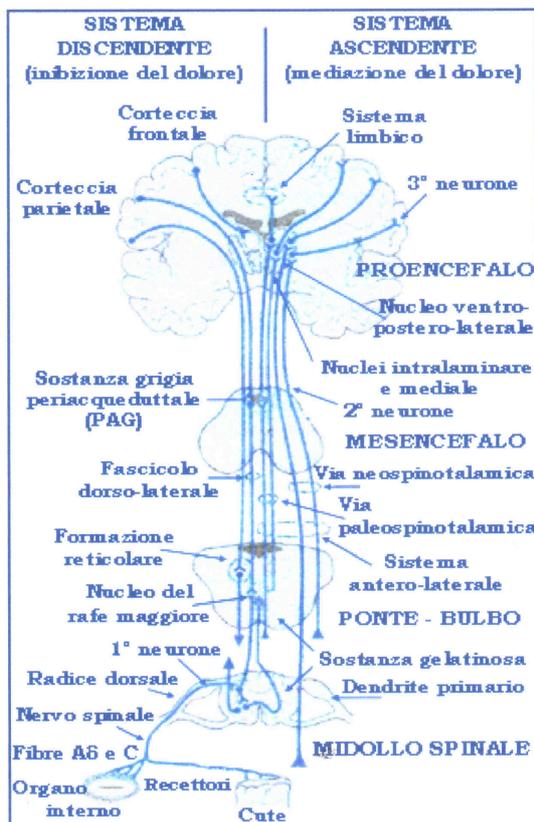


Fig. 1 Sistemi neuronali che garantiscono la trasmissione del dolore.

La trasmissione sinaptica tra fibre afferenti e neuroni dorsali è mediata da diversi neurotrasmettitori contenuti nelle vescicole sinaptiche, e di cui il principale, rilasciato dalle fibre A δ e C, è il glutammato. Questo amminoacido agisce su specifici recettori presenti sui neuroni post-sinaptici (AMPA, NMDA), situati nelle vicinanze dei terminali sinaptici, ed è in grado di evocare potenziali eccitatori nei neuroni delle corna dorsali del midollo spinale. Le vescicole sinaptiche dei terminali nervosi contengono anche altri tipi di neurotrasmettitori, chiamati neuropeptidi (Basbaum, 1995) e tra cui il più conosciuto è la sostanza P. I neuropeptidi possono agire anche in siti distanti, a differenza del glutammato, in quanto non esistono specifici sistemi di ricaptazione. La stimolazione nocicettiva può indurre modificazioni a lungo termine nei neuroni delle corna dorsali. Le alterazioni delle proprietà biochimiche e dell'eccitabilità dei neuroni dorsali, che divengono iper-responsivi, possono portare all'insorgenza del dolore patologico (neuropatico) e potrebbero contribuire all'abbassamento della soglia di percezione del dolore, fenomeno che prende il nome di *sensitizzazione* centrale. In condizioni patologiche, l'aumentata frequenza degli stimoli attiva neuroni che in precedenza risultavano non responsivi agli stessi impulsi. Questa variazione funzionale è dovuta al rilascio di vari agenti chimici (bradichinine, prostaglandine,

serotonina, ecc.) da parte delle cellule e delle fibre nervose che subiscono una lesione.

1.3 Il dolore neuropatico

Il dolore neuropatico è una malattia devastante che può seriamente affliggere la qualità della vita, tanto che viene sicuramente riconosciuto come una delle condizioni dolorose più difficili da trattare. E' definito come una "diretta conseguenza di una lesione o patologia del sistema somatosensoriale" (Treede et al., 2008). Infatti, è frequentemente associato ad un danno, spesso irreversibile, del sistema deputato alla percezione del dolore (Siniscalco et al., 2005), sia a livello centrale (cervello e midollo spinale), che periferico (radici nervose, plessi e nervi). Studi recenti hanno dimostrato una cascata di modificazioni biologiche temporalmente correlate, successive al danno del sistema nervoso, che alla fine sfociano in una sensibilizzazione degli elementi nervosi coinvolti nell'elaborazione dell'informazione dolorosa che risulta del tutto alterata con una trasmissione amplificata dei messaggi nocicettivi (Bonica, 1979; Millan, 1999). Diversi studi morfo-funzionali hanno fatto luce sui meccanismi del dolore neuropatico, suggerendo che la sensitizzazione periferica dei terminali nervosi da parte di mediatori pro-infiammatori

(ATP, glutammato, citochine pro-infiammatorie, nitrossido), induce una distruzione dell'omeostasi neuro-gliale che risulta in uno stato di ipereccitabilità neuronale prolungato nel corno dorsale del midollo spinale che contribuisce alle alterazioni sensoriali e comportamentali tipiche di questa condizione patologica (Cirillo et al., 2011; Meisner et al., 2010). Come conseguenza, stimoli nocivi vengono percepiti come maggiormente dolorosi (iperalgisia), a causa del rilascio di peptidi algogeni vasoattivi attraverso sia meccanismi di sensibilizzazione periferica che modificazioni nel sistema nervoso centrale (SNC). Nelle sindromi neuropatiche, infatti, le fibre afferenti primarie che subiscono una lesione, e i nocicettori ad esse associate, divengono estremamente sensibili alla stimolazione meccanica e termica (Field HL and Martin JB, 1995; Portenoy R., 1990), generando impulsi anche in assenza di stimolazione. La spiegazione di questo fenomeno risiede nelle modifiche nei circuiti neuronali che si instaurano a seguito della lesione e che sono tali da consentire l'automantenimento del sintomo doloroso (cronicizzazione spinale). I processi somatosensoriali che sostengono il dolore neuropatico possono essere distinti in due grandi categorie:

- 1) *la genesi ectopica di impulsi nocicettivi*: questo fenomeno è attribuito ai potenziali d'azione che si generano direttamente nelle

fibre nervose senza che avvenga l'attivazione fisiologica della terminazione nervosa corrispondente. In condizioni di normalità le fibre del neurone nocicettivo periferico sono eccitabili ectopicamente se sottoposte a stimoli di elevata intensità. In caso di lesioni nervose periferiche, le fibre sensitive, sia lesionate che indenni, abbassano la loro soglia di eccitabilità ectopica per gli stimoli che normalmente sono in grado di eccitarle (Wall and Gutnick., 1974) ed acquisiscono una nuova sensibilità per stimoli a cui non erano precedentemente sensibili. Quando l'ipereccitabilità ectopica dei neuroni nocicettivi periferici raggiunge i suoi livelli più elevati, le fibre nervose periferiche possono attivarsi anche in assenza di stimoli, configurando un quadro di attivazione spontanea continua o sub continua (Michaelis et al., 1995) (Fig. 2).

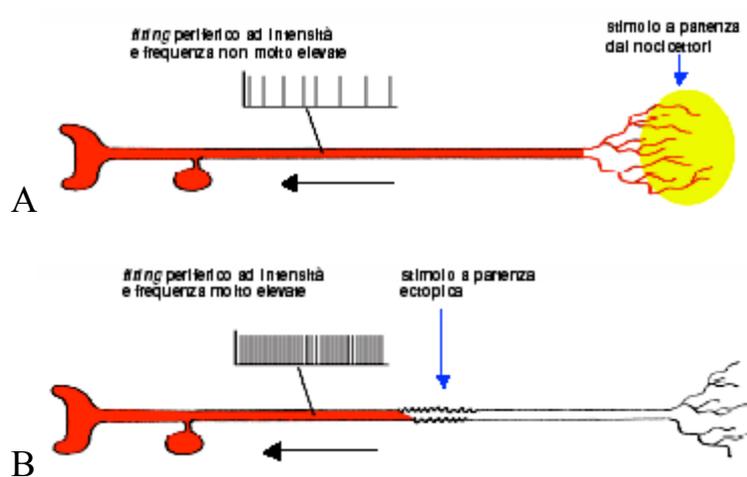


Fig. 2 A, modello di dolore nocicettivo; B, modello di dolore neuropatico.

2) *l'ipersensibilità di neuroni nocicettivi centrali*: a livello delle corna dorsali del midollo spinale, ma anche a livello del talamo e della corteccia sensoriale, sono stati identificati due tipi di neuroni nocicettivi. In condizioni di normalità questi neuroni possiedono comportamenti differenti e ben identificati (Woolf and Fitzgerald., 1983; Christenson and Perl., 1970). Il primo, definito *nocicettore specifico*, è connesso perifericamente solo con fibre nocicettive e risponde solo a stimoli di elevata intensità (stimoli nocivi). Il secondo, definito *neurone ad ampio spettro dinamico*, risponde a stimoli di bassa intensità con basse frequenze di scarica, e a stimoli di elevata intensità con alte frequenze di scarica. In seguito a danni periferici algogeni, nervosi e non, i neuroni ad ampio spettro dinamico possono subire un'alterazione nella loro funzionalità ed iniziare a scaricare a frequenze elevate (marcatamente nocicettive) anche in seguito a stimoli normalmente non nocivi. In tali condizioni questi neuroni sono inoltre capaci di espandere il loro campo recettoriale originario (Woolf and Mannion., 1999). Inoltre alla stessa maniera dei neuroni nocicettivi periferici, anche per i neuroni nocicettivi centrali è possibile che l'ipereccitabilità ectopica si trasformi, nei casi più gravi, in un'attivazione spontanea e tendenzialmente continua, indipendentemente dallo stimolo. Quindi, il dolore neuropatico

rappresenta una reale disfunzione del sistema nervoso caratterizzata da cambiamenti neurofisiologici che sono ancora scarsamente conosciuti. Studi recenti hanno posto l'attenzione sul ruolo della microglia e degli astrociti nella plasticità spinale e nell'insorgenza del dolore neuropatico (Clark et al., 2007, 2009; Luongo et al., 2008, 2010), spesso accompagnato da cambiamenti "reattivi" nel sistema nervoso centrale, sia nelle cellule della microglia che negli astrociti, una condizione ora chiamata "gliopatia" (Cirillo et al., 2012; Colangelo et al., 2012; Gwak and Hulsebosch, 2010; Hulsebosch, 2008; Lobsiger and Cleveland, 2007; Pekny and Nilsson, 2005). Diversi modelli animali sono stati proposti per studiare i meccanismi collegati al dolore neuropatico: evidenze sperimentali indicano l'attivazione del sistema purinergico come meccanismo di modulazione della percezione dolorosa, suggerendo che le interazioni purinergiche neuro-gliali sono importanti modulatori della neurotrasmissione sensoriale (Inoue and Tsuda, 2011). In particolare, è stato dimostrato che l'ATP funziona da mediatore pro-infiammatorio (Khakh and North, 2006; Gourine et al., 2007) ed è rilasciato in grande quantità dopo il danno tissutale. Sia la microglia (Honda et al., 2001; Farber and Kettenmann, 2006; Inoue, 2008) che gli astrociti (Abbraccio and Ceruti, 2006) esprimono differenti tipi di recettori P2Y e P2X sotto

varie condizioni, suggerendo che il segnale mediato dai recettori P2 contribuisce in maniera critica allo sviluppo e al mantenimento del dolore neuropatico. Quindi, antagonisti dei recettori P2X, potrebbero potenzialmente ridurre il danno secondario sia inibendo direttamente il danno neuronale eccitatorio, sia riducendo le risposte infiammatorie locali e sistemiche (Wang et al., 2004; Peng et al., 2009). Tra i recettori purinergici ATP-sensibili, il P2X7 gioca un ruolo importante nella trasduzione sensoriale periferica della percezione dolorosa (Zhang et al., 2005). E' stato dimostrato che l'ATP ossidato (OxATP), un'antagonista non selettivo dei recettori P2X7 ha **i**) effetti analgesici in un modello acuto (Dell'Antonio et al., 2002) e persistente (Honore et al., 2006) di dolore neuropatico **ii**) è in grado di attenuare la reazione gliale (Monif et al., 2009), riducendo così la cascata del segnale proinfiammatorio (Beigi et al., 2003). Tenendo presente queste osservazioni, abbiamo sperimentato gli effetti terapeutici dei composti dialdeidici in modelli di dolore neuropatico, osservando così che questi composti sono in grado di indurre il recupero del comportamento neuropatico e ridurre l'attivazione gliale.

1.4 Neurotrasmettitori coinvolti nella modulazione del dolore

Numerosi sono i neurotrasmettitori che in presenza di stimoli meccanici o termici, possono causare dolore agendo sia a livello delle terminazioni nocicettive periferiche sia a livello del SNC (Tab.1).

MEDIATORI DEL DOLORE	
Ioni H ⁺ e K ⁺	Serotonina e noradrenalina
Chinine	Sostanza P
Acido lattico	Tachinine e bradichinine
Prostaglandine	Endorfine- encefaline
Adenosina	Prostaglandine
Sostanza P	Endocannabinoidi
Acetilcolina	Gaba
Endocannabinoidi	Glicina
Istamina	

Tabella 1. Mediatori della nocicezione che agiscono a livello del sistema nervoso centrale e periferico.

Sulla membrana cellulare dei neuroni esistono vari recettori che mediano l'azione di un neurotrasmettitore di particolare interesse, la **serotonina** (5-HT), che si forma a partire dall'aminoacido L-triptofano. Nei mammiferi, la serotonina si trova nelle cellule enterocromaffini del tratto gastro intestinale, nelle piastrine e nei nuclei del rafe del tronco encefalico, che contengono i corpi cellulari

dei neuroni che sintetizzano, immagazzinano e liberano la serotonina come trasmettitore. I neuroni serotoninergici cerebrali sono coinvolti nel controllo di varie funzioni come il tono dell'umore, il sonno, la fame, la regolazione della pressione arteriosa e della temperatura e, quindi, la percezione del dolore. Le proiezioni serotoninergiche discendono lungo il cordone dorso-laterale del midollo spinale e terminano nelle corna dorsali del midollo contribuendo in senso inibitorio, alla modulazione del dolore (Kishimoto et al., 2000). Un altro importante neurotrasmettitore è l'**istamina** che si forma a partire dall'amminoacido L-istidina ed è presente in molti tessuti ma soprattutto nei mastociti e nei basofili. I corpi cellulari dei neuroni istaminergici sono nel nucleo tuberomamillare e in altre aree. L'istamina agisce sul controllo della neurosecrezione endocrina, sulla funzione cardiovascolare, sulla termoregolazione e sul sonno, ma soprattutto è un potente stimolante delle terminazioni nervose sensitive mediando, a livello periferico, dolore e prurito. E' stata nell'evento doloroso, anche l'influenza delle **prostaglandine**, sintetizzate a partire dall'acido arachidonico. Infatti, sebbene di per sé non causino dolore, aumentano notevolmente l'effetto dolorifico, sensibilizzando le terminazione nervose verso altri agenti come la serotonina o la bradichinina. Nella nocicezione sono coinvolti anche

altri mediatori, le **tachichinine** di cui le più importanti sono la sostanza P (SP), la neurochinina A (NKA o sostanza K), la neurochinina B (NKB) e il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP). Esistono tre sottotipi di recettori per le tachichinine: NK₁ specifico per la SP, NK₂, su cui agisce la NKA e NK₃ per NKB (Murase et al., 1989a e 1989b). La sostanza P e la NKA, che derivano dallo stesso gene, presentano una distribuzione molto simile nel sistema nervoso centrale, dove sono maggiormente espresse a livello delle corna dorsali del midollo, e nel sistema nervoso periferico. In seguito all'attivazione dei nocicettori, la SP viene rilasciata sia in periferia, contribuendo all'infiammazione neurogenica, che a livello delle corna dorsali contribuendo al fenomeno dell'eccitazione. I potenziali sinaptici indotti, di per sé, sono insufficienti a depolarizzare il neurone postsinaptico, ma durante l'attività ripetitiva, possono causare una serie di potenziali d'azione ad alta frequenza. Tra i peptidi **oppioidi**, i mediatori più noti coinvolti nella nocicezione, sono la beta-endorfina, le encefaline, le endomorfine e la dimorfina. Gli oppioidi hanno effetti analgesici, il che suggerisce un'azione nel midollo spinale. Inoltre, è stato dimostrato che gli oppiacei inibiscono la scarica delle terminazioni afferenti nocicettive in periferia nelle condizioni infiammatorie, dove i recettori sono espressi

maggiormente. L'**acido γ -amminobutirrico** (GABA) è presente ad elevate concentrazioni nel sistema nervoso centrale. Studi elettrofisiologici e biochimici dimostrano l'esistenza di tre differenti siti di legame al GABA convenzionalmente denominati: GABA_A, GABA_B e GABA_C che differiscono fra loro per struttura, meccanismo di traduzione del segnale, funzione e profilo farmacologico. Il GABA è un inibitore dell'eccitabilità neuronale e del *release* dei neurotrasmettitori a livello spinale e sovrastipale e agisce attraverso un aumento della permeabilità della membrana agli ioni cloro, realizzando così, i potenziali postsinaptici inibitori (IPSP). I recettori GABA_A e i recettori GABA_C sono recettori ionotropici accoppiati ad un canale per il cloro con la differenza che i recettori GABA_A sono bloccati dalla picrotossina e dalla bicucullina, mentre i recettori GABA_C sono insensibili sia alla bicucullina che al baclofen. I recettori GABA_B, sono accoppiati a proteine G che inibiscono i canali del calcio e/o attivano i canali del potassio.

1.5 Glutammato e nocicezione

Il glutammato (Glu) funge da neurotrasmettitore eccitatorio, ma ha anche un ruolo metabolico, essendo coinvolto nel metabolismo dei

carboidrati e dell'azoto. Il glutammato deriva dall' α -ossiglutarato, un intermedio del ciclo di Krebs e dalla glutammina, sintetizzata dalle cellule gliali. Dopo la conversione della glutammina, il glutammato viene raccolto nei neuroni in vescicole sinaptiche grazie a specifiche proteine di trasporto per poi essere liberato attraverso un processo esocitotico calcio-dipendente. Infine, la sua azione termina principalmente in seguito alla captazione mediata dai trasportatori presenti nelle terminazioni nervose e nelle cellule gliali situate in prossimità del sito di liberazione. Il trasporto responsabile della ricaptazione del neurotrasmettitore a livello sinaptico può in condizioni patologiche, come nel dolore neuropatico, operare in maniera opposta e costituire una fonte di rilascio del glutammato (Takahashi et al., 1997). La sua identificazione come neurotrasmettitore eccitatorio del SNC ha dato inizio a numerosi studi che hanno messo in evidenza l'esistenza di un complesso patrimonio recettoriale. Si riconoscono due grandi famiglie di recettori: i recettori ionotropici (iGluRs) e i recettori metabotropici (mGluRs). I primi sono associati a canali ionici, hanno una struttura pentamerica e sono attivati da ligandi che prendono il nome dei loro agonisti specifici e vengono classificati in recettori NMDA (N-metil-D-aspartato) e non NMDA. I recettori NMDA, contribuiscono alla componente del

potenziale sinaptico eccitatorio e la loro attività è regolata da modulatori che agiscono su siti distinti dai siti di legame del glutammato. Il sito di legame della glicina è distinto da quello del glutammato, ed entrambi devono essere occupati perché il canale si apra; la glicina funziona così, più che da modulatore allosterico positivo, da vero e proprio coagonista. I recettori NMDA sono altamente permeabili al Ca^{2+} (MacDermott et al., 1986) e vengono facilmente bloccati dagli ioni Mg^{2+} , blocco voltaggio-dipendente perché il Mg^{2+} si lega al canale quando la cellula è polarizzata, impedendone la sua normale attività (Mayer et al., 1984). L'attività del canale dei recettori NMDA è modulata dalle protein kinasi C (PKC) e da fosfatasi (Chen and Huang, 1992; Kelso et al., 1992; Durand et al., 1993). E' stato dimostrato che la PKC potenzia la risposta da NMDA incrementando la probabilità di apertura dei canali e riducendo il blocco da parte del Mg^{2+} . I recettori non NMDA si dividono in AMPA e KA. I recettori del kainato sono costituiti da differenti subunità, denominate GluR_5 , GluR_6 , GluR_7 . Questa eterogeneità dei recettori del kainato, si riflette, tra l'altro, nella loro distribuzione sia a livello cerebrale che delle sinapsi stesse. I recettori del kainato giocano un ruolo importante nella modulazione e nella trasduzione della trasmissione sinaptica (Lerma, 1997); infatti la

somministrazione di kainato nell'animale da esperimento determina danni neuronali e crisi epilettiche (Ben-Ari, 1985; Nadler, 1981), un effetto presumibilmente determinato da un'inibizione del *release* di GABA (Rodriguez-Moreno et al., 1997; Clarke et al., 1997). Tale azione potrebbe essere alla base del coinvolgimento dei recettori del kainato in condizioni fisiopatologiche come i deficit cognitivi (Reid and Bliss, 2000) e il dolore (Agrawal and Evans, 1986; Huettner, 1990). AMPA è un recettore canale formato dalla subunità GluR₁-GluR₄ (Seeburg, 1993). Il recettore AMPA è associato ad un canale ionico per il sodio con rapida cinetica di attivazione ed inattivazione. Una tale cinetica rende i recettori AMPA ideali per mediare la neurotrasmissione eccitatoria rapida del SNC e questo generalmente è assicurato da una permeabilità del Ca²⁺ molto bassa. La relazione tra il voltaggio e la permeabilità cationica è determinata da quali subunità compongono il recettore. Il glutammato può attivare, inoltre, recettori metabotropici accoppiati a proteine G. Sono stati clonati otto geni codificanti i diversi sottotipi recettoriali per gli mGlu (mGlu₁₋₈), dei quali alcuni generano mRNA diversi mediante *splicing* alternativo (Nakanishi, 1992; Pin et al., 1993; Schoepp and Conn, 1993). I recettori mGlu, così come i recettori iGlu, sembrano essere coinvolti in molte funzioni del sistema nervoso, tra cui fenomeni di plasticità

sinaptica, che si ritiene siano alla base dell'apprendimento e della memoria e nella neurotossicità indotta dal glutammato. Il glutammato, infatti, è coinvolto nella modulazione del dolore sia a livello centrale che a livello periferico. In particolare, nell'area sovraspinale rappresentata dal sistema antinocicettivo endogeno (S.A.E), nel PAG e rafe dorsale, l'attivazione dei recettori NMDA e non NMDA sembra essere responsabile dell'analgesia non oppioide. Inoltre, a livello spinale, l'attivazione di recettori ionotropici è importante nella trasmissione dell'impulso algogeno dalla periferia verso i centri encefalici. I danni creati ai tessuti periferici, che determinano stati di dolore di tipo cronico, infiammatorio o persistente, inviano input attraverso fibre A δ e fibre C che producono un progressivo incremento della risposta dei neuroni delle corna dorsali del midollo spinale. Questa duttilità del midollo spinale di elaborare le informazioni nocicettive gioca un ruolo critico nell'ipersensibilità al dolore post-danno e nelle sindromi da dolore cronico. La farmacologia della sensibilizzazione centrale e della trasduzione spinale del dolore è stata ampiamente studiata (Dickenson and Aydar, 1991; Dray et al., 1994; Urban and Smith, 1994; Woolf, 1996) ed è ben documentato che il glutammato gioca un ruolo importante. Difatti, le fibre primarie afferenti A δ e C rilasciano glutammato nella sostanza gelatinosa del

midollo spinale in seguito a stimoli nocivi, il quale si lega ai recettori iGlu e mGlu che sono localizzati a livello pre e postsinaptico. L'arrivo di un potenziale d'azione libera glutammato che, legandosi ai recettori AMPA, provoca una breve depolarizzazione nei neuroni delle corna dorsali del midollo spinale e l'attivazione della via centrale del dolore. La depolarizzazione mediata dagli AMPA, se protratta, determina la rimozione del blocco ad opera del Mg^{2+} sul canale dei recettori di tipo NMDA. L'attivazione dei recettori NMDA produce una depolarizzazione a lento sviluppo e di maggiore durata che permette l'ingresso del Ca^{2+} all'interno della cellula. Questo evento post-trasduzionale modifica le proprietà fisiologiche delle sinapsi. Durante questa fase si libera anche la sostanza P che legandosi ai propri recettori postsinaptici, facilita il *release* di Ca^{2+} dai depositi cellulari che, a sua volta, diminuendo la permeabilità al K^+ , depolarizza ulteriormente la cellula. La sostanza P si lega anche ai recettori presinaptici producendo ulteriore liberazione di glutammato dalle fibre afferenti. Tutti questi eventi che vedono un importante coinvolgimento dei recettori ionotropici del glutammato prendono parte al fenomeno dell'ipersensibilizzazione (Mendell, 1966) che sembra essere alla base dell'iperalgia secondaria e dell'allodinia di natura centrale. La sensibilizzazione centrale può essere consolidata

da PKC che media la fosforilazione dei recettori NMDA e riduce il blocco del Mg^{2+} , caratteristico del canale di questi recettori; infatti, l'inibizione della PKC previene lo sviluppo dell'iperalgia in uno studio condotto sui ratti (Yashpal et al., 1995). Dato il coinvolgimento dei recettori NMDA e AMPA sono stati sviluppati antagonisti con azione antinocicettiva in diversi modelli animali di dolore persistente, infiammatorio e neuropatico.

1.6 Elementi cellulari coinvolti nell'induzione e nel mantenimento del dolore neuropatico

Anche se per molto tempo i neuroni sono stati al centro dell'attenzione come mediatori delle funzioni del SNC, un numero sempre maggiore di evidenze, indica che le cellule gliali svolgono un ruolo importante nel supporto strutturale e metabolico (Hamilton and Attwell, 2010); nella funzione sinaptica e nella plasticità, partecipando al *reuptake* e al rilascio dei trasmettitori aminoacidici (Henneberger et al., 2010) e nel processamento dell'informazione (Hamby and Sofroniew, 2010). La glia rappresenta circa il 70% del totale della popolazione cellulare nel sistema nervoso centrale. Le cellule gliali sono composte da astrociti ed oligodendrociti, di origine

neuroectodermica, e dalle cellule microgliali, di origine mesodermica. Gli astrociti, che sono la base della barriera emato-encefalica, sono le cellule responsabili del mantenimento di una corretta omeostasi ionica e sono capaci di produrre fattori di crescita neuronali e di provvedere alla loro crescita e sopravvivenza; hanno inoltre un ruolo fondamentale nella sinaptogenesi (Pfrieger and Barres, 1997). Gli astrociti sono cellule caratterizzate da elaborate ramificazioni a simmetria radiale che conferiscono loro una forma stellata. Possono essere di tre tipi: fibrosi, localizzati soprattutto nella sostanza bianca e caratterizzati da processi lunghi e sottili; protoplasmatici, localizzati prevalentemente nella sostanza grigia e dotati di processi brevi e ramificati; e radiali, disposti perpendicolarmente all'asse dei ventricoli. In particolare, gli astrociti, forniscono un sostegno strutturale e funzionale ai neuroni e avvolgono i contatti sinaptici. L'astroglia, essendo l'elemento cellulare principale dell'omeostasi del cervello, è intimamente coinvolta in molte patologie del SNC. Gli oligodendrociti sono gli omologhi delle cellule di Schwann del sistema nervoso periferico e sono quindi deputate alla deposizione della mielina. La microglia, invece, rappresenta la popolazione immunitaria del sistema nervoso centrale ed è associata ad eventi di tipo tossico ed infiammatorio, è quindi coinvolta nella progressione di

un danno a carico del sistema nervoso centrale. Alcune evidenze sperimentali mostrano che la microglia possiede anche una notevole plasticità funzionale che la rende attiva anche in meccanismi di tipo protettivo. Le cellule microgliali derivano da precursori mesenchimali che verso la fine dello sviluppo embrionale e durante i primi stadi post-natali migrano nel cervello. Esse sono elementi di piccole dimensioni con nuclei densi; posseggono pochi prolungamenti, piuttosto brevi, ricoperti di numerose spine. Tali cellule sono poco numerose in condizioni normali, ma aumentano considerevolmente di numero nelle sedi di lesioni, emorragie, tumori e altre condizioni patologiche di danno del tessuto nervoso. Durante questi processi rispondono migrando nel sito in cui si è verificato il trauma cominciando a proliferare, e fagocitano particelle costituite da cellule in apoptosi partecipando al riassorbimento e al rimodellamento del SNC durante lo sviluppo. La migrazione e la proliferazione microgliale richiedono un cambiamento morfologico, per cui queste cellule assumono una forma ameboide che facilmente permette di distinguerle da cellule non stimulate (Fig. 3).

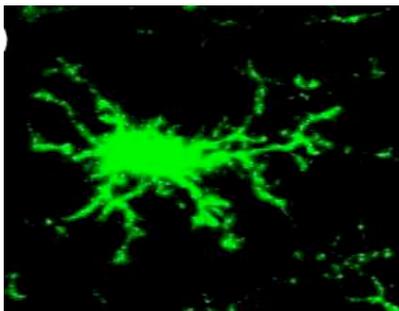


Fig.3 Microglia attivata

L'attivazione microgliale nel midollo spinale rende queste cellule ipertrofiche ed iperplasiche, con processi sottili e retratti, con un aumento del numero cellulare in seguito al danno (Smith, 2010). Una volta terminato il processo di migrazione, queste cellule passano da uno stato ameboide e di attiva fagocitosi ad uno stato di “riposo” assumendo una caratteristica forma piatta e ramificata (Fig. 4).

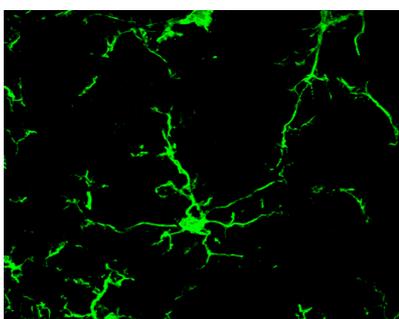


Fig. 4 Microglia in fase di resting

La microglia attivata nel sito dell'inflammatione comincia a regolare positivamente l'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e acquisisce tutte le capacità di una cellula macrofagica. Come tutte le cellule del sistema monocitico-macrofagico, anche la microglia è in grado di rilasciare le citochine tipiche dei processi infiammatori che hanno tra gli altri, il compito di amplificare la risposta, di “richiamare” altre cellule nel sito

dell'infiammazione e di modularne l'attivazione. Anche in questo caso come nella risposta infiammatoria in generale, alcuni dei fattori prodotti sono potenzialmente neurotossici, come, ad esempio, il tumor necrosis factor (TNF) o i prodotti reattivi dell'ossigeno e dell'azoto, che possono contribuire al danno del sistema nervoso. E' proprio quest'ultimo aspetto che ha richiamato l'attenzione sulla microglia in numerose ricerche sulle malattie che colpiscono il sistema nervoso centrale. Infatti, il ruolo delle cellule della microglia nel dolore neuropatico è sempre più spesso confermato in differenti modelli di neuropatia periferica come lo *spared nerve injury* (Beggs and Salter, 2007), dove la microglia svolge una funzione principale nei fenomeni di plasticità sinaptica che avvengono a livello del midollo spinale (Clark et al., 2007). In modelli di dolore neuropatico, è stato riportato che l'attivazione delle cellule gliali rappresenta un processo sempre presente, indipendentemente dal modello utilizzato per la sua induzione, e si associa ad un aumento dell'espressione delle proteine indici della microglia reattiva (Iba1) e delle proteine del citoscheletro astrocitario (GFAP). Queste modificazioni fenotipiche producono nel midollo spinale una plasticità morfologica e funzionale, responsabile dell'iperalgisia e dell'allodinia associate al dolore neuropatico. La modulazione e l'integrazione degli stimoli a livello delle lamine

superficiali del corno dorsale del midollo spinale, avviene attraverso reti complesse, che coinvolgono sia il sistema glutammatergico che quello GABAergico. Diversi meccanismi molecolari sono stati descritti come responsabili delle modificazioni fenotipiche e della plasticità neuronale associata al dolore neuropatico.

1.7 Sistema purinergico

Tra i vari sistemi neurotrasmettitoriali che regolano i cambiamenti fenotipici gliali il sistema purinergico è quello più studiato. Le cellule gliali del sistema nervoso centrale rilasciano nucleotidi sia in condizioni fisiologiche che patologiche, suggerendo che queste molecole svolgono un ruolo chiave nelle normali funzioni cerebrali, ma anche nella riparazione dopo il danno (Burnstock et al., 2008). Il concetto di ***signaling*** purinergico è stato proposto per la prima volta nel 1972 da Burnstock. Questo sistema di comunicazione, che utilizza le purine e le pirimidine come messaggeri extracellulari, si trova in ogni tipo di cellula e tessuto e durante ogni fase di sviluppo (Verkhatsky, 2010), e risulta essere il principale sistema di segnalazione extracellulare che integra i circuiti neuro-gliali nel sistema nervoso. Le purine e le pirimidine sono coinvolte in molteplici pathways del segnale attraverso sincizi gliali, essendo responsabili

della propagazione delle onde del Ca^{2+} e della comunicazione astro-oligodendrogliale. Tra le purine, l'ATP è stato implicato nel dolore neuropatico sia acuto che cronico e in quello di tipo infiammatorio (Khakh and North, 2006). Il ruolo dell'ATP extracellulare e dei purinocettori nella regolazione delle citochine e dei disordini neurologici, è attualmente un punto centrale di un'area sempre più crescente di ricerca. In condizioni di danno tissutale, l'ATP è rilasciato massivamente nel parenchima cerebrale dalle cellule danneggiate o morte, tra cui neuroni, cellule gliali e cellule endoteliali. Tale rilascio produce un aumento della concentrazione di ATP nello spazio extracellulare, evento in grado di stimolare le cellule della microglia a rilasciare citochine pro-infiammatorie, che esercitano effetti tossici sui neuroni. Gli effetti dell'ATP sulla microglia sono il risultato dell'attivazione dei recettori purinergici di tipo P2. Questi recettori sono presenti sia a livello centrale che periferico e sono espressi sia dai neuroni che dalle cellule gliali anche se in misura diversa. Si individuano due principali famiglie di recettori P2: P2Y, recettori metabotropici a sette domini transmembrana accoppiati a proteine G, e P2X, recettori-canale non selettivi costituiti da due domini transmembrana, che permettono l'entrata di Na^+ e Ca^{2+} e la fuoriuscita di K^+ determinando, attraverso la loro attivazione, la

depolarizzazione cellulare (Abbracchio et al., 2009). Diversi tipi di recettori P2X e P2Y sono espressi sia dagli astrociti che dalla microglia, (Abbracchio et al., 2006) e vengono attivati in maniera differenziale dai nucleotidi a seconda delle specifiche condizioni fisiopatologiche. Modelli sperimentali indicano l'attivazione dei recettori purinergici P2X per l'ATP, nei circuiti del dolore e nei processi sensoriali, incluso P2X7, membro più importante della famiglia dei recettori ionotropici. Esso può essere espresso nella microglia e nei macrofagi periferici, dove un recente studio, ha dimostrato essere necessario per l'attivazione e la proliferazione della microglia, regolandone la risposta immunitaria e quella infiammatoria. La somministrazione periferica e spinale di ATP o di altri agonisti dei recettori P2X è in grado di produrre effetti nocicettivi e di aumentare la sensibilità agli stimoli nocivi in modelli animali (Khakh and North, 2006). Il rilascio di ATP e il *signaling* P2X mediato facilita anche l'aumento della neurotrasmissione glutammatergica a livello delle terminazioni centrali dei neuroni primari sensitivi (Gu and MacDermott, 1997; Nakatsuka et al., 2003) attraverso i recettori P2X2, P2X4, P2X6 e P2X7 (Sommer, 2003; Watkins and Mayer, 2002). Quest'ultimo è particolarmente importante nel contesto del danno al midollo spinale, perché è abbondantemente espresso dai

neuroni del midollo che richiedono elevate concentrazioni di ATP per la sua attivazione (El-Moatassim and Dubyak, 1993). Anche l'espressione dei recettori P2X4, presenti sulla microglia, aumenta nel midollo spinale dopo il danno nervoso periferico (Tsuda et al., 2003) e si ritiene possa contribuire allo sviluppo dell'allodinia tattile. Infatti, l'aumento dell'espressione dei P2X4R nella microglia sembra essere un processo importante nello sviluppo del dolore neuropatico (Tsuda et al., 2003). Così, sia l'ATP endogeno che quello esogeno agisce come una sostanza algogena pronocicettiva. L'azione dell'ATP extracellulare è però limitata alla sua breve emivita; infatti i livelli di ATP sono controllati da una classe di enzimi, le ectonucleotidasi, che idrolizzano l'ATP in adenosina, che a sua volta, attiva i recettori P1 che hanno un importante ruolo neuroprotettivo (Bjelobaba et al., 2011).

2. SCOPO

La modulazione purinergica dei meccanismi coinvolti negli stati di dolore, suggerisce che i purinocettori potrebbero essere un target importante per il trattamento del dolore neuropatico. Scopo della tesi è comparare gli effetti della modulazione del sistema purinergico attraverso due differenti composti dialdeidici: un'adenosina stabile modificata (2-[1-(6-amminopurin-9-il)-2-osso-etossi]prop-2-enale, chiamata MED1101), e l'OxATP, un'antagonista non selettivo dei recettori P2X7, in due modelli animali di neuropatia periferica, lo *spared nerve injury* (SNI) e la *neuropatia periferica dolorosa indotta dal paclitaxel* (pPPN). Alla luce del ruolo dei recettori purinergici P2X nei cambiamenti fenotipici delle cellule gliali nelle diverse patologie del SNC, nella presente tesi, è stata focalizzata l'attenzione sul ruolo del recettore P2X7 sia negli astrociti che nelle cellule della microglia, che giocano un ruolo importante nella plasticità sinaptica associata al dolore neuropatico. Entrambi i composti sono stati testati ad una dose fissa di 6mg/kg a differenti time points. I ratti sono stati divisi in gruppi sperimentali come segue: a) animali neuropatici trattati con somministrazione intraperitoneale (i.p.) di MED1101 o OxATP per 21 giorni; b) animali che ricevono solo il veicolo (DMSO) e c) gruppi di controllo (CTR). Il fenotipo allodinico ed iperalgesico è

stato valutato attraverso l'analisi comportamentale, rispettivamente con il von Frey Filament test e il Plantar Test 1, 7, 14, 21, 28 giorni dopo il danno. Il 28° giorno gli animali sono stati sacrificati, e le sezioni di midollo spinale sono state processate per le analisi molecolari e morfologiche dei marker gliali. E' stata quindi valutata, attraverso analisi immunohistochimica, la risposta degli astrociti (GFAP) e della microglia (Iba1) su sezioni di midollo spinale lombare. In entrambi i modelli utilizzati, ed usando entrambe le sostanze, gli animali trattati mostravano una riduzione dose-dipendente dell'allodinia ed iperalgesia termica, parallelamente ad una significativa riduzione della risposta gliale nel midollo spinale. Questi dati ci portano ad ipotizzare un potenziale ruolo dei composti dialdeidici come agenti analgesici nel dolore neuropatico cronico ed un possibile ruolo come molecole antigliotiche.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Animali

Per l'esecuzione degli esperimenti sono stati utilizzati ratti maschi (n=30) del ceppo Sprague Dawley (250-300g; Charles River, Calco, Italia) stabulati nel numero di 3 per gabbia con cicli alterni di 12 ore di luce e 12 ore di buio e con libero accesso a cibo ed acqua. Ogni animale è stato ospitato in gabbie di ferro ricoperte di 4-6 cm di segatura in specifiche condizioni esenti da organismi patogeni (Bai et al., 1999). Le procedure chirurgiche e sperimentali sono state approvate dal *Comitato Etico per la Sperimentazione Animale della Seconda Università di Napoli* e sono conformi al regolamento italiano per la cura degli animali da laboratorio, in accordo al decreto legislativo italiano (D.L.116/92) e a quello della UE (L358/18/12/86). Inoltre, la sperimentazione è stata effettuata durante il ciclo di luce e in accordo al protocollo approvato dalla commissione di cura degli animali del Ministero della Salute con le linee guida della NIH per la cura e l'uso degli animali da laboratorio. Sono stati fatti tutti gli sforzi per ridurre il numero e le sofferenze degli animali durante gli esperimenti.

3.2 Gruppi sperimentali

Per il modello SNI, i ratti (gruppo I, n=10) sono stati trattati quotidianamente con i composti testati (6mg/kg) a partire dal giorno 1 (il giorno dopo l'SNI) per 21 giorni e raggruppati in due gruppi sperimentali (n=5), ciascuno che riceveva OxATP o MED1101 (gentilmente offerti dalla Medestea, Torino, Italia) alla stessa dose. Per il modello pPPN, ai ratti (gruppo II, n=10) è stato somministrato il paclitaxel fino a quando la neuropatia periferica non è stata clinicamente valutata dal von Frey e dal Plantar test. I ratti pPPN neuropatici, sono stati poi divisi in due gruppi sperimentali (n=5), ognuno che riceveva OxATP o MED1101 alla stessa dose. Il gruppo dei veicoli (VEH, n=10) è costituito da animali neuropatici SNI (n=5) o pPPN (n=5), trattati con somministrazione i.p. di veicolo (DMSO) per 21 giorni. Il gruppo dei controlli (CTR, n=10) è rappresentato da animali che non stati trattati nè con paclitaxel nè sottoposti a legatura del nervo.

3.3 SNI

I ratti sono stati anaestizzati con tiletamina cloridrato (40mg/kg); sulla zona da operare, accuratamente depilata, è stata incisa la cute sulla

superficie laterale della coscia destra ed attraverso il muscolo bicipite femorale è stato esposto il nervo sciatico in corrispondenza della triforcazione. Lo sviluppo della neuropatia è stato indotto negli animali a seguito di assotomia parziale del nervo sciatico, precisamente del nervo tibiale e peroneo comune lasciando intatto il surale secondo il metodo di Decosterd e Woolf (2000). Il nervo tibiale e il peroneo comune sono stati legati stretti con un filo di seta 5,0 e sezionati distalmente alla legatura. Per il gruppo di controllo (sham operated), i nervi sono stati esposti ma non tagliati. Muscolo e pelle sono stati irrigati con soluzione salina e suturati in doppio strato con micelle cutanee chirurgiche.

3.4 pPPN

I ratti (n=15) sono stati trattati con iniezioni i.p. di paclitaxel (2mg/kg) a giorni alterni (giorno 0, 2, 4 e 6) come precedentemente descritto (Polomano et al., 2001). La dose cumulativa finale di paclitaxel somministrata è di 8mg/kg. Il paclitaxel è preparato diluendo il Taxol (Bristol-Myers-Squibb) nel veicolo che è una preparazione di soluzione salina e Cremophor EL 10% (un derivato dell'olio di castor e ossido di etilene), utilizzata per le iniezioni di paclitaxel alla dose di

0,6mg/ml. Il comportamento degli animali è stato osservato con il von Frey e il Plantar test ogni giorno fino alla fine del trattamento con paclitaxel. Quando la sindrome neuropatica, caratterizzata da allodinia ed iperalgesia termica è diventata clinicamente evidente (giorno 14), gli animali sono stati divisi in due gruppi che ricevevano adenosina 5'-trifosfato-2'3'-dialdeide (OxATP) o 2-[1-(6-amminopurin-9-il)-2-ossometossi]prop-2-enale (MED1101). Il composto MED1101 è stato sintetizzato in accordo al processo descritto da Grant e Lerner (Ref.26).

3.5 Somministrazione dei farmaci

I ratti SNI sono stati trattati i.p. con OxATP o MED1101 (6mg/kg) a partire dal giorno dopo la legatura (giorno 1) fino al giorno 21. L'OxATP è stato sciolto in acqua distillata (dH₂O) ed un volume totale di 1 ml, contenente 1.8 mg di OxATP, è stato iniettato a ciascun ratto. Il MED1101 è stato sciolto in DMSO ed un volume totale di 200 µl, contenente 1.8 mg di MED1101, è stato iniettato a ciascun ratto. I ratti pPPN hanno ricevuto i.p. entrambe le sostanze (6mg/kg) a partire dal giorno 14 (7 giorni dopo la fine del trattamento con paclitaxel),

fino al giorno 35. Il gruppo dei veicoli è stato trattato con un volume totale di 200 µl di DMSO

3.6 Test comportamentali

I test comportamentali per valutare lo sviluppo dello stato neuropatico sono stati il *Plantar test* per l'iperalgia termica e il *Dynamic Plantar Anesthesiometer* per l'allodinia meccanica. Per il modello SNI, i test comportamentali sono stati condotti al giorno 0 (giorno dell'SNI), al giorno 1 (il giorno della prima iniezione dei composti testati), al giorno 7, 14, 21 e 28 dopo il danno. Il 28° giorno tutti gli animali sono stati sacrificati. Per gli animali pPPN, i test comportamentali per la sensibilità termica e meccanica sono stati condotti al giorno 1 (il giorno della prima iniezione di paclitaxel), al giorno 7, al giorno 14 (7 giorni dopo l'ultima iniezione), al giorno 21, 28, 35 e 42. Il 42° giorno tutti gli animali sono stati sacrificati. Le soglie di risposta meccanica sono state quantificate misurando il tempo di retrazione della zampa a seguito della stimolazione con filamento di Von Frey (Chaplan et al. 1994). In breve, gli animali sono stati posti in un box in plexiglas (21 x 16 x 27 cm³) la cui base è costituita da una griglia attraverso cui il filamento viene applicato alla faccia plantare dell'arto operato (Ugo Basile, Comerio, Italia). Agli

animali è concesso un periodo di ambientamento di circa 30 min che precede l'inizio del test. Il filamento è stato applicato con forza crescente per determinare la soglia di risposta, considerata come la più bassa forza che evoca la risposta di retrazione della zampa. Il tempo di resistenza alla forza progressiva applicata all'arto posteriore operato (30g in 20s) è stata calcolato sei volte con un intervallo di 5 minuti tra le varie stimolazioni. Le latenze di retrazione dallo stimolo nocivo termico sono state stabilite mediante il Plantar test (Hargreaves et al. 1988). I ratti sono stati posti in box di plexiglas posizionati su una superficie di vetro. Agli animali viene concesso un ambientamento di 30 min prima di iniziare il test. La latenza di retrazione della zampa in risposta al calore radiante (infrarossi) è stata misurata usando l'apparecchiatura per il plantar test (Ugo Basile, Comerio, Italia). La fonte di calore è stata posizionata sotto la superficie plantare della zampa affetta nella regione del surale e attivata con un settaggio di 7.0. Il timer digitale connesso alla fonte di calore automaticamente registra la latenza di risposta per la retrazione della zampa con un minimo di 0,1s. L'intensità del raggio di luce infrarossa è stata scelta per dare una latenza di base di circa 15s in ratti di controllo. È stato impostato un limite di 20s per prevenire un eventuale danno tissutale. L'arto posteriore operato è stato testato per due volte ad ogni time

point con un intervallo di 5 minuti tra le stimolazioni. Alla fine degli esperimenti gli animali sono stati sacrificati con una dose letale di anestetico e il midollo spinale è stato prelevato per effettuare gli esperimenti di immunohistochimica

3.7 Immunohistochimica

3.7.1 Preparazione del tessuto. I ratti sono stati anestetizzati con una iniezione intraperitoneale di cloralio idrato (300mg/Kg di peso corporeo) e perfusi per via transcardiaca con una soluzione salina (TRIS HCl 0,1M/ EDTA 10 mM) seguita da paraformaldeide al 4% in un tampone fosfato 0,01M (PB), pH 7.4 a 4°C. Il midollo spinale è stato rimosso e post-fissato due ore dopo nello stesso fissativo, poi in PBS saturato con saccarosio al 30% e congelato in isopentano freddo su ghiaccio secco. Le sezioni seriali sono state tagliate al microtomo ad uno spessore di 25 micron e raccolte in PBS freddo per l'immunocitochimica.

3.7.2 Anticorpi. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi: anticorpi di topo per la rivelazione della proteina gliale fibrillare acida (GFAP) (1:400; Sigma-Aldrich Milano, Italia); anticorpi di coniglio per la molecola adattatrice 1 legante il calcio ionizzato (Iba1) (1:500; Wako Chemicals, USA).

3.7.3 Immunocitochimica del midollo spinale. Le sezioni di midollo spinale sono state saturate con normal serum al 10% in soluzione salina di tampone fosfato 0,01M (PBS) e Triton 0,25% per 1 ora a temperatura ambiente. L'anticorpo primario è stato diluito in PBS 0,01M contenente 10% normal serum e 0,25% Triton; 1:400 GFAP (Sigma), 1:500 Iba1 (Wako). Le sezioni sono state incubate per 48 ore a 4°C, quindi lavate per diverse volte in PBS e incubate poi con l'appropriato anticorpo secondario biotinilato (Vector Labs, Inc., Burlingame, CA, USA; 1:200) per 90 minuti a temperatura ambiente (RT), lavate nuovamente in PBS e processate utilizzando il kit perossidasiico avidina-biotina Vectastain (Vector Labs, Inc., Burlingame, CA, USA) per 90 minuti, a RT. Le sezioni sono state poi lavate in 0.05M Tris-HCl e fatte reagire con 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloridato (DAB; Sigma, 0.5 mg/ml Tris-HCl) e perossido di idrogeno allo 0.01%. Le sezioni sono state montate su vetrini trattati con cromo-allume gelatina, disidratate, e chiuse con un vetrino coprioggetto.

3.8 Misure e analisi statistica. I preparati sono stati visualizzati con un microscopio ottico Zeiss Axioskope 2 equipaggiato con una camera digitale ad alta risoluzione (C4742-95, Hamamatsu Photonics, Italia). Le misurazioni dei diversi marker, nel corno dorsale del

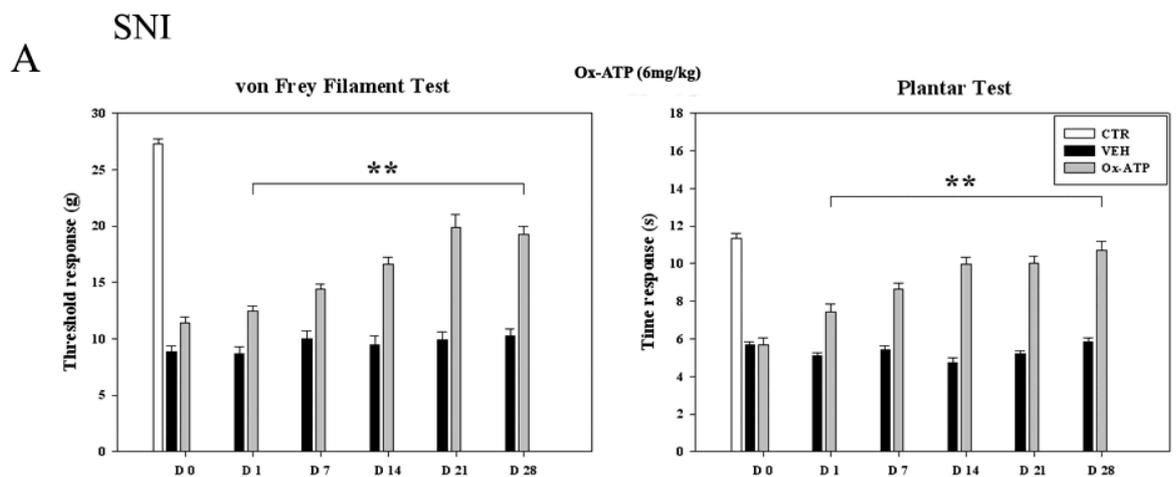
midollo spinale, sono state compiute utilizzando il sistema di analisi di immagine assistita (MCID 7.0; Res Imaging. Inc, Canada). Per i marker gliali è stata preferita un'analisi morfometrica per la perfetta visualizzazione dei singoli elementi positivi. Nel corno dorsale del midollo spinale è stata misurata l'espressione di GFAP e Iba1, marker rispettivamente di astrociti e microglia. I valori di questi marker molecolari sono stati espressi come area proporzionale: area occupata da elementi positivi rispetto all'area totale acquisita. Le medie sono state ottenute da cinque sezioni di midollo spinale selezionate in maniera casuale per ogni animale e i gruppi trattati e il gruppo di controllo (CTR/Veicolo) sono stati confrontati. Questi dati sono stati esportati e convertiti in un istogramma con distribuzione di frequenza utilizzando il programma Sigma-Plot 10.0 (SPSS Erkrath Germania). I dati di tutte le analisi quantitative sono stati analizzati mediante one-way ANOVA, utilizzando il metodo di Holm-Sidak per confronti multipli (* $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,001$). Tutti i dati sono stati espressi come media \pm SEM. Singole immagini dei controlli e dei ratti trattati sono state assemblate e sono state fatte poi le stesse modifiche per migliorare la luminosità, il contrasto e la nitidezza con Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

4. RISULTATI

4.1 Il comportamento neuropatico SNI-indotto è revertito dalla somministrazione i.p. dei composti dialdeidici

Per valutare il ruolo dei composti dialdeidici come agenti anti-nocicettivi, gli animali sono stati osservati per il comportamento neuropatico al giorno 0 (test basale), e ai giorni 1, 7, 14, 21 e 28 dopo la legatura (SNI), attraverso l'analisi della sensibilità termica e meccanica, come precedentemente descritto (Cirillo et al., 2010; Colangelo et al., 2008). Il valore basale medio della normale soglia meccanica era di 27.25 ± 0.43 g tra i differenti gruppi sperimentali. Negli animali di controllo (CTR) questo valore resta inalterato fino alla fine dell'esperimento (giorno 28). Gli animali SNI mostravano una significativa riduzione della soglia nocicettiva meccanica a partire dal giorno 1 (il giorno dopo la legatura), mostrando una risposta di 8.68 ± 0.56 g, indicativa di uno stato allodinico. Nei ratti trattati con OxATP per 21 giorni, la sensibilità meccanica è stata ripristinata al valore di 19.87 ± 1.11 g, rispetto agli animali trattati con solo veicolo (9.93 ± 0.62 g) ($p \leq 0.001$). Questo effetto era ancora chiaramente evidente al giorno 28, sette giorni dopo la fine del trattamento con OxATP (19.28 ± 0.65 g vs 10.25 ± 0.61 g, Ox-ATP vs VEH). Negli

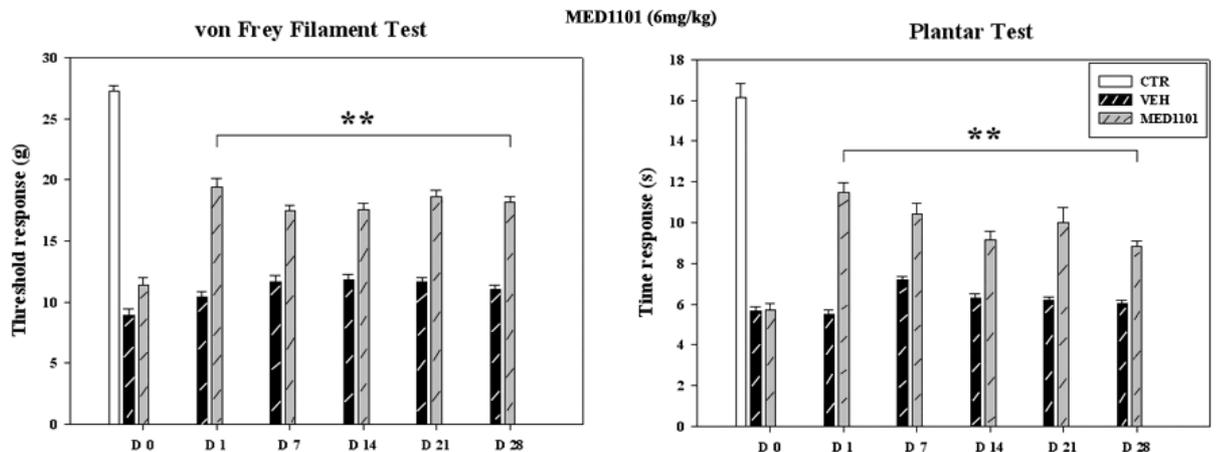
animali neuropatici, anche il test di Hargreaves mostrava una riduzione nel tempo di reazione allo stimolo termico a partire dal giorno 1 ($5.10 \pm 0.14s$), indicativa dell'inizio di uno stato iperalgesico, rispetto al valore basale del gruppo dei controlli ($11.33 \pm 0.25s$). Il comportamento iperalgesico era chiaramente evidente nel gruppo dei veicoli a partire dal giorno 1 ($5.10 \pm 0.14s$) fino al giorno 28 ($5.82 \pm 0.23s$). 21 giorni di somministrazione i.p. di OxATP ripristina significativamente la sensibilità termica al valore di $10.03 \pm 0.35s$ ($p \leq 0.001$) rispetto al gruppo dei veicoli ($5.18 \pm 0.19s$) ed il miglioramento è stato ancora osservato 7 giorni dopo la fine del trattamento ($10.71 \pm 0.45s$) ($p \leq 0.001$) (Fig. 5A).



Un significativo recupero sia della soglia nocicettiva meccanica che termica è stato osservato anche dopo il trattamento con MED1101. La somministrazione i.p. di MED1101 ripristina la sensibilità meccanica

a partire dal giorno 1 ($19.44 \pm 0.65\text{g}$) fino al giorno 21 ($18.65 \pm 0.50\text{g}$) rispetto agli animali trattati con veicolo (giorno 1: 10.44 ± 0.41 ; giorno 21: $11.62 \pm 0.39\text{g}$) e questo effetto perdurava anche 7 giorni dopo la fine del trattamento (giorno 28) ($18.22 \pm 0.45\text{g}$ vs $11.00 \pm 0.39\text{g}$, MED1101 vs VEH). E' stato osservato che questo composto è capace di innalzare la soglia nocicettiva termica al valore di $10.00 \pm 0.75\text{s}$ al giorno 21 rispetto al valore dei veicoli di $6.20 \pm 0.16\text{s}$ ($p \leq 0.001$); effetto che è stato osservato anche 7 giorni dopo la fine del trattamento, al giorno 28 ($8.82 \pm 0.29\text{s}$) rispetto agli animali neuropatici (VEH, $6.03 \pm 0.18\text{s}$) ($p \leq 0.001$) (Fig. 5B).

B

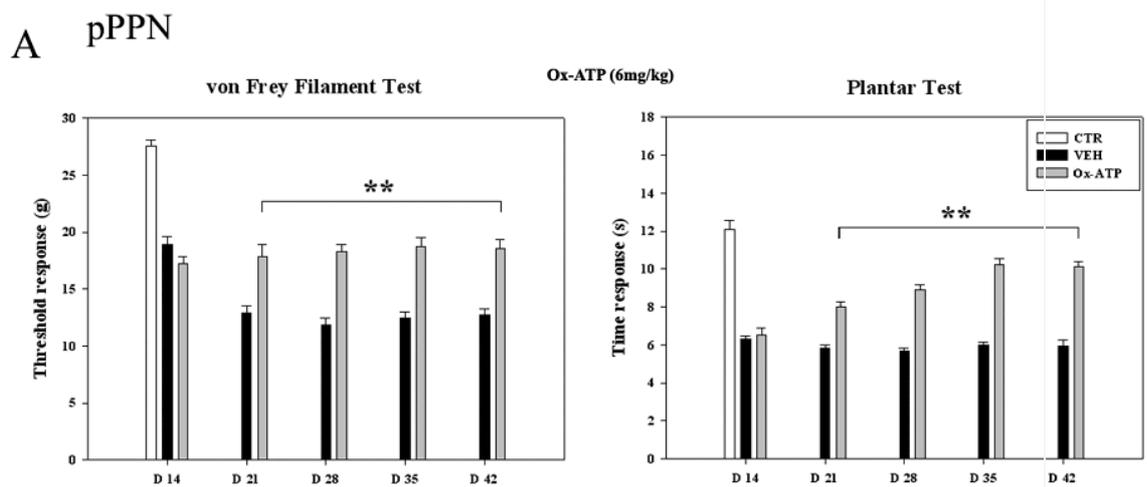


4.2 I composti dialdeidici migliorano il fenotipo

comportamentale dopo pPPN

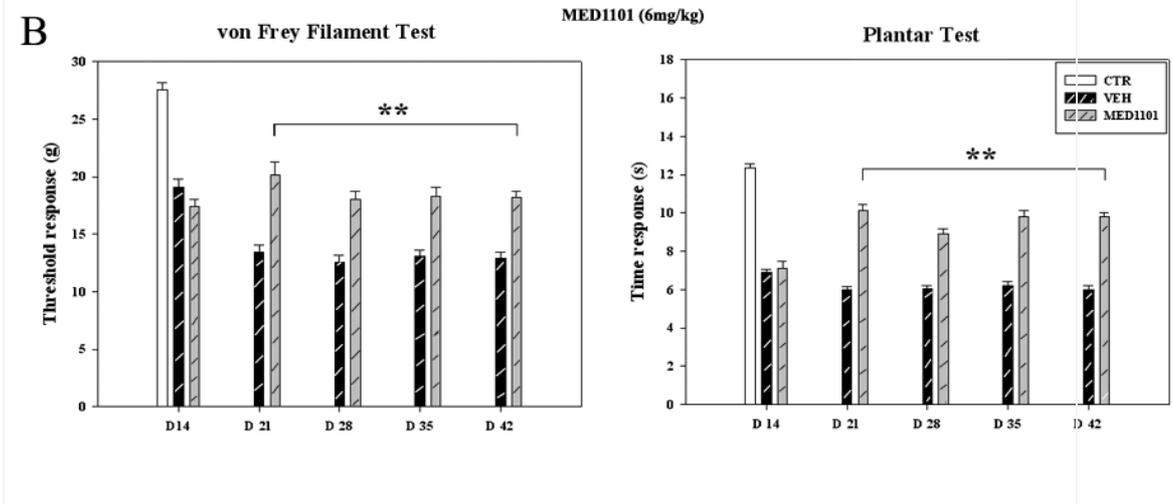
I ratti trattati con il paclitaxel sono stati testati per il comportamento al giorno 0 (test basale), al giorno 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 utilizzando il von Frey e il Plantar test. Il valore medio basale della normale soglia meccanica e termica era rispettivamente di $28.35 \pm 0.43\text{g}$ e $12.83 \pm 0.25\text{s}$, valori che sono rimasti pressochè inalterati durante lo studio. I ratti trattati con il paclitaxel non mostravano una significativa riduzione delle soglie nocicettive meccanica e termica rispetto agli animali di controllo fino al giorno 14, quando i ratti trattati con il paclitaxel hanno mostrato una più precoce risposta alla stimolazione sia meccanica che termica ($18.87 \pm 0.74\text{g}$ e $6.30 \pm 0.18\text{s}$) rispetto ai controlli ($27.52 \pm 0.58\text{g}$ e $12.10 \pm 0.48\text{s}$). Lo stato allodinico ed iperalgesico è incominciato ad essere evidente al giorno 21 ($12.93 \pm 0.62\text{g}$ e $5.83 \pm 0.16\text{s}$) ed è rimasto tale fino alla fine dell'esperimento al giorno 42. ($12.68 \pm 0.58\text{g}$ e $5.82 \pm 0.31\text{s}$) (Fig. 6A). Il trattamento i.p. con entrambi i composti dialdeidici è iniziato al giorno 14 fino al giorno 35: la somministrazione di OxATP ha innalzato la sensibilità meccanica al valore di $17.82 \pm 1.11\text{g}$ (giorno 21), $18.28 \pm 0.65\text{g}$ (giorno 28) e $18.75 \pm 0.75\text{g}$ (giorno 35) rispetto al

gruppo dei veicoli ($12.93 \pm 0.62g$, giorno 21; $11.85 \pm 0.61g$, giorno 28; $12.42 \pm 0.45g$, giorno 35) ($p \leq 0.001$). La somministrazione i.p. continua di OxATP ha anche innalzato la soglia termica al valore di $7.98 \pm 0.28s$ (giorno 21), $8.90 \pm 0.28s$ (giorno 28) e $10.21 \pm 0.34s$ (giorno 35) rispetto agli animali neuropatici ($5.83 \pm 0.16s$, giorno 21; $5.67 \pm 0.17s$, giorno 28; $5.82 \pm 0.18s$, giorno 35) ($p \leq 0.001$). Questo effetto persisteva fino alla fine del trattamento al giorno 42 ($18.55 \pm 0.82g$ e $10.11 \pm 0.25s$ vs $12.68 \pm 0.58g$ e $5.82 \pm 0.31s$ OxATP vs VEH) (Fig. 6A).



Il trattamento con MED1101 ha innalzato la soglia meccanica a partire dal giorno 21 rispetto agli animali neuropatici ($20.16 \pm 1.11g$ vs. $13.46 \pm 0.62g$, MED1101 vs VEH) ($p \leq 0.001$) e la differenza era ancora chiaramente osservabile al giorno 35 ($18.33 \pm 0.75g$), persistendo anche 7 giorni dopo la fine del trattamento (giorno 42: $18.22 \pm 0.55g$). Infine, la soglia termica è stata ripristinata al valore di

9.82±0.29s (giorno 35) e 9.78±0.23s (giorno 42) rispetto al gruppo dei veicoli (giorno 35: 6.22±0.17s; giorno 42: 5.99±0.22s) (Fig. 6B).

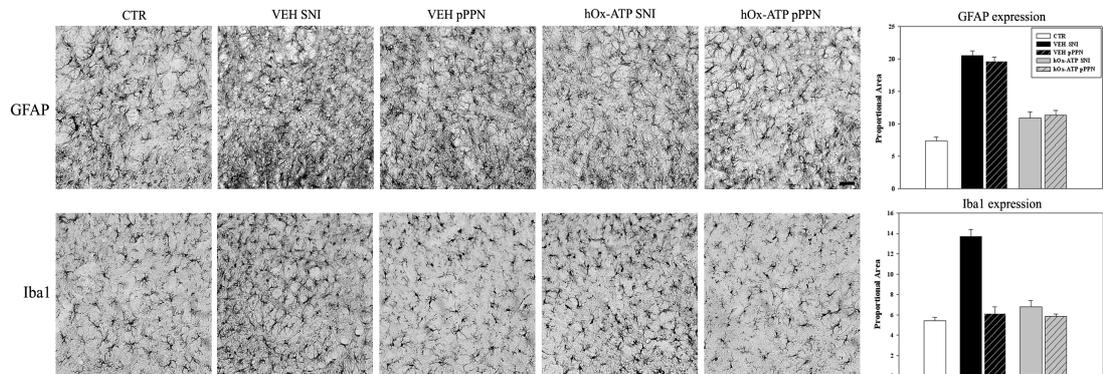


4.3 Modulazione purinergica dell'attivazione astrocitaria e microgliale nel midollo spinale dei ratti neuropatici

E' stato precedentemente riportato dal nostro gruppo di lavoro, che il danno nervoso periferico è correlato ad un aumento dei markers gliali indicativi di astrogliosi reattiva (Cirillo et al., 2012, 2011, 2010; Colangelo et al., 2008). Infatti evidenze sempre più numerose indicano che le cellule gliali attivate sono fortemente implicate nello sviluppo e nel mantenimento degli stati di dolore persistente (Scholz and Woolf, 2007) in seguito ad una varietà di stimoli incluso il danno nervoso periferico (Cirillo et al., 2012, 2011; Milligan and Watkins

2009; Colangelo et al., 2008) o il danno tossico (Zhang et al., 2012). Quindi, è stato valutato il ruolo dei composti dialdeidici nel ripristino della reazione gliale dopo il danno nervoso. Nel set sperimentale analizzato, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra il trattamento con OxATP o MED1101 nella modulazione della risposta astrocitaria e microgliale dopo l'induzione del dolore neuropatico. Quindi, è stata riportata l'analisi morfometrica delle sezioni di midollo lombare spinale degli animali trattati con MED1101. L'analisi immunohistochimica su sezioni di midollo lombare, ha rivelato la presenza di una marcata gliosi 28 giorni dopo l'SNI, come dimostrato dal forte incremento della colorazione per la GFAP, proteina del citoscheletro astrocitario (20.55 ± 0.67), e dai livelli di espressione di Iba1 (13.68 ± 0.72) (Fig. 7) negli animali SNI trattati con veicolo rispetto al gruppo di controllo (7.36 ± 0.58 e 5.40 ± 0.33 per GFAP e Iba1, rispettivamente) ($p \leq 0.001$). La somministrazione i.p. continua di MED1101 riduce i livelli di GFAP e Iba1 a 10.89 ± 0.94 e 6.79 ± 0.62 . Questi dati indicano che l'OxATP riduce chiaramente l'invasione sia astrogliale che microgliale del midollo spinale lombare. Nel modello di neuropatia periferica dolorosa evocate dal paclitaxel, il trattamento con MED1101 previene l'attivazione astrocitaria riducendo i livelli di GFAP a 11.32 ± 0.72 rispetto al gruppo dei veicoli (19.64 ± 0.93), ma

non coinvolge l'espressione microgliale (5.84 ± 0.23 vs 6.13 ± 0.41 MED1101 vs VEH) ($p \leq 0.1$) (Fig. 7).



Questi dati, mentre confermano il ruolo dei composti dialdeidici nel recupero del comportamento neuropatico, indicano ancora più chiaramente il loro potenziale ruolo nella riduzione dell'attivazione astrogliale in seguito all'induzione del dolore neuropatico.

5. DISCUSSIONE

Evidenze recenti suggeriscono che la sindrome del dolore neuropatico, caratterizzata da allodinia ed iperalgesia, è strettamente correlata al danno nervoso periferico o alla somministrazione di agenti anti-tumorali come il paclitaxel (Polomano et al., 2001; Rowinsky et al., 1990). Studi morfo-funzionali hanno posto luce sui meccanismi del dolore neuropatico, suggerendo che la sensitizzazione periferica dei terminali nervosi da parte di mediatori pro-infiammatori (ATP, glutammato, citochine pro-infiammatorie, nitrossido) induce uno squilibrio dell'omeostasi neuro-gliale nel midollo spinale (Cirillo et al., 2011; Meisner et al., 2010). Negli ultimi anni, molte evidenze sperimentali hanno dimostrato che i meccanismi centrali del dolore neuropatico dopo danno nervoso o infiammazione coinvolgono non solo la plasticità dei neuroni ma anche un'alterazione delle funzioni delle cellule gliali, inclusi astrociti e cellule microgliali nel midollo spinale (Cirillo et al., 2012, 2011). Infatti, come recentemente dimostrato, il dolore neuropatico è accompagnato da cambiamenti reattivi nel sistema nervoso centrale, sia nella microglia che negli astrociti, una condizione ora chiamata *gliopatia* (Colangelo et al., 2012, Pekny and Nilsson 2005). L'attivazione neuronale/astrocitaria e l'alterazione delle interazioni neuro-gliali nel midollo spinale sono

direttamente responsabili dell'ipereccitabilità neuronale e dell'aumentata/aberrante trasmissione sinaptica che sostiene la condizione del dolore neuropatico. (Gwak and Hulsebosch, 2009; Wang et al., 2009). Un tentativo per contrastare questa condizione di “guadagno di funzione” del sistema somatosensoriale spinale viene dal sistema GABAergico: è stato riportato che l'ipofunzione del tono inibitorio GABAergico è un fattore importante nella rafforzata trasmissione sinaptica eccitatoria, che spesso risulta in un'ipereccitabilità neuronale nel corno dorsale del midollo spinale in seguito al danno nervoso (Cirillo et al., 2012, 2011; Gwak and Hulsebosch, 2011; Meisner et al., 2010). Diversi modelli animali sono stati proposti per studiare i meccanismi che sottendono il dolore neuropatico: evidenze sperimentali indicano l'attivazione del sistema purinergico come meccanismo di modulazione della percezione dolorosa, suggerendo che le interazioni purinergiche neuro-gliali sono importanti modulatori della neurotrasmissione sensoriale (Inoue and Tsuda 2011; Donnelly-Roberts et al., 2008; Tsuda et al., 2005). Sia le cellule microgliali (Inoue 2008; Honda et al., 2001) che gli astrociti (Abbraccio and Ceruti, 2006) esprimono differenti tipi di recettori P2Y e P2X in diverse condizioni, suggerendo che il segnale P2-mediato contribuisce in maniera critica allo sviluppo e al

mantenimento del dolore neuropatico (Trang et al., 2012; Inoue and Tsuda, 2011). In particolare, l'ATP si è dimostrato essere un mediatore pro-infiammatorio (Gourine et al., 2007; Khakh and North 2006) e viene rilasciato in grande quantità dopo il danno tissutale dai terminali nervosi (Holton 1959; Holton and Holton 1954). L'ATP, che è rilasciato in seguito ad un danno traumatico, in condizioni di ipossia e morte cellulare, contribuisce alla risposta gliotica attraverso il legame ai recettori P2X7 ed aumentando l'espressione della GFAP, l'allungamento dei processi astrocitari e la proliferazione cellulare. La stimolazione dei P2X7R, in più, attiva la microglia, che una volta attivata rilascia numerose sostanze pro-infiammatorie (es $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$) che promuovono un'ulteriore attivazione microgliale, portando ad un ciclo di propagazione della neuroinfiammazione e neurodegenerazione (Neary and Kang, 2005). Quindi, antagonisti dei recettori P2X potrebbero potenzialmente ridurre il danno secondario sia inibendo direttamente il danno neuronale eccitatorio, sia riducendo la risposta infiammatoria locale e sistemica (Peng et al, 2009; Wang et al, 2004), rappresentando promettenti target per il trattamento del dolore neuropatico (Tsuda et la., 2012). Tra i recettori purinergici ATP sensibili, il P2X7 gioca un ruolo importante nella trasduzione sensoriale periferica della percezione dolorosa (Zhang et al., 2005).

Poichè, i recettori P2X7 sono maggiormente espressi sulle cellule gliali (Verkhatsky et al., 2009; Abbracchio and Ceruti 2006, Narcisse et al., 2005), è stato valutato il ruolo delle cellule gliali spinali attivate. La modulazione purinergica dei recettori P2X7 reverte l'allodinia e l'iperalgia indotte dal paclitaxel, come osservato in maniera simile nel modello SNI, suggerendo che l'espressione spinale di questi recettori rappresenta un meccanismo di modulazione della percezione dolorosa. E' stato dimostrato che OxATP, un antagonista non selettivo dei recettori P2X7, ha *i*) effetti analgesici in un modello di dolore acuto (Dell'Antonio et al., 2002) e persistente (Honore et al., 2006) e *ii*) attenua la reazione gliale (Monif et al., 2009), riducendo così la cascata pro-infiammatoria (Beigi et al., 2003). OxATP agisce sulle cellule microgliali residenti perché esprimono alti livelli del recettore P2X7 ed inibisce fortemente l'attivazione microgliale in condizioni di danno. In questo modo, la soppressione della gliosi reattiva nei ratti trattati con OxATP potrebbe essere secondaria al blocco dei P2X7R nella microglia. Evidenze sperimentali, infatti, suggeriscono che gli astrociti normalmente esprimono bassi livelli di P2X7R (Yu et al., 2008; Kukley et al., 2001) e che le citochine pro-infiammatorie (IL1 β) promuovono l'aumento dell'espressione astrocitaria del recettore (Narcisse et al., 2005). Così, anche gli astrociti potrebbero essere

target diretti del blocco dei recettori P2X7 nel contesto dell'infiammazione. Questi dati, nell'insieme, suggeriscono che l'azione anti-infiammatoria e anti-gliotica dell'OxATP risulta in un blocco dell'attività dei recettori P2X7. La prima evidenza diretta, in vivo, della riduzione della gliosi reattiva OxATP-mediata, è il recupero del comportamento neuropatico dopo 21 giorni di trattamento. Nei ratt trattati, OxATP ripristina sia la sensibilità meccanica che quella termica a partire da 7 giorni dopo il trattamento. Tenendo presente queste osservazioni, abbiamo comparato gli effetti dell'OxATP con un nuovo composto stabile simil-adenosina, MED1101 *i*) in un modello di dolore persistente indotto dall'SNI e *ii*) in un modello di dolore neuropatico indotto dal paclitaxel (pPPN), riportando che il composto dialdeidico MED1101 migliora il comportamento neuropatico e riduce l'attivazione gliale. Il meccanismo d'azione di MED1101 non è ancora molto conosciuto, anche se, come dimostrato dai nostri risultati, si può ipotizzare un possibile antagonismo del recettore P2X7. Infatti, è stato osservato che MED1101 è una molecola più stabile e con un meccanismo d'azione molto simile all'ATP ossidato. In più, è stata osservata anche un'attività immunosoppressiva di OxATP in un prototipo di modello di diabete autoimmune virus-indotto nel topo, e una forte soppressione

dell'attività delle cellule T (Lang et al., 2010) che ne ha limitato il suo uso clinico. In questa tesi, si è voluto dimostrare che l'SNI e la somministrazione di paclitaxel inducono lo sviluppo del dolore neuropatico. L'allodinia meccanica e l'iperalgia termica indotte dal paclitaxel, insorgono nei ratti a partire dal 14°giorno fino al giorno 42, mentre i ratti SNI mostrano una significativa riduzione della soglia nocicettiva a partire dal giorno dopo la legatura. Per comprendere meglio il ruolo del sistema purinergico nel migliorare il fenotipo comportamentale neuropatico, sono stati utilizzati due composti dialdeidici, OxATP e MED1101, valutando la loro capacità di ridurre il dolore neuropatico in due modelli animali di neuropatia periferica nel ratto. I dati comportamentali confermano che gli animali neuropatici SNI mostrano una riduzione significativa della soglia della percezione dolorosa il giorno dopo la legatura, come mostrato dalle soglie nocicettive meccaniche e termiche, che risultano ridotte (Fig. 5). In maniera simile, i test confermano l'insorgenza della sindrome dolorosa a partire dal giorno 14, 7 giorni dopo l'ultima iniezione di paclitaxel (Fig. 6). Gli animali trattati con entrambi i composti dialdeidici mostrano una marcata riduzione dell'allodinia meccanica e dell'iperalgia termica nel modello SNI (Fig. 5 A, B) e nel modello pPPN (Fig. 6 A, B). Queste osservazioni ci portano ad ipotizzare un

possibile ruolo della somministrazione di questi composti come meccanismo per determinare l'analgesia nel dolore neuropatico. Lo sviluppo e il mantenimento degli stati di dolore è accompagnato dall'attivazione delle cellule gliali. L'attivazione prolungata di queste cellule e la conseguente plasticità adattativa delle reti neuro-gliali contribuisce alla patofisiologia del dolore neuropatico (De Leo et al., 2006). Nel modello SNI, abbiamo osservato l'attivazione e la proliferazione sia degli astrociti che della microglia (Fig. 7) che produce una plasticità morfo-funzionale come recentemente riportato (Costigan and Woolf 2009; Cavaliere et al., 2007; Scholz and Woolf 2002; Woolf and Salter 2000). In particolare, i nostri dati suggeriscono che esiste un coinvolgimento degli astrociti spinali nella patogenesi della neuropatia periferica dolorosa evocata dal paclitaxel e che questo pattern si riscontra anche in seguito al danno nervoso periferico. Il trattamento con i composti dialdeidici è capace di ridurre l'attivazione astrocitaria in entrambi i modelli di neuropatia periferica e diminuire la proliferazione delle cellule microgliali nel modello SNI (Fig. 7). L'attivazione della microglia spinale dopo il trattamento con paclitaxel è, invece, controversa. Anche se alcuni autori hanno riportato l'attivazione della componente microgliale in ratti trattati con paclitaxel (Ledeboer et al., 2007), uno studio recente ha riportato che

non c'è un'attivazione della microglia spinale (Zhang et al., 2012, Zheng et al., 2011). Noi abbiamo riportato una differente reazione delle cellule gliali in seguito al trattamento con paclitaxel, supportando un ruolo critico degli astrociti spinali, ma non della microglia nella patogenesi della neuropatia indotta dal paclitaxel. I nostri studi, quindi, dimostrano che il trattamento con i composti dialdeidici previene l'attivazione astrocitaria riducendo i livelli della GFAP sia nel modello SNI che nel modello della neuropatia da paclitaxel, ma non coinvolge l'espressione microgliale nel modello pPPN.

6. CONCLUSIONI

I nostri dati suggeriscono che la somministrazione i.p. dei composti dialdeidici migliora il dolore neuropatico sia nel modello SNI che in quello pPPN, parallelamente ad una riduzione dell'attivazione astrocitaria, come dimostrato dalla riduzione dell'espressione della GFAP e di quella microgliale nel modello SNI. In accordo con precedenti lavori (Zhang et al., 2012), non abbiamo osservato alcun effetto sulla componente microgliale nel modello di neuropatia indotto dal paclitaxel. Anche se sono necessari ulteriori studi, questi risultati suggeriscono un coinvolgimento del sistema purinergico nella modulazione del dolore neuropatico, e quindi, un effetto analgesico della somministrazione sia di OxATP che di MED1101 in modelli animali di dolore neuropatico. Così, una migliore comprensione dei meccanismi attraverso cui i recettori purinergici agiscono, potrebbe portare allo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento del dolore neuropatico.

BIBLIOGRAFIA

Abbracchio MP, Ceruti S. Roles of P2 receptors in glial cells: focus on astrocytes. *Purinergic Signalling*. 2006; **2**(4):595-604.

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences* 2009; **32**(1):19-29.

Agrawal SG, and Evans RH. The primary afferent depolarising action of kainate in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1986; **87**:345-355.

Bai YH, Takemitsu M, Atsuta Y, Matsuno T. Peripheral mononeuropathy induced by loose ligation of the sciatic nerve in the rat: behavioral, electrophysiological and histopathologic studies. *Experimental Animals* 1999; **48**(2):87-94.

Basbaum AI. *Insights into the development of opioid* 1995.

Beggs S, and Salter MW. Stereological and somatotopic analysis of the spinal microglial response to peripheral nerve injury. *Brain Behav Immun* 2007; **21**(5): 624-33.

Beigi RD, Kertesz SB, Aquilina G, Dubyak GR. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2003; **140**(3):507-519.

Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 1985; **14**:375-403.

Bjelobaba I, Parabucki A, Lavrnja I, Stojkov D, Dacic S, Pekovic S, Rakic L, Stojiljkovic M, Nedeljkovic N. Dynamic changes in the expression pattern of ecto-5'-nucleotidase in the rat model of cortical stab injury. *J Neurosci Res* 2011; **89**(6):862-73.

Bonica JJ. Pain-basic principles of management. *Northwest Med.* 1970; **69**(8):567-8.

Burnstock G. Unresolved issues and controversies in purinergic signaling. *The Journal of Physiology* 2008; **586**(14):3307-3312.

Cavaliere C, Cirillo G, Rosaria Bianco M, Rossi F, De Novellis V, Maione S, Papa M. Gliosis alters expression and uptake of spinal glial amino acid transporters in a mouse neuropathic pain model. *NGB*. 2007; **3**(2):141-153.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM; Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Met*. 1994; **53**(1):55-63.

Chen L, and Huang LYM. Protein kinase C reduces Mg^{2+} block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 1992; **356**:521-523.

Christenson BN, and Perl ER Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *J Neurophysiol*. 1970; **33**:293-307.

Cirillo G, Cavaliere C, Bianco MR, De Simone A, Colangelo AM, Sellitti S, Alberghina L, Papa M. Intrathecal NGF administration reduces reactive astrocytosis and changes neurotrophin receptors expression pattern in a rat model of neuropathic pain. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; **30**(1):51-62.

Cirillo G, Bianco MR, Colangelo AM, Cavaliere C, De Luca D, Zaccaro L, Alberghina L, Papa M. Reactive astrocytosis-induced perturbation of synaptic homeostasis is restored by nerve growth factor. *Neurobiol Dis*. 2011; **41**(3):630-639.

Cirillo G, Colangelo AM, Bianco MR, Cavaliere C, Zaccaro L, Sarmientos P, Alberghina L, Papa M. BB14, a Nerve Growth Factor (NGF)-like peptide shown to be effective in reducing reactive astrogliosis and restoring synaptic homeostasis in a rat model of peripheral nerve injury. *Biotech Advan*. 2012; **30**(1):223-232.

Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, McMahon SB, Malcangio M. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. *Eur J Pain* 2007; **11**(2):223-30.

Clark AK, Yip PK, Malcangio M. The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *J Neurosci.* 2009; **29**(21):6945-54.

Clarke VRJ, Ballyk BA, Hoo KH, Mandelzys A, Pellizzari A, Bath CP, Thomas J. A hippocampal GluR₅ kainate receptor regulating inhibitory synaptic transmission. *Nature* 1997; **389**:599-603.

Colangelo AM, Bianco MR, Vitagliano L, Cavaliere C, Cirillo G, De Gioia L, Diana D, Colombo D, Redaelli C, Zaccaro L, Morelli G, Papa M, Sarmientos P, Alberghina L, Martegani E. A new nerve growth factor-mimetic peptide active on neuropathic pain in rats. *J Neurosci.* 2008; **28**(11):2698-2709.

Colangelo AM, Cirillo G, Lavitrano ML, Alberghina L, Papa M. Targeting reactive astrogliosis by novel biotechnological strategies. *Biotech Advan.* 2012; **30**(1):261-271.

Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci.* 2009; **32**:1–32.

De Leo JA, Tawfik VL, La Croix-Fralish ML. The tetrapartite synapse: path to CNS sensitization and chronic pain. *Pain.* 2006;**122**(1-2):17-21.

Decosterd I and Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000; **87**(2):149-158.

Dell'Antonio G, Quattrini A, Dal Cin E, Fulgenzi E, Ferrero ME. Antinociceptive effect of a new P(2Z)/P2X7 antagonist, oxidized ATP, in arthritic rats. *Neurosci Lett.* 2002; **327**(2):87-90.

Dickenson AH, and Aydar E. Antagonism at the glycine site on the NMDA receptor reduces spinal nociception in the rat. *Neurosci. Lett.* 1991; **121**:263-266.

Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh CC, Honore P, Jarvis MF. Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008; **324**(2):409-415.

Dray A, Urban L, Dickenson A. Pharmacology of chronic pain. Trends Pharmacol. Sci.1994; **15**:190-197.

Durand GM, Bennet MVL, Zukin RS. Splice variant of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. PNAS USA 1993; **90**:6731-6735.

El-Moatassim C and Dubyak GR. Dissociation of the pore-forming and phospholipase D activities stimulated via P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. Product inhibition of phospholipase D enzyme activity. J Biol Chem. 1993; **268**(21):15571-8.

Farber K and Kettenmann H. Purinergic signaling and microglia. Pflugers Arch. 2006; **452**:615–621.

Field HL and Martin JB. Il dolore: fisiopatologia e terapia. In: Isselbacher KJ, Braunwald E. et al., eds. Harrison: Principi di Medicina Interna. Milano: McGraw-Hill. Libri Italia 60-66, 1995.

Gourine AV, Dale N, Llaudet E, Poputnikov DM, Spyer KM, Gourine VN. Release of ATP in the central nervous system during systemic inflammation: Real-time measurement in the hypothalamus of conscious rabbits. J Physiol. 2007; **585**:305–316.

Grant AJ and Lerner LM. Heat-induced formation of alpha,beta-unsaturated nucleoside dialdehydes and their activity with adenosine deaminase. J Med Chem. 1980; **23**(7):795-798.

Gu JG, and MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. Nature 1997; **389**(6652):749-53.

Gwak, YS, and Hulsebosch CE. Remote astrocytic and microglial activation modulates neuronal hyperexcitability and below-level neuropathic pain after spinal injury in rat. Neuroscience 2009; **161**, 895-903.

Gwak YS, and Hulsebosch CE. Gliopathy maintains persistent hyperexcitability of spinal dorsal horn neurons after spinal cord injury: substrate of central neuropathic pain. In: Costa A, Villalba E editors. Horizons in Neuroscience Research. Nova Science Publishers; 2010, volume I, 195–224.

Gwak YS, and Hulsebosch CE. GABA and central neuropathic pain following spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2011; **60**(5), 799-808.

Hamby ME, and Sofroniew V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics* 2010, **7**(4):494-506.

Hamilton NB, and Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature Reviews Neuroscience* 2010; **11**(4):227-238

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 1988; **32**(1):77-88.

Henneberger C, and Rusakov DA. Synaptic plasticity and Ca²⁺ signalling in astrocytes. *Neuron Glia Biology* 2010; **13**:1-6.

Holton FA, and Holton PJ. The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots; a possible role for adenosine triphosphate in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol*. 1954; **126**(1):124-140.

Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol*. 1959; **145**(3):494-504.

Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci*. 2001; **21**:1975–1982.

Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, Hernandez G, Zhong C, Gauvin DM, Chandran P, Harris R, Medrano AP, Carroll W, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. A-740003 [N-(1-{{[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino}- 2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-

dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; **319**:1376-1385.

Huettner JE. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitisation by Con A. *Neuron* 1990; **5**:255-266.

Hulsebosch CE. Gliopathy ensures persistent inflammation and chronic pain after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2008; **214**(1):6-9.

Inoue K, and Tsuda M. Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia. *Exp Neurol.* 2011; **234**(2):293-301.

Inoue K. Purinergic systems in microglia. *Cell Mol Life Sci.* 2008; **65**(19):3074–3080.

Kelso SR, Nelson TE, Leonard JP. Protein kinase C-mediated enhancement of NMDA currents by metabotropic glutamate receptors in *Xenopus* oocytes. *Journal Physiology* 1992; **449**:705-718.

Khakh BS and North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature.* 2006; **442**(7102):527–532.

Kishimoto K, Koyama S, Akaike N. Synergistic mu-opioid and 5-HT1A presynaptic inhibition of GABA release in rat periaqueductal gray neurons. *Neuropharmacology.* 2001; **41**:529-538.

Kukley M, Barden JA, Steinhauser C, Jabs R. Distribution of P2X receptors on astrocytes in juvenile rat hippocampus. *Glia* 2001; **36**, 11–21.

Lang PA, Merkler D, Funkner P, Shaabani N, Merik A, Krings C, Barthuber C, Recher M, Bruk W, Haussinger D, Ohashi PS, Lang KS. Oxidized ATP inhibits T-cell-mediated autoimmunity. *Eur J Immunol.* 2010; **40**(9):2401-2408.

Ledeboer A, Jekich BM, Sloane EM, Mahoney JH, Langer SJ, Milligan ED, Martin D, Maier SF, Johnson KW, Leinwand LA, Chavez RA, Watkins LR. Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats. *Brain Behav Immun*. 2007; **21**(5):686-698.

Lerma J. Kainate reveals its targets. *Neurology* 1997; **19**:1155-1158.

Lobsiger CS and Cleveland DW. Glial cells as intrinsic components of non-cell-autonomous neurodegenerative disease. *Nat Neurosci*. 2007; **10**(11):1355-1360.

Luongo L, Palazzo E, Tambaro S, Giordano C, Gatta L, Scafuro MA, Rossi FS, Lazzari P, Pani L, De Novellis V, Malcangio M, Maione S. 1-(2',4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-cyclohexylamine-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazole-3-carboxamide, a novel CB2 agonist, alleviates neuropathic pain through functional microglial changes in mice. *Neurobiol Dis*. 2010; **37**(1):177-85.

Luongo L, Sajic M, Grist J, Clark AK, Maione S, Malcangio M. Spinal changes associated with mechanical hypersensitivity in a model of Guillain-Barré syndrome. *Neurosci Lett*. 2008; **437**(2):98-102.

MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurons. *Nature* 1986; **4**:519-522.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 1984; **309**:261-263.

Meisner JG, Marsh AD, Marsh DR. Loss of GABAergic interneurons in Laminae I-III of the spinal cord dorsal horn contributes to reduced GABAergic tone and neuropathic pain following spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2010; **4**:729-737.

Mendell LM. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exp. Neurol*. 1996; **16**:316-332.

Michaelis M, Blenk KH, Janig W, Vogel C. Development of spontaneous activity and mechanosensitivity in axotomized afferent nerve fibers during the first hours after nerve transection in rats. *J Neurophysiol.* 1995; **74**:1020-1027.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol.* 1999; **57**(1):1-164. Review

Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci.* 2009; **29**(12):3781-3791.

Murase K, Riu PD, Randic M. Excitatory and inhibitory amino acids and peptide-induced responses in acutely isolated rat spinal dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.* 1989a; **103**:56-63.

Murase K, Riu PD, Randic M. Tachykinins modulate multiple ionic conductances in voltage-clamped rat spinal dorsal horn neurons. *J. Neurophysiol.* 1989b; **61**:854-865.

Nadler JV, Evenson DA, Smith EM. Evidence from lesion studies for epileptogenic and non-epileptogenic neurotoxic interactions between kainic acid and excitatory innervation. *Brain Research* 1981; **205**:405-410.

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; **258**:597-603.

Nakatsuka T, Tsuzuki K, Ling JX, Sonobe H, Gu JG. Distinct roles of P2X receptors in modulating glutamate release at different primary sensory synapses in rat spinal cord. *J Neurophysiol.* 2003; **89**(6):3243-52.

Narcisse, L, Scemes E, Zhao Y, Lee SC, Brosnan CF. The cytokine IL-1 β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 2005 ; **49**, 245–258.

Neary, JT, and Kang, Y. Signaling from P2 nucleotide receptors to protein kinase cascades induced by CNS injury: implications for reactive gliosis and neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2005; **31**(1-3):95-103.

Pekny M, and Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 2005; **50**(4):427-434.

Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, Nedergaard M. Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; **106**(30):12489-12493.

Pfrieger FW and Barres BA. Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 1997; **12**:277(5332):1684-7.

Pin JP, Fagni L, Bioccaert J. The metabotropic Glutamate receptors: targets for new neuropharmacologically active drugs. *Curr. Drugs: Neurodegenerative Disorders* 1993; **1**:111-137.

Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennet GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain.* 2001; **94**(3):293–304.

Portenoy R. Il dolore. In: *Manuale Merck di Geriatria*. Milano: ESI Stampa Medica, 123-152, 1990.

Reid CA, and Bliss TV. Learning about kainate receptors. *Trends in Pharmacological Science* 2000; **21**:159-160.

Rodriguez-Moreno A, Herreras O, Lerma J. Kainite receptors presynaptically down regulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 1997; **19**:893-901.

Rodriguez-Moreno and Lerma J. Kainate receptor modulation of GABA release involves a metabotropic function. *Neuron* 1998; **20**:1211-1218.

Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst.* 1990; **82**(15):1247-1259.

Schoepp DD, and Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmac. Sci.* 1993; **14**:13-20.

Scholz J, and Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci.* 2002; 5Suppl:1062–1067.

Scholz J, and Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci.* 2007; **10**:1361-1368.

Seeburg PH. The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 1993; **16**:359-365.

Siniscalco D, de Novellis V, Rossi F, Maione S. Neuropathic pain: is the end of suffering starting in the gene therapy. *Curr Drug Targets.* 2005; **6**: 75-80.

Smith Howard S. Activated Microglia in Nociception. *Pain Physician* 2010; **13**:295-304.

Sommer C. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 2003; **16**:623–628.

Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.* 1997; **200**:401-409.

Trang, T, Beggs S, Salter MW. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain. *Exp Neurol.* 2012; **234**(2):354-61

Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology.* 2008; **70**(18):1630-5.

Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: A big problem from molecules in small glia. *Trends Neurosci.* 2005; **28**:101-107.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, Inoue K. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 2003; **424**:778–783.

Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. Purinergic system, microglia and neuropathic pain. *Curr Op Pharmacol.* 2012;12(1):74-79.

Urban MO, and Smith DJ. Nuclei within the rostral ventromedial medulla mediating morphine antinociception from the periaqueductal gray. *Brain Res.* 1994; **652**:9-16.

Verkhatsky A, Krishtal OA, Burnstock G. Purinoceptors on Neuroglia. *Mol Neurobiol.* 2009; **39**(3):190-208.

Verkhatsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochemistry International* 2010; **57**(4):332-343.

Wall PD, Gutnick M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature* 1974; **248**: 740-743.

Wang W, Wang W, Mei X, Huang J, Wei Y, Wang Y, Wu S, Li Y. Crosstalk between spinal astrocytes and neurons in nerve injury-induced neuropathic pain. *PLoS One* 2009; 4(9), e6973.

Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P; Li P, Xu Q, Liu QS, Goldman Sa, Nedergaard M. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med.* 2004; **10**:821–827.

Watkins LR, and Maier SF. Glia: A novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; **2**:973–985.

Woolf CJ, and Fitzgerald M.. The properties of neurons recorded in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol.* 1983; **221**:313-328.

Woolf CJ, and Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet* 1999; **353**: 1959-1964.

Woolf CJ, and Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000; **288**:1765–1769.

Woolf NJ. Global and serial neurons form A hierarchically arranged interface proposed to underlie memory and cognition. *Neuroscience* 1996; **74**:625-651.

Yashpal K, Pitcher GM, Henry JL. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* 1995; **192**:1357-1358.

Yu Y, Ugawa S, Ueda T, Ishida Y, Inoue K, Kyaw Nyunt A, Umemura A, Mase M, Yamada K, Shimada S. Cellular localization of P2X7 receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res*. 2008; **1194**,45–55.

Zhang H, Yoon SY, Zhang H, Dougherty PM. Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of paclitaxel-induced painful neuropathy. *J Pain*. 2012; **13**(3):293-303.

Zhang XF, Han P, Faltynek CR, Jarvis MF, Shieh CC. Functional expression of P2X7 receptors in non-neuronal cells of rat dorsal root ganglia. *Brain Res*. 2005; **1052**(1):63-70.

Zheng FY, Xiao WH, Bennett GJ. The response of spinal microglia to chemotherapy-evoked painful peripheral neuropathies is distinct from that evoked by traumatic nerve injuries. *Neuroscience*. 2011; **176**:447-454.