



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

“SAPIENZA” UNIVERSITA’ DI ROMA

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer"

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA

XXIV CICLO

***“Ruolo del sistema Bv8/Prochineticine nel dolore da
Granulocyte-Colony Stimulating Factor”***

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Lucia Negri

Candidata:

Dott.ssa Michela Canestrelli

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	pag. 6
Definizione del dolore	pag. 6
Neurobiologia del dolore	pag. 7
La trasmissione del dolore: dai nocicettori periferici al midollo spinale	pag. 7
Le vie ascendenti del dolore	pag. 9
Modulazione discendente del dolore	pag. 10
Le Proteine appartenenti alla famiglia Bv8/Prochineticine	pag. 12
Funzioni delle Proteine della famiglia Bv8/Prochineticine	pag. 15
Bv8/Prochineticine e recettori delle Prochineticine nel dolore infiammatorio	pag. 16
Il Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)	pag. 19
SCOPO DELLA RICERCA	pag. 21
RISULTATI	pag. 24
CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA DI ANTAGONISTI DEI RECETTORI PKRS	pag. 24

UOMO: DOLORE DA GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF)	pag. 28
Effetti indotti dalla somministrazione di G-CSF: dolore, numero di granulociti neutrofili circolanti, livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti e livelli ematici di proteina Bv8/PK2	pag. 28
TOPO: DOLORE DA GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF)	pag. 30
Iperalgesia termica indotta dalla somministrazione locale di basse dosi di G-CSF	pag. 30
Ruolo dei recettori delle prokineticine (PKRs) nello sviluppo della iperalgesia termica da G-CSF	pag. 31
Effetto di PC1 sulla iperalgesia termica da G-CSF	pag. 33
Effetto di basse dosi intraplantari (i.pl.) di G-CSF sul richiamo dei granulociti neutrofili e sui livelli di espressione di Bv8/PK2 nel sito di somministrazione	pag. 35
Ruolo del recettore vanilloide TRPV1 nello sviluppo della iperalgesia termica da G-CSF	pag. 37
La somministrazione di G-CSF a dosi maggiori di 1 µg induce allodinia	pag. 38
Effetto del G-CSF sul numero di leucociti circolanti	pag. 42
Effetto del G-CSF sui livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo di topo	pag. 44

Effetto di PC1 sulla allodinia tattile da G-CSF	pag. 46
Effetto di PC1 sul numero di leucociti circolanti	pag. 48
Effetto di PC1 sull'aumento dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo di topo indotto dal G-CSF	pag. 49
DISCUSSIONE	pag. 51
MATERIALE E METODI	pag. 55
Pazienti	pag. 55
Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)	pag. 56
Valutazione dei livelli ematici di Bv8/PK2 (Test Elisa)	pag. 57
Modelli cellulari e relativa tecnica di coltura	pag. 59
Western Blotting e SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	pag. 59
Animali	pag. 62
Schema sperimentale degli esperimenti	pag. 62
Test per la valutazione del dolore	pag. 62
Test Termici	pag. 63
Test Tattili	pag. 64

Elaborazione dei dati	pag. 64
Misura dell'infiltrazione granulocitaria nella regione plantare delle zampe posteriori del topo: saggio della mieloperossidasi (MPO)	pag. 65
Separazione e Conta dei Leucociti nel sangue di topo	pag. 65
Sostanze	pag. 66
Analisi Statistica	pag. 66
BIBLIOGRAFIA	pag. 67

INTRODUZIONE

Definizione del dolore

Attualmente nessuna definizione di dolore risulta scientificamente completa e le varie definizioni date dai vari enti internazionali preposti alla tutela della salute spesso sono molto dissimili.

Mc Caffrey nel 1980 affermò che “il dolore è in generale qualunque cosa il paziente dice che esso sia ed esiste quando il paziente dice che esiste”, questo per sottolineare il fatto di come il paziente sia l’unico conoscitore veramente esperto del proprio dolore.

Ad oggi, comunque, è pressoché universalmente accettata la definizione data dalla International Association for the Study of Pain (IASP) secondo la quale, il dolore è "*un’esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno*" (Merskey H 1979; Merskey & Bogduk 1994).

Il dolore non può essere descritto esclusivamente come un fenomeno sensoriale, bensì deve essere visto come la risultante 1) di una parte percettiva (definita *nocicezione*), che costituisce l’aspetto neurobiologico del dolore, e prevede la modalità sensoriale che permette la ricezione ed il trasporto al sistema nervoso centrale di stimoli potenzialmente lesivi per l’organismo, e 2) di una parte esperienziale (quindi del tutto privata, la vera e propria esperienza del dolore), che è lo stato psichico collegato alla percezione di una sensazione spiacevole. Nell'uomo l’esperienza del dolore è perciò determinata anche dalla dimensione affettiva e cognitiva, dalle esperienze passate, dalla struttura psichica e da fattori socioculturali.

Il dolore rappresenta spesso una funzione utile per l’organismo, purché non vengano oltrepassati i limiti al di là dei quali esso diviene un’aggravante della malattia; infatti il fine biologico del dolore è quello di intervenire immediatamente in difesa dell’organismo, avvisando la coscienza di uno stimolo lesivo che sta danneggiando una parte di esso. Il dolore, quindi, è fisiologico, un sintomo vitale/esistenziale, un sistema di difesa, quando rappresenta un segnale d’allarme per una lesione tissutale, essenziale per evitare un danno. Diventa patologico quando si automantiene, perdendo il significato iniziale e diventando a sua volta una malattia (sindrome dolorosa) (Mannion & Woolf, 2000).

Neurobiologia del dolore

La trasmissione del dolore: dai nocicettori periferici al midollo spinale

Il dolore, come ogni esperienza, risulta da una specifica attività neurologica, spazio-temporale, all'interno della corteccia cerebrale. Tuttavia il dolore è iniziato dall'attivazione di organi sensoriali periferici, i nocicettori, deputati alla rilevazione degli stimoli nocivi. La stimolazione dei nocicettori dopo danno tissutale o infiammazione avviene per rilascio di mediatori chimici che agiscono sia direttamente via canali ionici ligando-dipendenti sia via recettori metabotropici, collegati ai secondi messaggeri, nell'attivare e/o sensitizzare i nocicettori. Molti di questi recettori sono recettori accoppiati ad una proteina G (GPCRs) (Hepler J.R et al., 1992; Cabrera-Vera, T.M., et al. 2003), che trasmettono il segnale attraverso il rilascio di un secondo messaggero: adenosin monofosfato ciclica (cAMP), guanosina monofosfato ciclica (cGMP) diacilglicerolo e fosfolipasi C, accoppiate sul versante citoplasmatico con la proteina chinasi (PKA e diversi isotipi di PKC). A loro volta queste chinasi fosforilano proteine cellulari specifiche, inclusi i canali ionici di membrana voltaggio-dipendenti (Nav 1.8) e ligando-dipendenti (TRPV1). Tra i canali ionici, uno dei più importanti, è il recettore vanilloide TRPV1, un canale cationico non selettivo attivato dal principio attivo del peperoncino, capsaicina (Jung et al., 1999), dall'endocannabinoide anandamide, dalla resiniferatossina (RTX) derivato del lattice di una pianta simile al cactus (*Euphorbia resinifera*), dal calore ($46 < T < 50^{\circ}\text{C}$) (Caterina et al., 1997) e dai protoni (Jordt et al., 2000), che sembra avere un ruolo preminente nell'eccitabilità dei nervi periferici.

I nocicettori sono ampiamente distribuiti in tutto il corpo (pelle, muscoli, articolazioni, viscere e meningi, ossa a livello del periostio, muscoli) e comprendono sia le fibre A δ mielinizzate, di medio diametro, sia le fibre C di piccolo diametro non mielinizzate a lenta conduttanza. Il maggior numero di sottoclassi di nocicettori è rappresentato dai recettori polimodali delle fibre C ovvero da recettori che rispondono ad una varietà di stimoli di natura fisica (caldo, freddo, pressione) e chimica.

A differenza dei recettori somatici, i nocicettori esistono come terminazioni nervose libere e sono costituiti dalle terminazioni periferiche di neuroni afferenti (o sensitivi) primari, che formano i nervi afferenti primari, i cui corpi cellulari sono situati nei gangli delle radici dorsali (Dorsal Root Ganglion, DRG), e nel ganglio di Gasser annesso al nervo trigemino. Le fibre afferenti nocicettive terminano nella sostanza grigia del corno dorsale del midollo spinale.

A livello del midollo spinale, le fibre A δ e C convogliano le informazioni a specifiche aree nocicettive all'interno delle lamine superficiali I e II delle corna dorsali oltre che ai neuroni ad ampio spettro dinamico nella lamina V, i quali codificano informazioni relative a stimoli innocui e nocivi. Di contro, le grandi fibre mielinizzate A β (fibre propriocettive non coinvolte nella nocicezione)

trasmettono stimoli di bassa intensità come il tocco od una innocua pressione alle più profonde lamine III e IV.

I terminali afferenti primari, nella compagine del midollo spinale, comunicano con i neuroni di secondo ordine, mediante sinapsi. La trasmissione eccitatoria sinaptica fra nocicettori e neuroni di secondo ordine del corno dorsale è mediata dal rilascio di glutammato. Le fibre afferenti nocicettive co-rilasciano anche peptidi neuromodulatori quali la sostanza P e il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP). Nell'insieme il rilascio di questi neurotrasmettitori crea una corrente cumulativa depolarizzante a livello post-sinaptico che viene ulteriormente rafforzata dall'attivazione del recettore glutammatergico N-Methyl-D-Aspartato (NMDA) (Malberg A.B et al., 1992) mediata dalla rimozione degli ioni magnesio (Mg^{2+}) che hanno funzione di bloccanti del recettore stesso. L'effetto netto di questi processi multipli nei neuroni di trasmissione nocicettiva del corno dorsale, è un rapido incremento nella scarica del potenziale d'azione e nella responsività dei neuroni: questo fenomeno è noto come *windup* (Mendell., 1966). Inoltre, in risposta a stimolazioni nocive, sono state rivelate anche modificazioni plastiche. Queste modificazioni sono rappresentate dalla espansione del campo di ricezione del neurone e dalla insorgenza di sensibilità verso stimoli non nocivi. Come risultato si ha "sensitizzazione centrale" che è caratterizzata dalla persistenza della sensazione dolorosa anche dopo la cessazione dello stimolo algico poiché a livello dei neuroni delle corna dorsali si possono verificare modificazioni trascrizionali come l'attivazione della cascata MAPK/pCREB (CRE binding) che media l'espressione del proto-oncogene c-fos, che sembra essere un marker dei cambiamenti funzionali prolungati (Hunt SP et al., 1987).

Ai processi eccitatori, poco sopra menzionati, va aggiunta la modulazione inibitoria presente all'interno delle corna dorsali che può essere mediata da: inputs non-nocivi periferici, inibizione locale esercitata da interneuroni GABAergici e glicinerfici, proiezioni discendenti bulbo-spinali e funzioni cerebrali di più alto livello (distrazione, input cognitivi, ecc.) (Moore AK et al., 2002).

Le vie ascendenti del dolore

Dal midollo spinale gli stimoli nocivi vengono convogliati ai centri cerebrali superiori prosencefalo, mesencefalo e corteccia, mediante le vie ascendenti di trasmissione del dolore, di cui si distinguono cinque tipi:

- ✓ **TRATTO SPINO-TALAMICO.** È la principale via di trasmissione degli input nocivi. Il tratto spino-talamico, da un punto di vista sia filontogenetico che funzionale, è suddiviso in un fascio paleo-spino-talamico (deputato alla trasmissione del dolore lento) ed in un fascio neo-spino-talamico (per la trasmissione del dolore rapido), e nel complesso, è costituito da neuroni nocicettivi che terminano a livello talamico. I nuclei talamici principali che, nell'uomo, ricevono le terminazioni spinotalamiche sono il nucleo ventro-posterolaterale ed i nuclei intralaminari.
- ✓ **TRATTO SPINO-RETICOLARE.** È costituito da fibre che decorrono nella zona anterolaterale del midollo e si proiettano nei nuclei laterali del sistema reticolare. Le sue proiezioni sono a livello del nucleo gigantocellulare, del reticolo laterale e del rafe magno. Sebbene il tratto spino-reticolare non sia una via di trasmissione cruciale degli input nocivi, si ritiene che le proiezioni discendenti della formazione reticolare e dei nuclei del rafe ad essa correlati abbiano un controllo inibitorio sulle informazioni nocicettive in entrata e quindi abbiano parte nei sistemi endogeni di analgesia.
- ✓ **TRATTO SPINO-CERVICALE.** Molti neuroni delle lamine III e IV rispondono per lo più a stimoli tattili e solo pochi a stimoli nocivi. Esso termina nel nucleo talamico cervicale laterale. Il tratto spino-cervicale è scarsamente rappresentato nell'uomo.
- ✓ **VIA GRACILE-BULBARE.** Tale via prende origine dai neuroni delle lamine III e IV che proiettano ai nuclei della colonna dorsale.
- ✓ **TRATTO SPINO-MESENFALICO.** I neuroni nocicettivi delle lamine I e V proiettano alla formazione reticolare del mesencefalo (parte laterale della sostanza grigia periacqueduttale), che ha connessioni reciproche con il sistema limbico attraverso l'ipotalamo.

Modulazione discendente del dolore

La percezione finale del dolore non è la semplice conseguenza di uno stimolo doloroso applicato in periferia che attraverso le vie afferenti di trasmissione arriva ai centri superiori e viene percepito, ma è l'interazione di due sistemi: quello di trasmissione nocicettivo e quello di modulazione anti-nocicettiva. Un dolore è sintomatico nel momento in cui c'è uno squilibrio tra questi due sistemi, per cui c'è una prevalenza delle vie nocicettive sulla inibizione anti-nocicettiva (Fields HL et al., 1999).

La funzione inibitoria può essere attivata: a livello delle corna dorsali del midollo spinale, tramite controllo degli input dolorosi che risalgono lungo le vie ascendenti; a livello corticale, tramite l'attivazione di specifiche strutture (amigdala, ipotalamo); attraverso stimolazione della sostanza grigia periventricolare, della sostanza periacqueduttale (PAG) e del sistema reticolare bulbare (nucleo rostro-ventrale). Del sistema di modulazione inibitorio spinale fanno parte il sistema oppiaceo e le vie inibitorie discendenti.

Il sistema oppiaceo endogeno presenta una distribuzione anatomica diversa in base alla classe di oppioidi che lo costituisce (enkefaline, β -endorfine e dinorfine), ma in generale è presente nei siti cruciali dove si svolge il processo di modulazione dello stimolo nocivo (Fields HL et al., 2004). Le cellule che contengono enkefaline e dinorfine si trovano al livello della PAG, della parte rostro-ventrale del midollo allungato (RVM) e del corno posteriore del midollo spinale (laminae I e II). Al contrario, le β -endorfine sono contenute prevalentemente a livello di ipotalamo, nei neuroni che inviano proiezioni alla PAG ed ai neuroni noradrenergici del tronco (Westlund KN et al., 1983).

Il controllo sovraspinale sulla trasmissione degli stimoli nocivi è il risultato dell'interazione del sistema oppiaceo e delle vie discendenti monoaminergiche inibitorie. Le vie inibitorie discendenti (serotoninergiche e noradrenergiche) sono formate dagli assoni dei neuroni che si trovano in zona periacqueduttale e periventricolare, oltre ai neuroni della sostanza grigia rostroventrale, a livello dei nuclei del rafe magno e reticolare paragigantocellulare. Tali assoni terminano nelle laminae I, II e V del corno posteriore del midollo spinale. Nelle stesse aree d'origine delle fibre delle vie inibitorie discendenti, si ritrovano pure le cellule che contengono gli oppioidi endogeni (enkefaline e dinorfine).

Studi sperimentali condotti su animali hanno dimostrato che si produce analgesia tramite: stimolazione elettrica delle zone periacqueduttali; applicazione, nella stessa sede, di morfina; applicazione di serotonina o di noradrenalina a livello del midollo spinale. Da questi risultati sperimentali si ipotizza che il sistema endogeno oppiaceo agisca attraverso un processo disinibitorio sul sistema monoaminergico. Gli oppiacei sopprimerebbero l'azione di interneuroni che rilasciano, in condizioni di riposo, acido γ -aminobutirrico (GABA), inibendo l'azione delle fibre discendenti.

L'azione di modulazione e controllo del dolore da parte del sistema oppiaceo avverrebbe anche attraverso altri meccanismi a livello di midollo spinale (lamine I e II). Gli interneuroni contenenti encefaline inibirebbero la trasmissione nocicettiva delle fibre afferenti con un'azione inibitoria esplicata sia a livello pre- che post-sinaptico. Le fibre discendenti che rilasciano la serotonina attiverebbero gli interneuroni locali, che contengono le encefaline, oltre ad inibire direttamente l'attività dei neuroni di proiezione.

I circuiti di modulazione del dolore, oltre ad inibire la trasmissione nocicettiva sono in grado anche di facilitarla e sembra che tali circuiti siano costituiti da neuroni differenti (Fields 1995). E' stato dimostrato, infatti che, nel RVM esistono due classi distinte di neuroni di modulazione che hanno effetti opposti sulla nocicezione: le cellule-on, che facilitano la trasmissione dell'informazione nocicettiva, e le cellule-off che la inibiscono. La somiglianza nelle caratteristiche di risposta presente tra i membri di ciascuna classe neuronale, i loro campi recettivi somatici estremamente ampi, e la grande distribuzione degli assoni di ciascun neurone in segmenti spinali multipli indicano che questi neuroni esercitano un'influenza globale sui processi che vengono messi in atto in risposta ad uno stimolo doloroso. Uno stimolo nocivo attiva, quindi, dei circuiti neurali multipli, alcuni con effetti antinocicettivi ed altri con effetti pronocicettivi; se la risposta a tale stimolo sarà poi aumentata o soppressa dipenderà dalla localizzazione dello stimolo, dalla sua durata, dalla situazione ambientale in cui lo stimolo viene applicato e dallo stato comportamentale del soggetto (Watkins et al. 1982).

Le Proteine appartenenti alla famiglia Bv8/Prochineticine

La sensibilizzazione dei nocicettori dopo danno tissutale associato a infezione o infiammazione, avviene per rilascio di sostanze chimiche dai terminali centrali (spinali) e periferici, che agiscono da mediatori dello stimolo nocicettivo.

Recentemente il gruppo di ricerca di cui faccio parte ha identificato una nuova famiglia di proteine, che inducono sensibilizzazione nocicettiva negli animali di laboratorio e che sono sovra-esprese in malattie infiammatorie e in alcuni tumori (Negri et al., 2007; Shojaei et al., 2007). Si tratta di piccole proteine, identificate come Bv8/Prochineticine (PKs).

Bv8 è una piccola proteina isolata dalla secrezione cutanea della rana *Bombina variegata* che induce contrazione dell'ileo di cavia a concentrazioni nanomolari (Mollay et al., 1999). Questa proteina che contiene 77 aminoacidi ed ha un peso molecolare di circa 8 kDa, è stata chiamata Bv8 ad indicarne la sua origine ed il suo peso molecolare.

Bv8 appartiene a una nuova famiglia di proteine di secrezione, altamente conservate lungo la scala evolutiva, dagli Invertebrati all'Uomo. Il primo membro di questa famiglia ad essere stato identificato è il costituente non tossico del veleno del serpente Mamba nero (*Dendroasies polylepis polylepis*), chiamato "Venom Protein A" (VPRA). Nel 1990, Schweitz e colleghi descrissero la capacità del Venom Protein A di indurre la contrazione dell'ileo di cavia a concentrazioni nanomolari, proponendo per il peptide il nome alternativo di Mamba Intestinal Toxin 1 (MIT-1) (Joubert and Strydom, 1980). L'elevata omologia di sequenza (58%) tra Bv8 e MIT-1, suggerì che peptidi analoghi potessero essere presenti anche nei Mammiferi. Questa ipotesi fu confermata dal clonaggio di cDNA per due ortologhi di Bv8, chiamati "murine Bv8" (mBv8) e "human Bv8" (hBv8) (Wechselberger et al., 1999). Nel 2001, Li e colleghi, identificarono le sequenze codificanti per due proteine umane analoghe a Bv8, che furono chiamate prochineticina 1 (PK1) e prochineticina 2 (PK2), in riferimento alla loro capacità di contrarre l'ileo di cavia, similmente come già descritto per Bv8 e per MIT-1. Nello stesso anno LeCouter e colleghi, analizzando una libreria di proteine secretive umane, identificarono una proteina in grado di indurre migrazione, proliferazione e fenestrazione in cellule endoteliali di ghiandole steroidogeniche (ovaio, testicolo, corticale del surrene). Questa proteina corrispondente a PK1 venne chiamata "endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor" (EG-VEGF) poichè i suoi effetti erano simili a quelli indotti da VEGF (LeCouter et al., 2001). Nel 2002, Masuda e colleghi purificarono dal latte di bovino un peptide corrispondente a EG-VEGF/PK1. Gli ultimi due membri appartenenti a questa famiglia di proteine furono identificati e purificati dalla secrezione cutanea della rana *Bombina maxima* e chiamati Bv8-like protein 1 e 2 (Bv8-LP1 e Bv8-LP2) (Lai et al., 2003).

Le proteine della famiglia Bv8/PKs sono costituite da 80-90 aminoacidi e condividono un'elevata omologia nella sequenza aminoacidica; presentano inoltre due caratteristiche strutturali peculiari:

-un segmento N-terminale AVITGA (alanina, valina, isoleucina, treonina, glicina, alanina) altamente conservato lungo la scala evolutiva, essenziale per il legame recettoriale e per le attività farmacologiche. I membri della famiglia AVITGA interagiscono con i recettori orientando la regione della proteina compresa tra la sequenza AVITGA e il residuo conservato di triptofano in posizione 24 (Trp24) (Negri et al., 2005; Bullock et al., 2004; Miele et al., 2010).

-una identica distribuzione di dieci residui di cisteina che formano cinque ponti disolfuro e che conferiscono alla molecola una conformazione tridimensionale compatta ed una elevata resistenza alla degradazione enzimatica.

La maggiore differenza nella sequenza amminoacidica di questa famiglia proteica si ha nella porzione C-terminale (Kaser et al., 2003).

Nell'uomo e nel topo i geni che codificano per PK1 e PK2 sono costituiti da tre esoni (Jilek et al., 2000), ma la sequenza genica di PK2 ha un esone aggiuntivo, la cui inserzione o delezione, per splicing alternativo, produce due varianti proteiche (Wechselberger., 1999):

-una forma corta, costituita di 81 aminoacidi, il cui prodotto proteico è la PK2;

-una forma lunga contenente 20 aminoacidi addizionali rispetto la forma corta, in prevalenza basici, posizionati tra il residuo 47 di Lys (Lisina) e il residuo 48 di Val (Valina), la cui funzione non è stata ancora definita, ma che potrebbe rappresentare il sito bersaglio degli enzimi proteolitici convertasi.

Il gene di PK2 è localizzato sul cromosoma 6 murino e sul cromosoma 3p21.1 umano (Jilek et al., 2000); il gene di PK1 è localizzato sul cromosoma 3 murino e 1p21.1 umano (LeCouter et al., 2003).

Le proteine appartenenti alla famiglia di Bv8/PKs sono i ligandi di due recettori metabotropici a 7-TM (7-segmenti transmembrana), chiamati recettore 1 e 2 delle prokineticine, PKR1 e PKR2 (Masuda et al., 2002; Soga et al., 2002). Questi due recettori hanno un'omologia nella sequenza aminoacidica pari all'85% e sono molto divergenti nella loro sequenza N-terminale (Masuda et al., 2002).

Studi di Northern Blot, Real Time PCR e ibridazione *in situ*, effettuati su uomo, topo e ratto, hanno permesso di determinare la localizzazione e la distribuzione tissutale delle proteine appartenenti alla famiglia Bv8/PKs.

Gli mRNA di PK1 e PK2 sono espressi nel cervello, nel midollo spinale, nei gangli delle radici dorsali (DRG), nel tratto gastrointestinale e a livello delle ghiandole endocrine di uomo, topo e ratto (LeCourter et al., 2001; Li et al., 2001; Melchiorri et al., 2001; Masuda et al., 2002; Negri et al., 2004). Nel cervello del ratto neonato e adulto gli mRNA di PK1 e PK2 sono espressi principalmente a livello del bulbo olfattorio e del nucleo soprachiasmatico (SCN). Oltre che nel

cervello, l'espressione di PK2 è visibile anche nei granulociti neutrofili, nei testicoli, negli organi linfoidi e in cellule dendritiche. PKR1 è espresso in molti organi periferici come nella pelle, nei leucociti, nella prostata, nel pancreas, nella milza, nello stomaco, nel piccolo intestino, nel colon (Soga et al., 2002; Masuda et al., 2002), mentre PKR2 è più confinato a livello centrale (bulbi olfattivi, nucleo talamico paraventricolare e nucleo parateniale, nucleo soprachiasmatico) ma anche in molte ghiandole endocrine, come la tiroide, i testicoli e le ovaie (Cheng et al., 2002).

PKR1 presenta alti livelli di espressione nei neuroni di piccolo calibro (area < 600 μm^2) mentre PKR2 è maggiormente espresso a livello dei neuroni di medio (600 μm^2 < area < 1400 μm^2) e grosso calibro (area > 1400 μm^2); tale distribuzione suggerisce il coinvolgimento delle prokineticine nella trasmissione di stimoli nocivi. PKR1 e PKR2 sono coespressi con il recettore vanilloide TRPV1 (Negri et al., 2006).

Funzioni delle proteine della famiglia Bv8/Prochineticine

Le proteine appartenenti alla famiglia Bv8/PKs mostrano diverse attività biologiche. Come già accennato, tutte queste proteine inducono la contrazione della muscolatura liscia dell'ileo di cavia a concentrazioni nanomolari (Mollay et al., 1999).

L'aggiunta di piccole concentrazioni di Bv8 nel terreno di coltura per cellule granulari cerebellari, induce un aumento della capacità di sopravvivenza e una riduzione del rischio di apoptosi. Bv8 quindi, agisce come fattore neurotrofico endogeno e coopera alla sopravvivenza neuronale mediante l'attivazione della cascata "Mitogen-activated protein kinase/Phosphatidylinositol 3-kinase" (MAPK/PI3-K) (Melchiorri et al., 2001).

Inoltre è stato anche dimostrato che PK1 promuove angiogenesi tramite stimolazione, proliferazione, migrazione e fenestrazione delle cellule endoteliali degli organi stereoidogenici (LeCourter et al., 2003).

Nel 2002 Cheng e colleghi, hanno dimostrato che l'espressione di PK2 nel nucleo soprachiasmatico di topo, contribuisce alla regolazione del ritmo circadiano, con picchi di espressione 50 volte più alti nella fase diurna rispetto alla fase notturna (Li J.D et al., 2006).

L'iniezione di Bv8 nei ventricoli laterali del cervello di ratto (da 6.5 a 60 pmol) ne modula il comportamento ingestivo: riduce in maniera dose-dipendente l'ingestione di cibo (effetto anoressizzante) e stimola la sete (effetto dipsogeno) (Negri et al., 2004). Nel 2001 il laboratorio di ricerca in cui ho svolto il Dottorato ha dimostrato che Bv8 stimola la secrezione degli ormoni ipotalamici, quali ossitocina, vasopressina e corticosterone (Lattanzi et al., 2001).

Inoltre è stato anche dimostrato che Bv8 e le prochineticine partecipano ai processi infiammatori, producendo chemiotassi e rilascio di citochine infiammatorie (Franchi et al., 2008; Martucci et al., 2007), formazione e fenestrazione dei vasi (LeCouter et al., 2003).

Bv8/PK2 e i recettori PKRs sono coinvolti nella regolazione della soglia nocicettiva (Negri et al., 2002; Negri et al., 2004; Negri et al., 2005; Negri et al., 2006; Negri et al., 2007).

Bv8/Prochineticine e recettori delle Prochineticine nel dolore infiammatorio

La distribuzione di PKRs nelle fibre sensitive, nei DRG e nelle corna dorsali del midollo spinale, spiega il ruolo del sistema Bv8/PKs nella regolazione della soglia nocicettiva (Negri et al., 2002; Negri et al., 2004; Negri et al., 2005; Negri et al., 2006; Negri et al., 2007).

La somministrazione di Bv8 anfibio o l'effetto di Bv8 mammifero, ovvero della prochineticina endogena PK2, è di determinare un abbassamento della soglia nocicettiva a stimoli nocivi termici e meccanici (effetto iperalgesico). La somministrazione sistemica di Bv8 produce un'iperalgesia intensa e dal tipico andamento bifasico: un primo picco di iperalgesia si verifica a 60 minuti, seguito da un secondo picco dopo circa 300 minuti dall'iniezione. La somministrazione locale di molto piccole dosi di Bv8 (50 fmol) induce una rapida e intensa iperalgesia meccanica e termica monofasica, solo nella zampa iniettata, molto simile alla prima fase dell'iperalgesia indotta dalla somministrazione sistemica di Bv8 (Negri et al., 2002). La prima fase di iperalgesia dipende dall'azione delle prochineticine sui recettori presenti in periferia (soprattutto PKR1), mentre la seconda è dovuta ad una sensitizzazione centrale.

Il meccanismo molecolare dell'iperalgesia indotta da Bv8 è stato studiato in colture primarie di DRG (Vellani et al., 2006). I neuroni che rispondono a Bv8 sono prevalentemente quelli di piccolo e medio calibro, nei quali è maggiormente presente il recettore PKR1 (Negri et al., 2006). Il 90% dei neuroni che risponde a Bv8, risponde anche alla capsaicina e circa il 70% all'olio di mostarda. Questi risultati dimostrano una co-localizzazione dei recettori funzionali PKRs con il recettore dei vanilloidi TRPV1 e TRPA1; in aggiunta, metà dei neuroni che rispondono a Bv8 esprimono e rilasciano anche neuromediatori, come CGRP e sostanza P, considerati marcatori neurochimici della trasmissione del dolore (Vellani et al., 2006).

L'attivazione dei recettori PKR1 e PKR2, accoppiati a proteine G_q , causa l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), la quale idrolizza l'inositolo 4,5-bisfosfato (PIP2, un fosfolipide di membrana) in inositolo trifosfato (IP3) e in diacilglicerolo (DAG), e induce la mobilizzazione del Ca^{++} intracellulare da parte del Reticolo Endoplasmatico (ER). L'idrolisi di PIP2 rimuove il blocco dei canali TRPV1, che sono tonicamente bloccati dal PIP2, permettendo l'ingresso di Na^+ e la depolarizzazione del neurone. In aggiunta, Bv8 causa la traslocazione della PKC- ϵ sulla membrana plasmatica dei nocicettori che media la sensibilizzazione del recettore dei vanilloidi TRPV1 attraverso la fosforilazione di due residui di serina del canale. Topi mancanti dell'uno o dell'altro dei due recettori delle prochineticine sono meno sensibili dei topi wild-type (WT) a stimoli nocivi caldi e freddi, ai protoni e alla capsaicina, tutti stimoli che agiscono attraverso il canale cationico TRPV1 e TRPA1 (Negri et al., 2006). Tra questi topi, solo i topi PKR2-KO sono significativamente meno

sensibili all'allodinia tattile indotta da Bv8 e all'iperalgisia termica indotta dall'olio di mostarda. I risultati sono in accordo con la distribuzione di PKR2 soprattutto nel SNC e con la co-localizzazione e la probabile cooperatività dei recettori PKR2 e TRPA1 sui neuroni di medio e largo diametro (Lattanzi et al., in preparation).

L'espressione di Bv8/PK2 e la presenza dei recettori PKR1 e PKR2 nei granulociti neutrofili, nei monociti-macrofagi, nei linfociti, nelle cellule dendritiche, ha fatto ipotizzare un probabile ruolo di queste proteine nella risposta immunitaria. E' stato dimostrato che PK1 e PK2 in vitro stimolano la migrazione dei monociti e dei macrofagi murini in maniera dose-dipendente (10nM-40nM-160nM) (LeCouter et al., 2004; Martucci et al., 2007). La proteina Bv8/PK2 agisce sui macrofagi, inducendoli ad acquisire un fenotipo di tipo pro-infiammatorio, infatti stimola la produzione macrofagica delle citochine proinfiammatorie IL-1 e IL-12, ed inibisce il rilascio della citochina anti-infiammatoria IL-10 (Torres G., et al., 2001; Martucci et al., 2007).

Come già accennato, la proteina Bv8/PK2 è costitutivamente espressa in cellule del sangue periferico di origine mieloide come monociti-macrofagi e granulociti neutrofili e negli organi ematopoietici. Negli stessi organi e tipi cellulari l'espressione di Bv8/PK2 viene fortemente up-regolata nei processi patologici e infiammatori come accade nel modello animale di dolore infiammatorio indotto dalla somministrazione intraplantare (i.pl.) di Adjuvante Completo di Freund (CFA). L'infiammazione indotta dal CFA, determina una forte up-regolazione di Bv8/PK2 nel tessuto infiammato di ratto o di topo, che correla temporalmente con la riduzione della soglia nocicettiva. L'analisi dell'espressione genica su granulociti neutrofili e macrofagi isolati dalle cellule infiltranti il tessuto infiammato ha dimostrato che, i granulociti neutrofili, sono il sottotipo cellulare responsabile della up-regolazione di PK2 indotta dal CFA. Inoltre gli elevati livelli di espressione di PK2 trovati anche nei granulociti neutrofili isolati dalla milza di topi infiammati indicano che la risposta infiammatoria evocata dal CFA induce l'attivazione del gene di PK2 anche in cellule polimorfonucleate (PMN) circolanti. Per confermare l'ipotesi che la PK2, rilasciata dai granulociti neutrofili, moduli direttamente il dolore infiammatorio, è stata purificata la proteina PK2 da un pool di granulociti neutrofili peritoneali di ratto, dopo infiammazione con glicogeno d'ostrea. La proteina estratta, come Bv8, mostra un'alta affinità per i recettori PKRs, soprattutto PKR1 e, quando viene iniettata nei ratti, induce una forte ipersensibilità a stimoli nocivi (Giannini et al., 2009).

Dall'analisi dell'espressione genica risulta che soltanto il trascritto di PKR1 è up-regolato a 24 h dal CFA principalmente nei macrofagi, mentre restano inalterati i livelli dei trascritti di PK1 e PKR2 (Giannini et al., 2009).

Nei topi PKR1-KO e PKR2-KO l'iperalgisia indotta dal CFA risulta notevolmente ridotta rispetto ai topi WT. La mancanza del gene *pkr1* riduce significativamente la up-regolazione di Bv8/PK2 indotta dall'inflammazione, mentre nei topi PKR2-KO i livelli di espressione di Bv8/PK2 risultano paragonabili ai livelli di Bv8/PK2 nelle zampe infiammate dei topi WT.

Possiamo quindi ipotizzare che entrambi i recettori siano responsabili del dolore infiammatorio, ma che soltanto il recettore PKR1 sia implicato nella sovraespressione di Bv8/PK2 (Giannini et al., 2009).

Tale aumento potrebbe essere determinato da un incremento dei livelli plasmatici di Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) (Shojaei et al., 2007; Giannini et al., 2009).

Il Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)

Il G-CSF è un fattore di crescita emopoietico linea-specifico, prodotto da linfociti T, monociti, fibroblasti e cellule endoteliali del midollo osseo, che agisce sia a livello midollare sui precursori staminali totipotenti inducendone la differenziazione nella linea neutrofili-granulociti sia a livello periferico sui neutrofili maturi, potenziandone le capacità citotossiche, di fagocitosi e aumentando l'espressione di molecole di adesione (Metcalf., 1993; Welte et al., 1985; Demetri et al., 1991; Bober et al., 1995).

Il recettore per il G-CSF (G-CSFR) è un membro della superfamiglia dei recettori citochinici di tipo I (Fukunaga R et al., 1990; Tian SS et al., 1994); da un punto di vista strutturale, è un eterodimero costituito di una subunità- α , preposta al legame del ligando G-CSF, e di una subunità- β , responsabile della trasduzione del segnale. Il recettore G-CSFR è espresso sulla superficie delle cellule staminali totipotenti, dei progenitori mieloidi dei neutrofili, dei neutrofili maturi e sulla superficie di cellule non ematopoietiche (cellule endoteliali) (Nicola, N.A et al., 1985; Tsuji k et al., 2001; Morikawa K et al., 2002). La funzione di G-CSF e del suo recettore sulle cellule endoteliali è sconosciuta. Nel 2009, Schweizorf e colleghi, hanno dimostrato la localizzazione funzionale del recettore G-CSFR nelle colture di DRG, dove l'attivazione del sistema G-CSF/G-CSFR provoca la sensitizzazione del recettore TRPV1 e la up-regolazione trascrizionale del gene *trpv1*.

Gli effetti biologici indotti dal G-CSF sono mediati dalla formazione del complesso tetramericamente attivo formato da due molecole di recettore e due di ligando, che a sua volta, innesca differenti cascate di trasduzione del segnale (Janus-kinase/ Signal transduction and activator of transcription JAK/STAT, PI-3K/AKT, p21Ras/MAPK), coinvolte nella regolazione della granulopoiesi in condizioni fisiologiche e/o patologiche (De Koning et al., 2000; JP McLemore ML et al., 2001; Zhu QS et al., 2006; Stösser S et al., 2010).

In condizioni fisiologiche, i livelli plasmatici di G-CSF sono molto bassi; tali livelli aumentano drasticamente in corso di infezioni o infiammazione, in seguito alla produzione di fattori immunogeni (Lipo-polisaccaride LPS, Tumor Necrosis Factor- α TNF- α , Interleuchina-1 IL-1, Interferon- γ IFN- γ) (Bobrowski WF et al., 2005).

L'aumento dei livelli plasmatici di G-CSF determina, almeno, un duplice effetto:

- modulazione della granulopoiesi mediante incremento dell'emivita dei granulociti neutrofili circolanti (Kawakami M et al., 1990; Zhang Y et al., 2009). In letteratura diverse evidenze suggeriscono che la disregolazione della apoptosi dei granulociti neutrofili giochi un ruolo chiave nell'espansione/riduzione del pool periferico sia in condizioni patologiche che fisiologiche. Anche se i meccanismi biologici che regolano la apoptosi dei granulociti neutrofili circolanti non sono ancora completamente chiariti (Akgul C. et al., 2001), è noto

che il G-CSF interviene nel meccanismo di morte cellulare programmata a carico dei granulociti neutrofilici circolanti mediante up-regolazione di signaling pathways anti-apoptotici (Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT, PI3K/AKT) e blocco di signaling pathways pro-apoptotici (Bid/Bax) (Hyun Kyung K et al., 2006; Luo HR et al., 2008).

È doveroso ricordare che, come il G-CSF, altri fattori di crescita (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, GM-CSF), glucocorticoidi e agenti chemioterapici, possono accelerare o sopprimere tale processo di morte cellulare programmata. Gli agenti chemioterapici, infatti, agiscono sulle cellule neoplastiche principalmente inducendo apoptosi: la mancanza di selettività citotossica di questi farmaci esita in effetti collaterali talora anche gravi, come ad esempio la mielosoppressione che si manifesta con leucopenia (riduzione del numero dei leucociti circolanti al di sotto del limite inferiore di $4 \times 10^3/\mu\text{l}$) e neutropenia (riduzione del numero dei neutrofilici circolanti al di sotto del limite inferiore di $18 \times 10^3/\mu\text{l}$), spesso associate ad infezioni, quindi maggiore morbilità e mortalità, che il solo trattamento antibiotico e/o antimicotico non riesce a controllare (Chucklovin A et al., 2000). In questo caso per contrastare la neutropenia e le infezioni ad essa associate, si interviene somministrando fattori di crescita che siano in grado di promuovere la sopravvivenza dei granulociti neutrofilici circolanti: per questo motivo, il fattore granulocitario G-CSF, è tra quelli clinicamente più rilevanti ed ampiamente utilizzati nel trattamento della neutropenia chemioterapia-dipendente (Morstyn G. et al., 1996).

Sebbene la terapia con G-CSF sia ben tollerata dai pazienti, lo sviluppo di dolore muscolo-scheletrico è il limite maggiore alla sua applicazione (Johnston E., et al., 2000; Mense S and Simons DG., 2001; Holmes F.A. et al., 2002; Green M., et al., 2003; Carvalho TT et al., 2011);

- induzione dell'espressione di Bv8/PK2: il fattore granulocitario G-CSF tra tutte le citochine (Stromal cell derived factor-1 α Sdf1 α , Interleuchina-6 IL-6, Interleuchina-10 IL-10, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor GM-CSF) è il principale regolatore positivo dell'espressione di Bv8/PK2 nei granulociti neutrofilici circolanti CD11b+Gr1+ derivati dal midollo osseo che presentano i marcatori di superficie CD11b and Gr-1 e infiltranti il tessuto infiammato (Shojaei et al., 2007; Giannini et al 2009; Zhong C et al., 2009).

SCOPO DELLA RICERCA

Il sistema Bv8/Prochineticine gioca un ruolo determinante nel dolore di tipo infiammatorio rappresentando, quindi, un importante bersaglio per lo sviluppo di farmaci analgesici e antinfiammatori innovativi.

Il primo passo nella ricerca delle molecole antagoniste per i recettori PKRs è stato l'identificazione dei determinanti strutturali richiesti per il legame al recettore e per l'attività iperalgesia di Bv8.

I membri della famiglia AVITGA si legano ai recettori PKR1/PKR2 orientando la regione della proteina compresa tra la sequenza AVITGA e il residuo conservato di triptofano in posizione 24 (W24) (Miele et al., 2010). Analisi computerizzate di docking molecolare hanno suggerito che modifiche nella struttura primaria di Bv8 in alcune posizioni amminoacidiche, dalla 6 alla 40, potrebbero produrre molecole con una affinità alterata e/o un'efficacia differente nell'attivazione dei recettori PKRs. La prima molecola ottenuta è stato un derivato peptidico di Bv8 che manca di due (*des-Ala-Val-Bv8*) residui all'N-terminale della molecola (Negri et al., 2005). Esperimenti *in vivo*, nei topi e nei ratti, dimostrano che *des-Ala-Val-Bv8* è in grado di antagonizzare l'iperalgesia indotta da Bv8 legandosi ai PKRs sulle proiezioni periferiche e centrali dei neuroni sensitivi primari (Negri et al., 2005).

Sostituendo il triptofano in posizione 24 nella molecola di Bv8 anfibio con l'amminoacido alanina (Miele et al., 2010) si è ottenuto un nuovo composto chiamato A-24. Studi *in vivo* dimostrano che A-24 lega preferenzialmente il recettore PKR2 dove agisce come agonista, con potenza di poco inferiore a Bv8, ma lega anche PKR1, dove agisce da antagonista; infatti A-24 nel ratto e nel topo è un anti-iperalgesico potente e di lunga durata (Lattanzi et al., 2012). Essendo tuttavia un peptide grande è poco adatto ad essere usato come farmaco ed è per questo motivo che il gruppo di ricerca della Prof.ssa Negri, in collaborazione con i chimici di Ferrara, Prof. Salvadori e Prof. Balboni, si è dedicato alla progettazione, sintesi e studio di nuove molecole non peptidiche (Balboni et al., 2008). Sono così stati sintetizzati diversi composti triazinici, denominati PCs. *Il lead compound è stato chiamato PC1* (Fig.1). Riguardo a PC1, dati ottenuti da esperimenti di binding indicano che è un ligando preferenziale per PKR1, con un'affinità 30 volte più alta per PKR1 che per PKR2. In cellule CHO transfettate stabilmente con PKR1 o PKR2 PC1 riduce (100 nM) e antagonizza (300 nM) la mobilizzazione intracellulare del Ca²⁺ indotta da Bv8 (1nM) e l'effetto è dose-dipendente (Balboni et al., 2008).

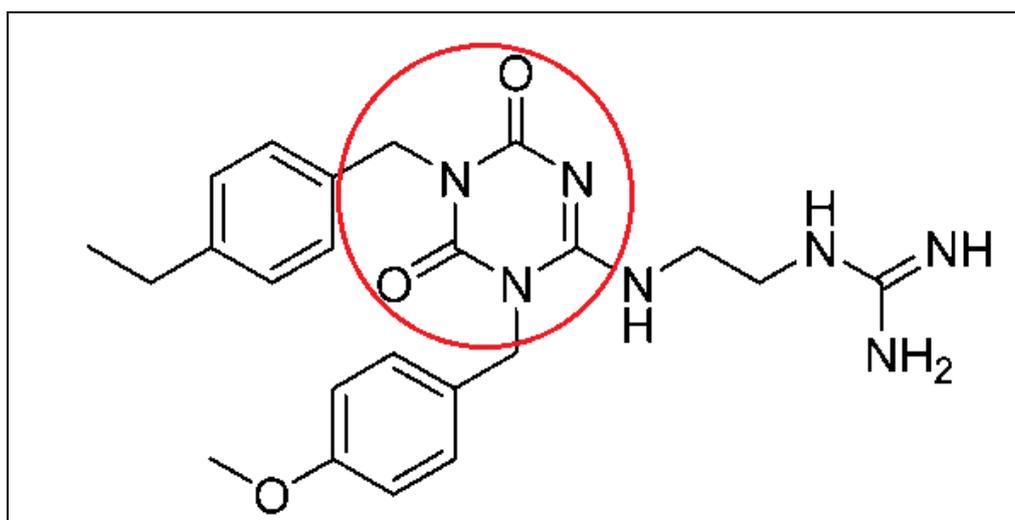


Fig.1- Struttura molecolare di PC1: nel cerchio è indicato il gruppo triazinico.

Riguardo a PC1, lo scopo del progetto di ricerca è stato:

1. *In vitro*, di valutare la capacità di PC1 di antagonizzare gli effetti indotti da Bv8: in particolare è stata testata la capacità di PC1 di bloccare la fosforilazione di p44/42 MAPK indotta da Bv8;
2. *In vivo*, di valutare la capacità di PC1 di bloccare l'iperalgia termica indotta dall'agonista Bv8.

Come già dimostrato in precedenza, Bv8/PK2 è responsabile del dolore infiammatorio associato ad infiltrazione granulocitaria (Giannini et al., 2009).

Poiché in condizioni infiammatorie il G-CSF è il principale up-regolatore dell'espressione di Bv8/PK2 nei granulociti neutrofili circolanti e tessuto-infiltranti (Shojaei et al., 2007; Giannini et al 2009; Zhong C et al., 2009) e la sua somministrazione, sia nell'uomo sia nel topo, produce dolore (Johnston E., et al., 2000; Mense S and Simons DG., 2001; Holmes F.A. et al., 2002; Green M., et al., 2003; Carvalho TT et al., 2011), è *plausibile ipotizzare che Bv8/PK2 sia il responsabile o quanto meno un importante mediatore nel dolore da G-CSF*.

Recenti dati in letteratura, inoltre, hanno dimostrato nelle colture di DRG la localizzazione funzionale del recettore per il G-CSF (G-CSFR), dove l'attivazione del sistema G-CSF/G-CSFR provoca la sensibilizzazione del recettore TRPV1 (Schweizorf et al., 2009).

Nel 2006 l'Unità di Ricerca di Farmacologia di Roma guidata dalla Prof.ssa Lucia Negri ha dimostrato una co-localizzazione ed una cooperatività funzionale del recettore PKR1 e del recettore TRPV1 sui neuroni di piccolo e medio calibro.

Sulla base delle considerazioni precedenti, gli ulteriori obiettivi dello studio sono stati:

i) valutare se il dolore indotto dalla somministrazione di G-CSF dipende da aumentati livelli di espressione di Bv8/PK2 e da incremento nei livelli ematici di proteina Bv8/PK2;

ii) delucidare il ruolo dei recettori PKRs nella modulazione del dolore da G-CSF mediante l'utilizzo di topi knock-out (KO) per entrambi i recettori delle prokineticine (PKR1 e PKR2) e del lead compound PC1 (Balboni et al., 2008);

iii) chiarire il ruolo del recettore vanilloide TRPV1 nel dolore da G-CSF tramite l'uso dell'antagonista triazinico del recettore TRPV1, NF1-56HCl (Vidal-Mosquera et al., 2011);

iv) testare la capacità della molecola PC1 di bloccare il dolore da G-CSF (Balboni et al., 2008).

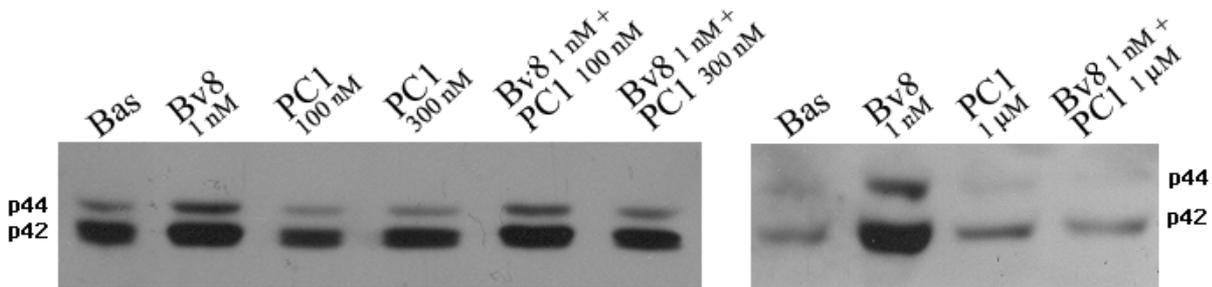
RISULTATI

CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA DI ANTAGONISTI DEI RECETTORI PKRS

PC1 è in grado di bloccare gli effetti Bv8-indotti *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, è stata testata la capacità di PC1 di bloccare la fosforilazione di p44/42 MAPK indotta da Bv8, utilizzando il saggio funzionale del Western Blotting su cellule CHO stabilmente transfettate con il recettore umano PKR1.

- *In vitro, effetto di PC1 sulla fosforilazione di p44/42 MAPK Bv8-indotta:* in colture di cellule CHO stabilmente transfettate con il recettore PKR1, PC1 riduce (300 nM) e blocca (1 μ M) la fosforilazione di p44/42 MAPK indotta da Bv8 (1 nM) (Fig.2).

A



B

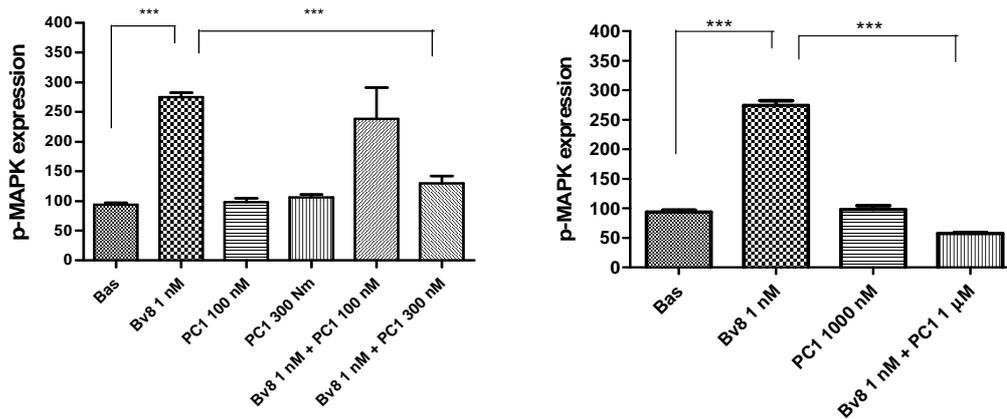


Fig.2- Western Blotting: A) le cellule venivano pre-trattate con PC1 (100 nM, 300 nM e 1 μ M, -30' min), stimulate con Bv8 (1 nM, 10 min) e quindi processate per l'analisi dell'immunoreattività per p44/42 MAPK. La coppia di bande si riferisce alle forme fosforilate di p44/42 MAPK. B) PC1 antagonizza in maniera dose-dipendente la fosforilazione di p44/42 MAPK Bv8-indotta. PC1 100 nM è inefficace nel bloccare la fosforilazione p44/42 indotta da Bv8.

In vivo, è stata valutata la capacità di PC1 di bloccare l'iperalgia termica indotta dall'agonista Bv8 nei topi WT, PKR1 Knock-out (PKR1-KO) e PKR2 Knock-out (PKR2-KO).

- ***In vivo, effetto di PC1:*** in topi WT, la somministrazione intraplantare (i.pl.) di Bv8 (0.5 ng), di bradichinina (BK, 2 µg) e di prostaglandine E2 (PGE2, 1 µg) induce una risposta iperalgesica (Paw-Immersion test, 48°C) equivalente, cioè di intensità e durata paragonabili. Nel topo la pre-somministrazione locale di 10 ng, i.pl. di PC1 annulla l'iperalgia termica indotta da Bv8 (0.5 ng, i.pl.) ma è inefficace nell'antagonizzare l'iperalgia termica indotta da altri agenti algogeni, quali bradichinina (BK: 2 µg i.pl.) e prostaglandina E2 (PGE2: 1 µg i.pl.), anche ad una dose 10 volte più alta (PC1 100 ng, i.pl.) (Fig.3A, 3B, 3C). *L'azione antagonista di PC1 è, dunque, selettiva per i recettori PKRs.*

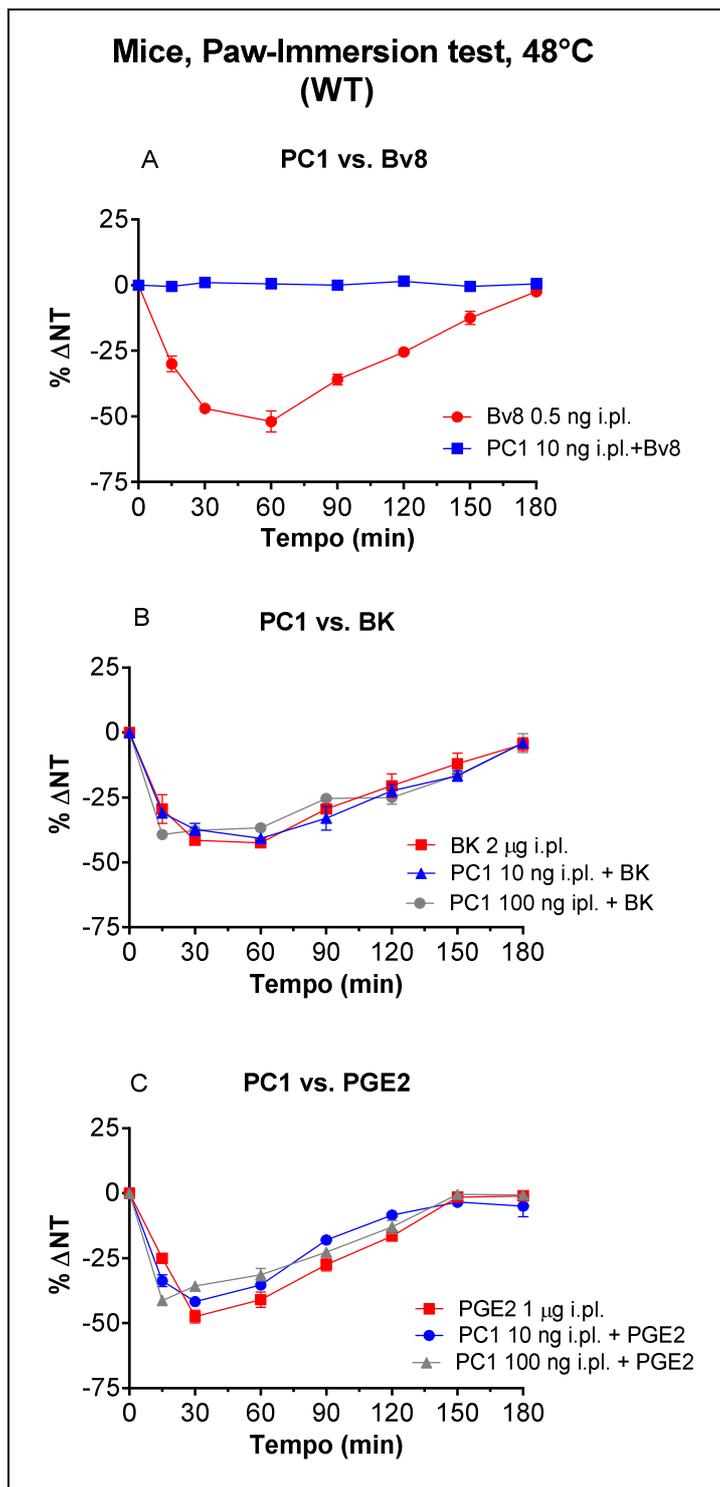


Fig.3- La somministrazione di PC1 (10 ng, i.pl.) riduce l'iperalgia indotta da Bv8 (0,5 ng, i.pl.) (A), mentre non ha alcun effetto sull'iperalgia indotta da BK (2 μg, i.pl.) (B) e da PGE2 (1 μg, i.pl.) (C).

Nei topi PKR1-KO PC1 antagonizza l'iperalgisia termica indotta da Bv8 (5 ng, i.pl.) a una dose di 100 ng i.pl somministrata 5 minuti prima di Bv8 (Fig.4) mentre nei topi PKR2-KO è sufficiente una dose di PC1 30 volte più bassa (3 ng, i.pl.) per ridurre e di 10 volte più bassa (10 ng, i.pl.) per antagonizzare l'iperalgisia indotta da Bv8 (5 ng, i.pl.) (Fig.5) confermando anche *in vivo* i dati di binding recettoriale che dimostrano che PC1 è preferenziale per il recettore PKR1 (Balboni et al., 2008).

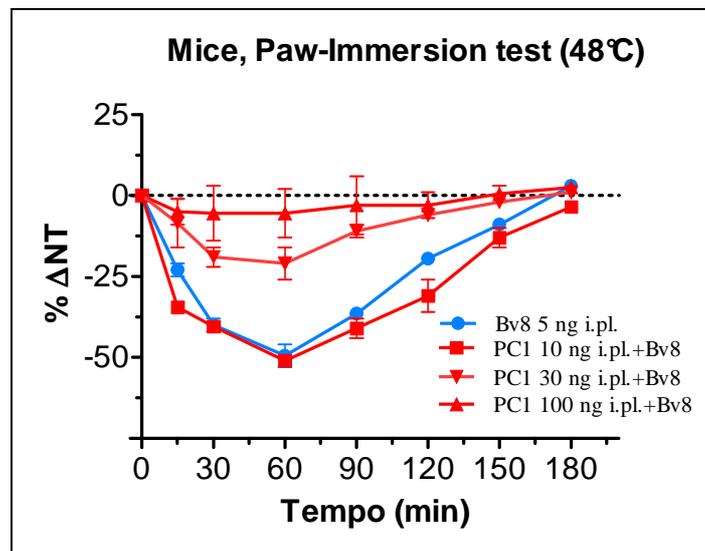


Fig.4- Topi PKR1-KO; PC1 i.pl. vs Bv8 5 ng i.pl.

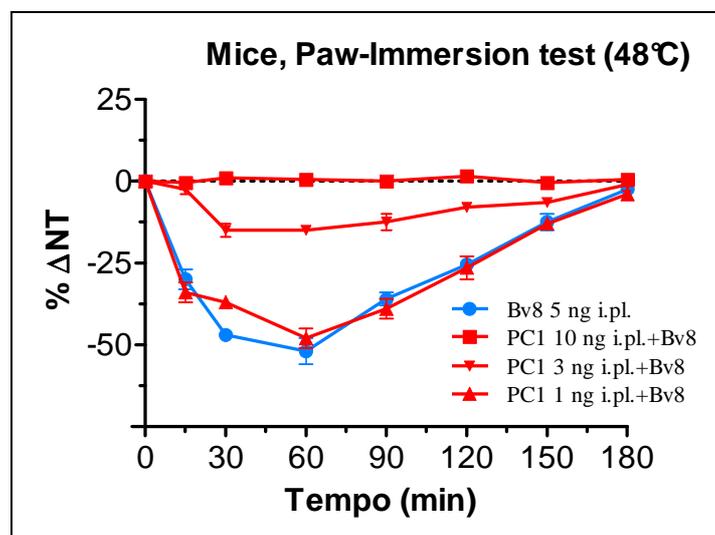


Fig.5- Topi PKR2-KO; PC1 i.pl. vs Bv8 5 ng i.pl.

UOMO: DOLORE DA GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF)

Effetti indotti dalla somministrazione di G-CSF: dolore, numero di granulociti neutrofili circolanti, livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti e livelli ematici di proteina Bv8/PK2

Il nostro studio ha incluso pazienti di sesso femminile affetti da carcinoma della mammella, sottoposti a mastectomia e trattati con chemioterapia e con terapia adiuvante con G-CSF (Pegfilgrastim, 100 µg/Kg, s.c). Nei pazienti sono stati valutati i seguenti parametri: i) il time-course del dolore, ii) il time-course del numero di granulociti neutrofili circolanti, iii) i livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, iv) i livelli ematici di proteina Bv8/PK2, v) il time-course del rapporto n° neutrofili / n° leucociti.

i) Time-course del dolore: la somministrazione di G-CSF induce dolore nei pazienti che si manifesta con grado di intensità variabile, da moderato (NRS:4-7) a severo (NRS: 8-10) (Fig. 6A);

ii) time-course del numero di granulociti neutrofili circolanti: il numero di granulociti neutrofili circolanti è massimo tra +1 giorno e + 2 giorni dal G-CSF; a +6 giorni dal G-CSF il numero di granulociti neutrofili è ancora elevato (Fig. 6B);

iii) livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti: l'analisi dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti mostra un significativo incremento a +1 giorno (+70 volte rispetto al controllo-punto 0) e +2 giorni (+50 volte rispetto al controllo-punto 0) dalla somministrazione di G-CSF (Fig. 6C);

iv) livelli ematici di proteina Bv8/PK2: l'analisi dei livelli ematici di proteina Bv8/PK2 evidenzia un incremento significativo a + 6 giorni dal G-CSF (1890 ± 212 pg/ml vs 756 ± 127 pg/ml del controllo-punto 0) (Fig. 6D);

v) il time-course del rapporto n° neutrofili / n° leucociti: tale rapporto è stato usato per valutare quale fosse l'incremento nei livelli di espressione di Bv8/PK2 per singolo granulocita neutrofilo; dal momento che questo rapporto si mantiene pressoché costante nel tempo, è possibile supporre che +1 giorno e +2 giorni dallo stimolo con G-CSF i granulociti neutrofili siano particolarmente ricchi in mRNA di Bv8/PK2 (Fig. 6C).

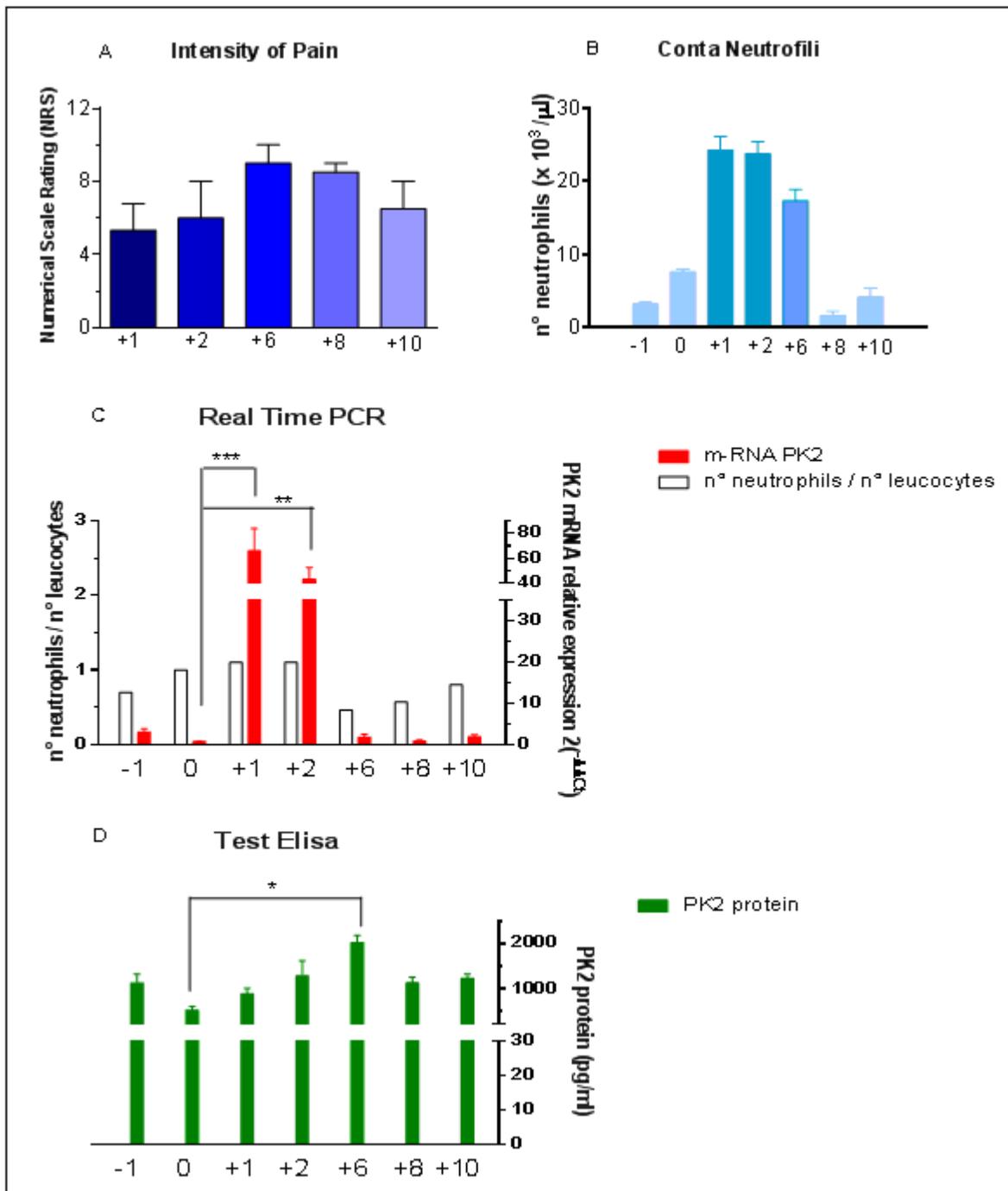


Fig.6- Time-course del dolore: l'intensità del dolore nei pazienti è stata misurata mediante metodo numerico NRS (Numerical Scale Rating). Nel metodo NRS si chiede al paziente di assegnare al suo dolore un punteggio di intensità che vada da 0 a 10: lo "0" è considerato totale assenza di dolore, l'intervallo 1-3 indica dolore lieve, l'intervallo 4-7 dolore moderato e il range 8-10 dolore severo (A). Time-course del numero di granulociti neutrofili circolanti misurato mediante Emocromo (B). Time-course dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti (Real Time PCR) (C). Time-course dei livelli ematici di proteina Bv8/PK2 (Test Elisa) (D).

TOPO: DOLORE DA GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR (G-CSF)

Iperalgesia termica indotta dalla somministrazione locale di basse dosi di G-CSF

Nei topi Wild Tipe (WT) la somministrazione intraplantare (i.pl.) di G-CSF (100-1000 ng) induce iperalgesia termica localizzata nella zampa ipsilaterale. La dose di 20 ng, i.pl. risulta inefficace nell'indurre iperalgesia termica. L'iperalgesia termica che si sviluppa in seguito a somministrazione locale (i.pl.) di 300 ng e 1000 ng di G-CSF è già evidente 1h dopo l'iniezione, è massima a 4h e torna ai valore di base dopo circa 8h (Fig.7). L'iperalgesia termica è stata valutata mediante il Plantar test per 8h dalla somministrazione di G-CSF.

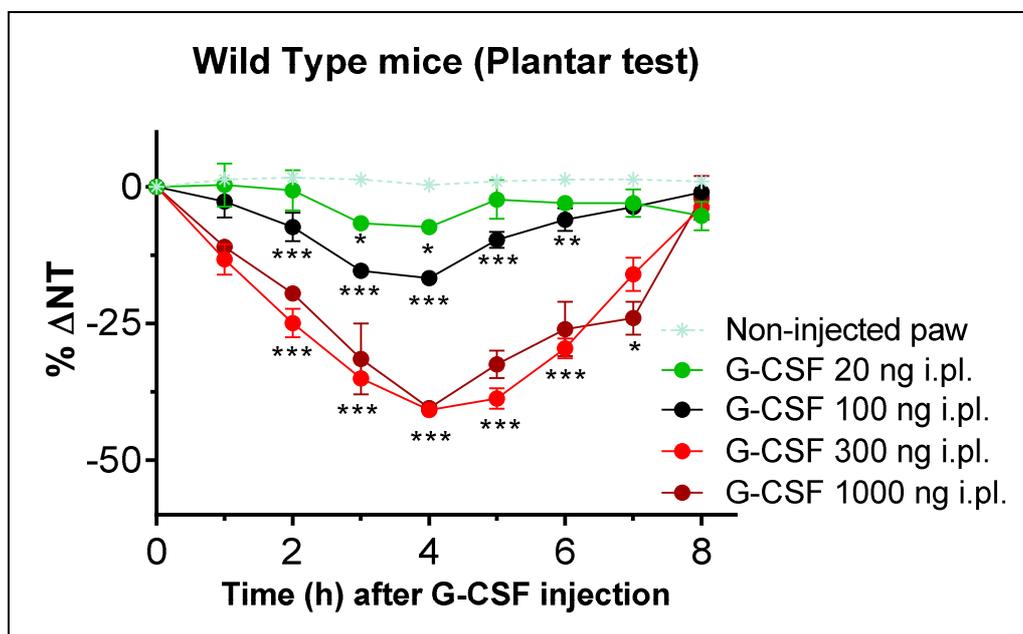


Fig.7- Curva tempo-risposta della variazione percentuale della soglia nocicettiva del topo sottoposto a stimoli termici dopo somministrazione i.pl. di G-CSF.

Ruolo dei recettori delle prokineticine (PKRs) nello sviluppo della iperalgesia termica da G-CSF

Nei topi PKR2-KO la somministrazione i.pl. di 100 ng e 300 ng di G-CSF determina la stessa risposta iperalgesica a stimoli termici evocata nei topi WT dalle stesse dosi di G-CSF. Come nei topi WT la dose di 20 ng, i.pl. risulta inefficace nell'indurre iperalgesia termica (Fig.8).

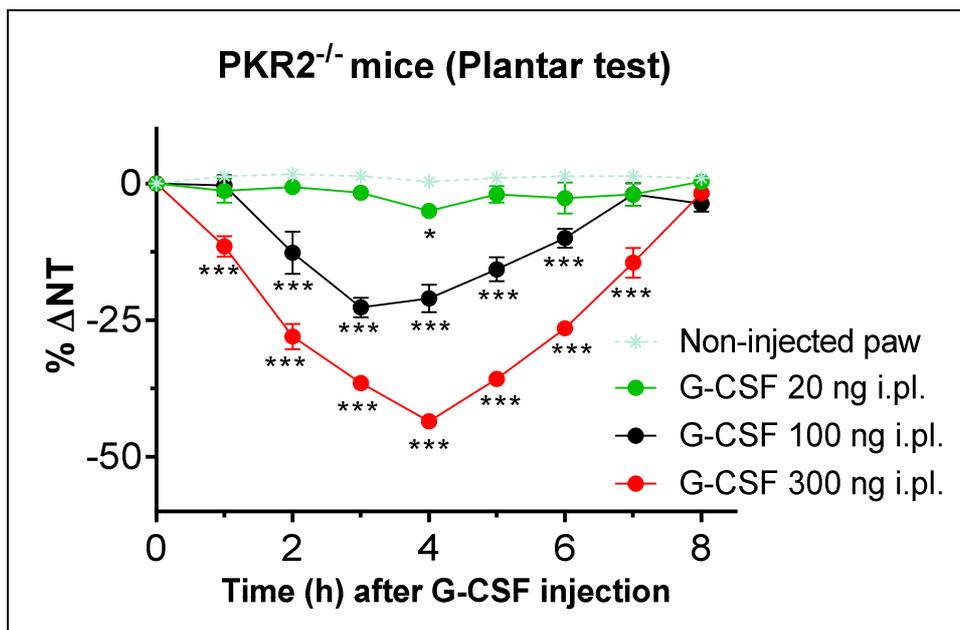


Fig.8- Curva tempo-risposta della variazione percentuale della soglia nocicettiva del topo sottoposto a stimoli termici dopo somministrazione i.pl. di G-CSF.

I topi PKR1-KO risultano meno sensibili dei topi PKR2-KO al G-CSF: nei topi PKR1-KO infatti la somministrazione di 300 ng, i.pl. e di 1 µg, i.pl. determina una risposta iperalgesia a stimoli termici che è paragonabile a quella indotta dalla dose di 100 ng, i.pl. nei PKR2-KO (Fig.9).

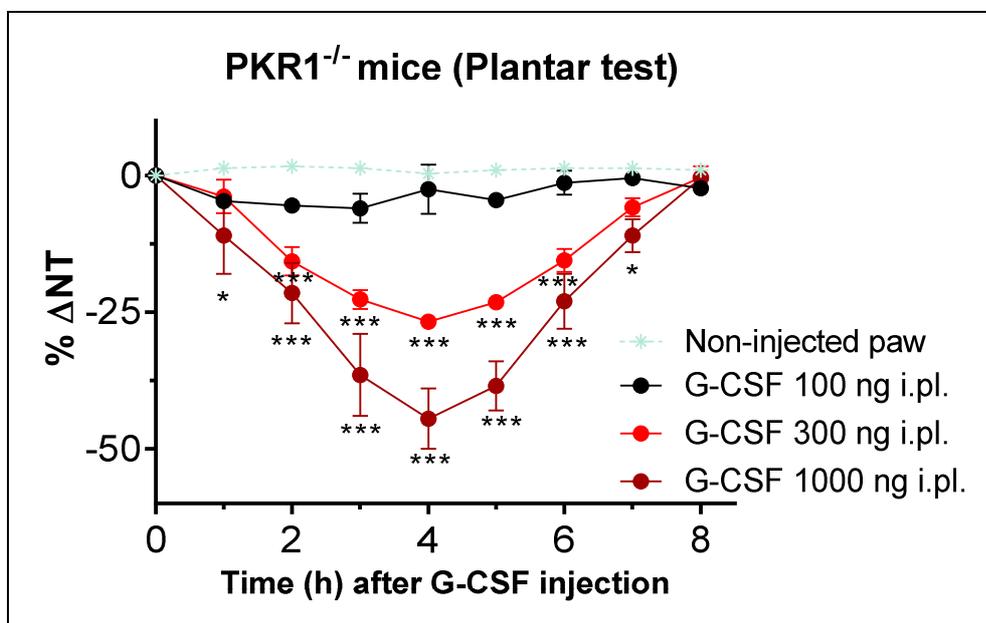


Fig.9- Curva tempo-risposta della variazione percentuale della soglia nocicettiva del topo sottoposto a stimoli termici dopo somministrazione i.pl. di G-CSF.

Effetto di PC1 sulla iperalgesia termica da G-CSF

In topi WT la somministrazione i.pl. di PC1 dopo 3h dal G-CSF (300 ng, i.pl.) non antagonizza (5 ng), riduce (20 ng) e reverte (50 ng) l'iperalgia termica indotta dal G-CSF (Fig.10).

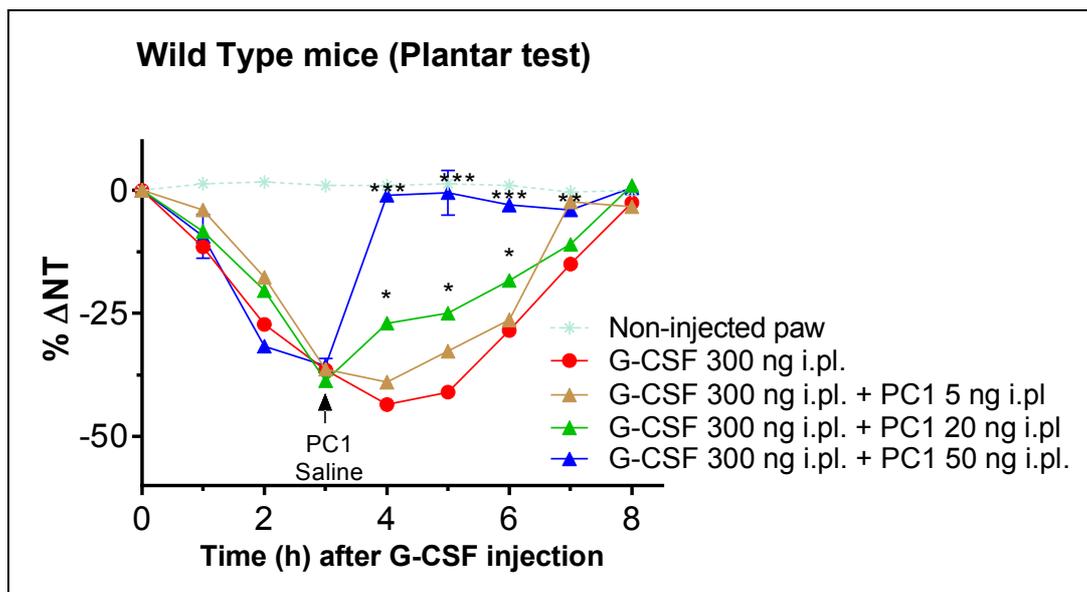


Fig.10- In topi WT la somministrazione i.pl. di PC1 (50 ng) dopo 3h dal G-CSF (300 ng, i.pl.) abolisce per circa 4h l'iperalgia termica indotta dal G-CSF.

Nei topi PKR1-KO, PC1 (fino a 500 ng i.pl.) somministrato dopo 3h dal G-CSF (300 ng, i.pl.) risulta inefficace nell'antagonizzare l'iperalgisia termica indotta dal G-CSF (Fig.11A); nei topi PKR2-KO, invece, PC1 (50 ng, i.pl.) mostra la stessa efficacia dei WT nell'antagonizzare l'iperalgisia termica indotta dal G-CSF (300 ng, i.pl.) (Fig.11B).

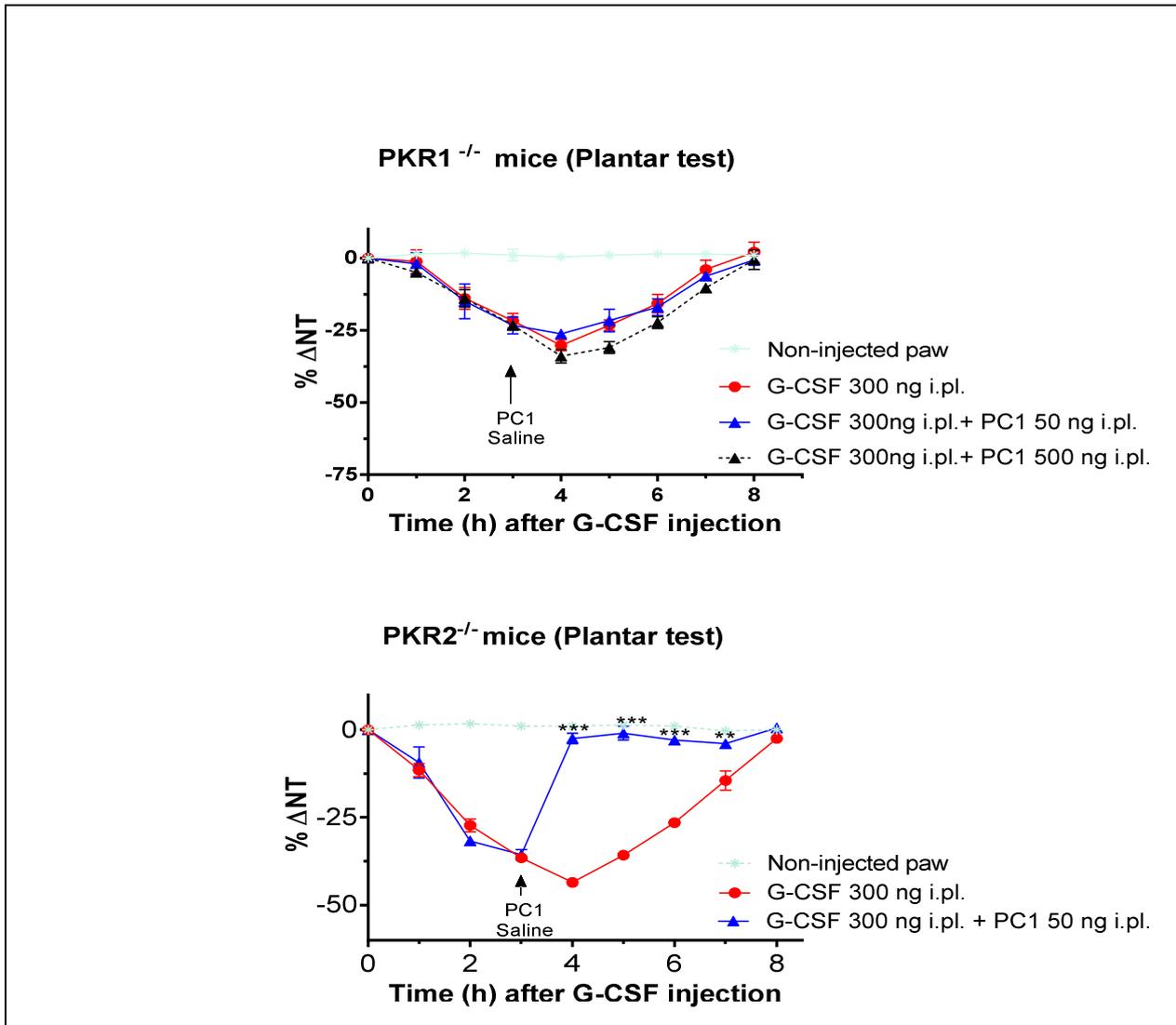


Fig.11- Topi PKR1-KO; PC1(fino a 500 ng, i.pl) vs G-CSF 300 ng i.pl. Topi PKR2-KO; PC1 50 ng i.pl. vs G-CSF 300 ng i.pl (A). In topi PKR2-KO la somministrazione i.pl. di PC1 (50 ng) dopo 3h dal G-CSF (300 ng, i.pl.) abolisce per circa 4h l'iperalgisia termica indotta dal G-CSF (B).

Effetto di basse dosi intraplantari (i.pl.) di G-CSF sul richiamo dei granulociti neutrofili e sui livelli di espressione di Bv8/PK2 nel sito di somministrazione

La dose di 300 ng i.pl. di G-CSF, a 4h dalla iniezione, non determina l'aumento significativo nel numero dei granulociti neutrofili (valutato mediante il saggio della mieloperossidasi, MPO) che vengono richiamati nel sito di iniezione rispetto alla zampa controllo trattata con salina (Fig. 12A). L'analisi dell'espressione genica di Bv8/PK2, effettuata su campioni di tessuto di zampe prelevate a 4h dalla somministrazione di G-CSF (300 ng, i.pl.), mostra che non ci sono aumenti significativi dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nella zampa iniettata rispetto alla zampa controllo trattata con salina (Fig. 12B).

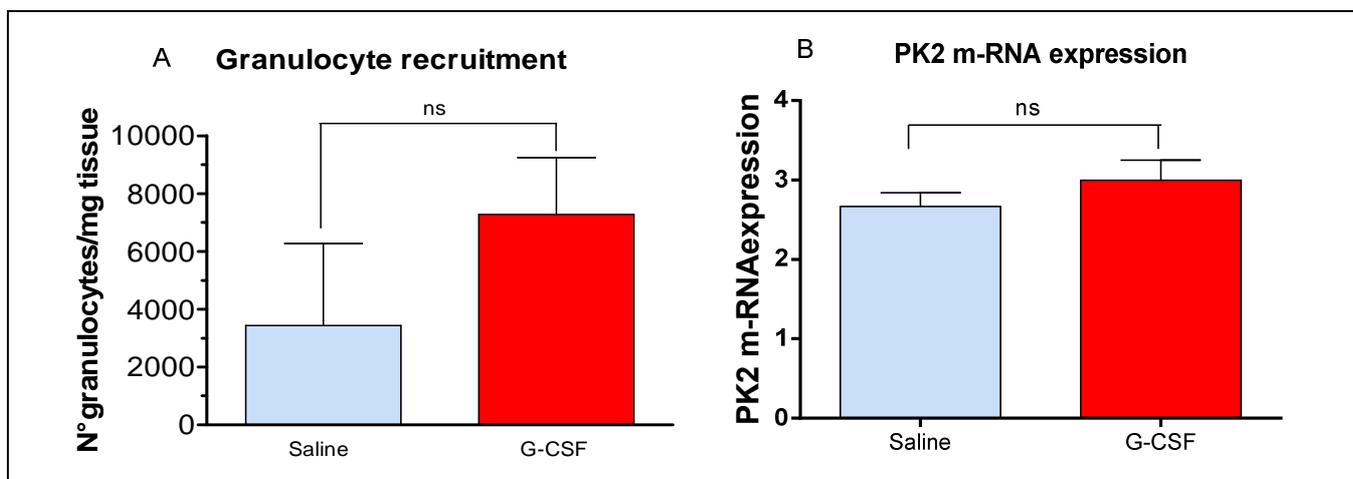


Fig.12- La somministrazione i.pl. di G-CSF (300 ng, i.pl.) non determina un richiamo significativo di granulociti neutrofili nella zampa iniettata, 4h dopo l'iniezione (A). La somministrazione i.pl. di G-CSF (300 ng, i.pl.), a 4h dalla iniezione, non determina un aumento significativo dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nella zampa iniettata rispetto alla salina (B).

Ruolo del recettore vanilloide TRPV1 nello sviluppo della iperalgesia termica da G-CSF

In topi WT la somministrazione i.pl di NF1-56HCl dopo 3h dallo stimolo con G-CSF (300 ng, i.pl.) non antagonizza (0.5 ng), riduce (5 ng) e annulla (50 ng), l'iperalgia termica indotta dal G-CSF (Fig.13).

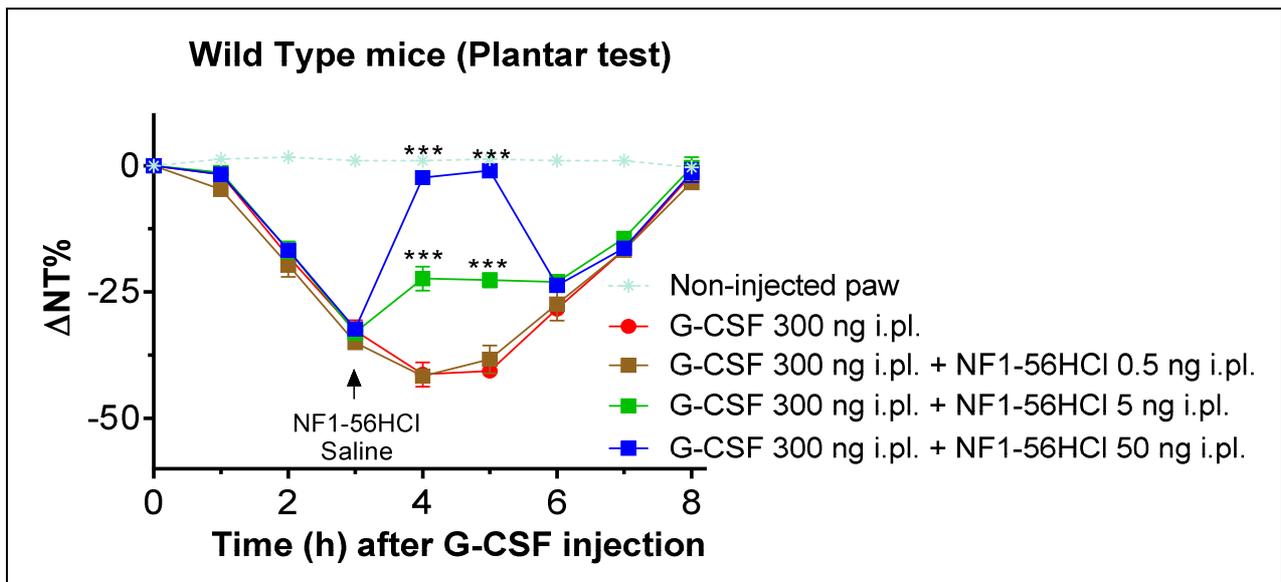


Fig. 13- Topi WT; NF1-56 HCl i.pl. vs G-CSF 300 ng i.pl. In topi WT la somministrazione i.pl. di NF1-56 HCl (50 ng) dopo 3h dal G-CSF (300 ng, i.pl.) abolisce per circa 2h l'iperalgia termica indotta dal G-CSF.

Nei topi PKR1-KO e PKR2-KO, NF1-56HCl (50 ng i.pl.) dopo 3h dal G-CSF (300 ng, i.pl.) reverte l'iperalgia termica indotta dal G-CSF alla stessa dose dei topi WT, per circa 2h (Fig.14 e 15).

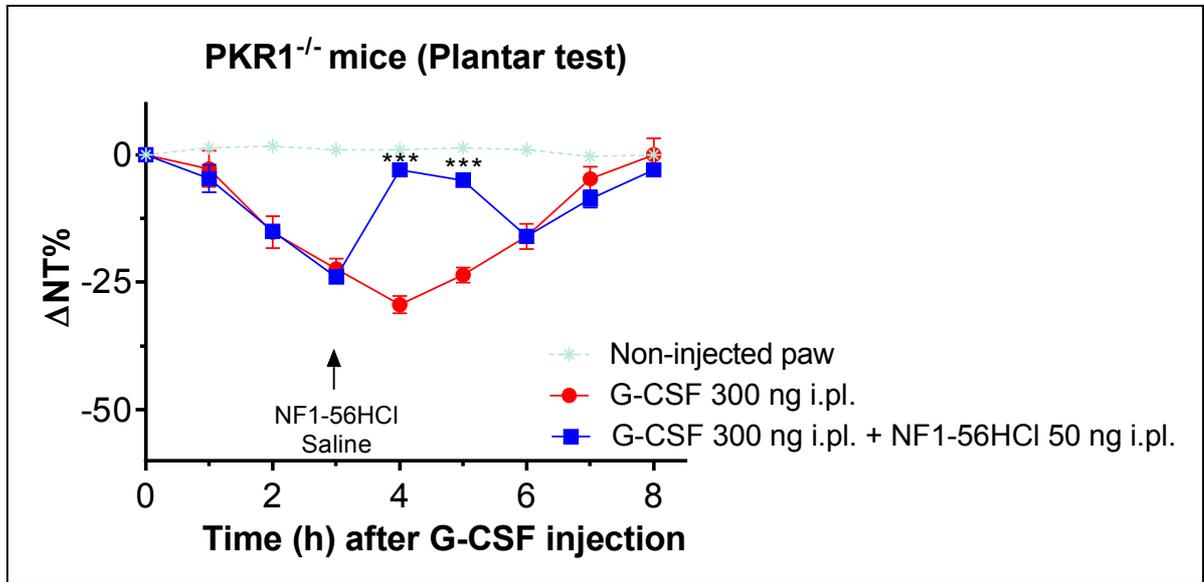


Fig.14- Topi PKR1-KO; NF1-56 HCl i.pl. vs G-CSF 300 ng i.pl.

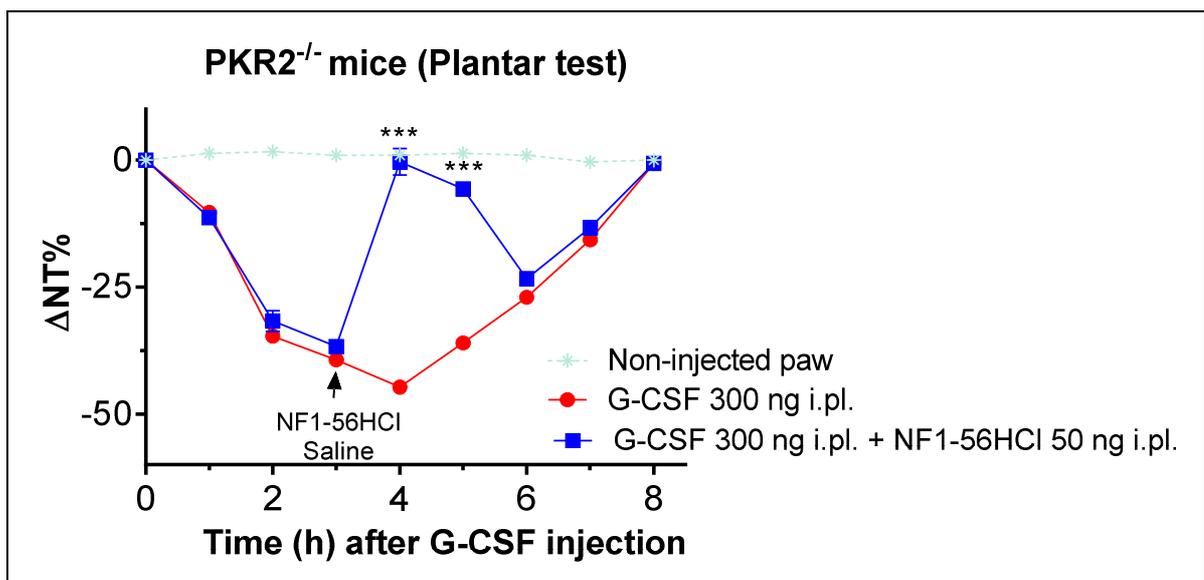


Fig.15- Topi PKR2-KO; NF1-56 HCl i.pl. vs G-CSF 300 ng i.pl.

La somministrazione di G-CSF a dosi maggiori di 1 µg induce allodinia

Nel topo la somministrazione di G-CSF (1 µg e 5 µg, i.pl.) induce allodinia tattile e dose-dipendente, rilevabile sulle zampe posteriori (ipsilaterale e contro laterale) e anteriori. L'allodinia tattile è stata valutata mediante il Von-Frey test per 8h dalla somministrazione di G-CSF.

A livello delle zampa iniettata la somministrazione i.pl. di 1 µg e 5 µg di G-CSF, induce una allodinia tattile più marcata rispetto alla zampa contro laterale posteriore e alle zampe anteriori. L'allodinia tattile è già evidente a 2h, è massima a 5h e torna ai valori di base dopo circa 8h dall'iniezione (Fig. 16A, 16B).

L'allodinia tattile che si sviluppa a livello delle zampe anteriori e contro laterale posteriore in seguito alla somministrazione intraplantare (i.pl.) di 1 µg e 5 µg di G-CSF, è meno marcata rispetto alla zampa ipsilaterale, ma si manifesta con il medesimo andamento temporale della zampa ipsilaterale (Fig.16A, 16B).

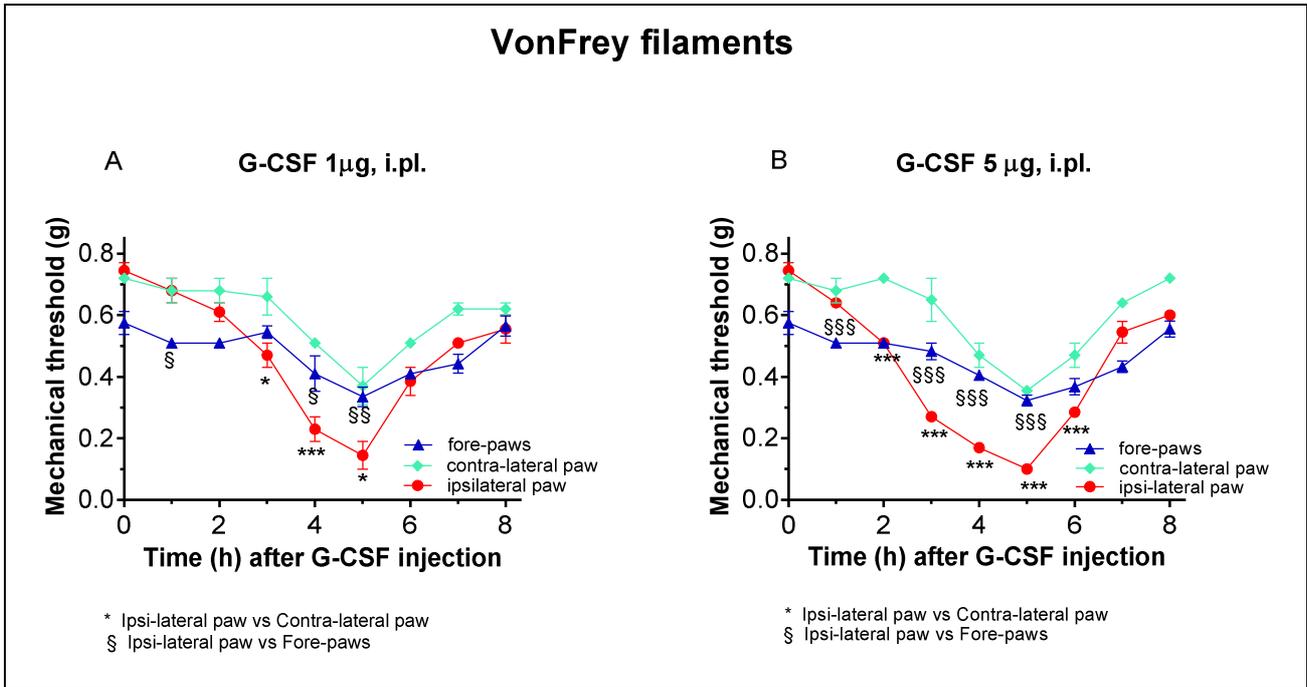


Fig.16- Andamento temporale dell'allodinia tattile indotta dalla somministrazione di G-CSF (1, 5 μ g, i.pl.) valutato mediante il Von-Frey test sulle zampe anteriori e posteriori (A, B).

Nel topo la somministrazione sottocute (nel fianco) di G-CSF (10 µg/topo, s.c.) determina allodinia tattile che si manifesta a livello delle zampe anteriori e posteriori con la stessa intensità e il medesimo andamento temporale: è già evidente, infatti, 1h dopo l'iniezione, è massima a 5h e torna ai valori di base dopo circa 10h dalla somministrazione di G-CSF. (Fig. 17A, 17B).

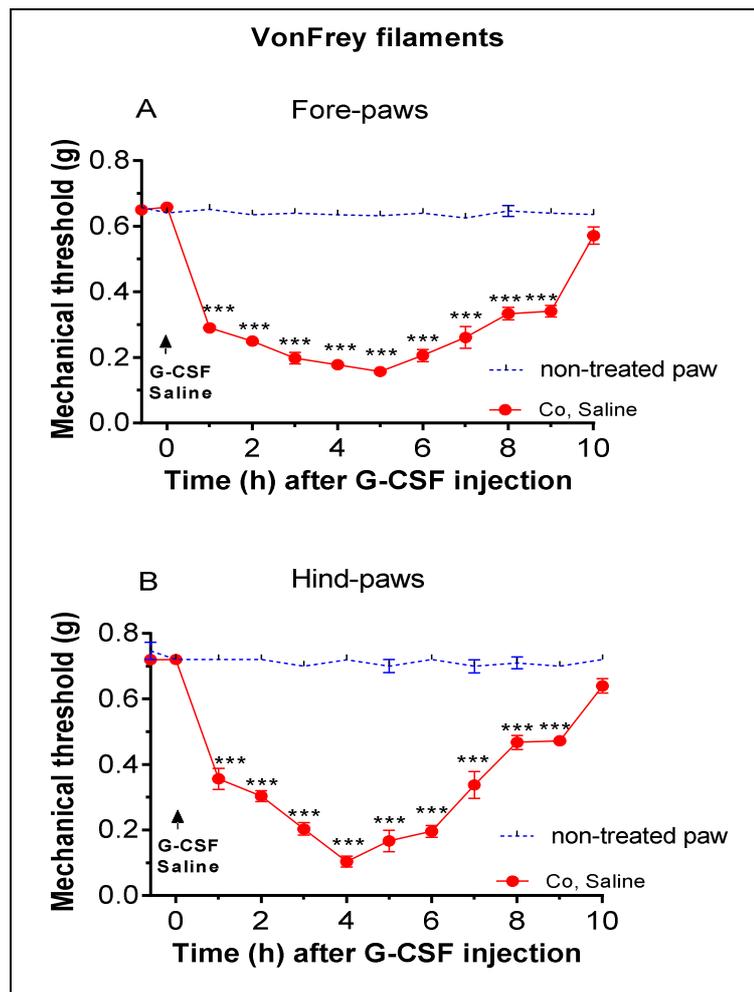


Fig.17- Andamento temporale dell'allodinia tattile indotta dalla somministrazione di G-CSF (10 µg/topo, s.c.) valutato mediante il Von-Frey test sulle zampe anteriori (A) e posteriori (B).

Nel topo somministrazioni sistemiche ripetute di G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) inducono, a partire dal terzo giorno, un abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili che si mantiene sino al sesto giorno. L'abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili, valutato mediante il Von-Frey test per 6 giorni dalla somministrazione di G-CSF, è rilevabile sulle zampe anteriori e posteriori (Fig.18A, 18B).

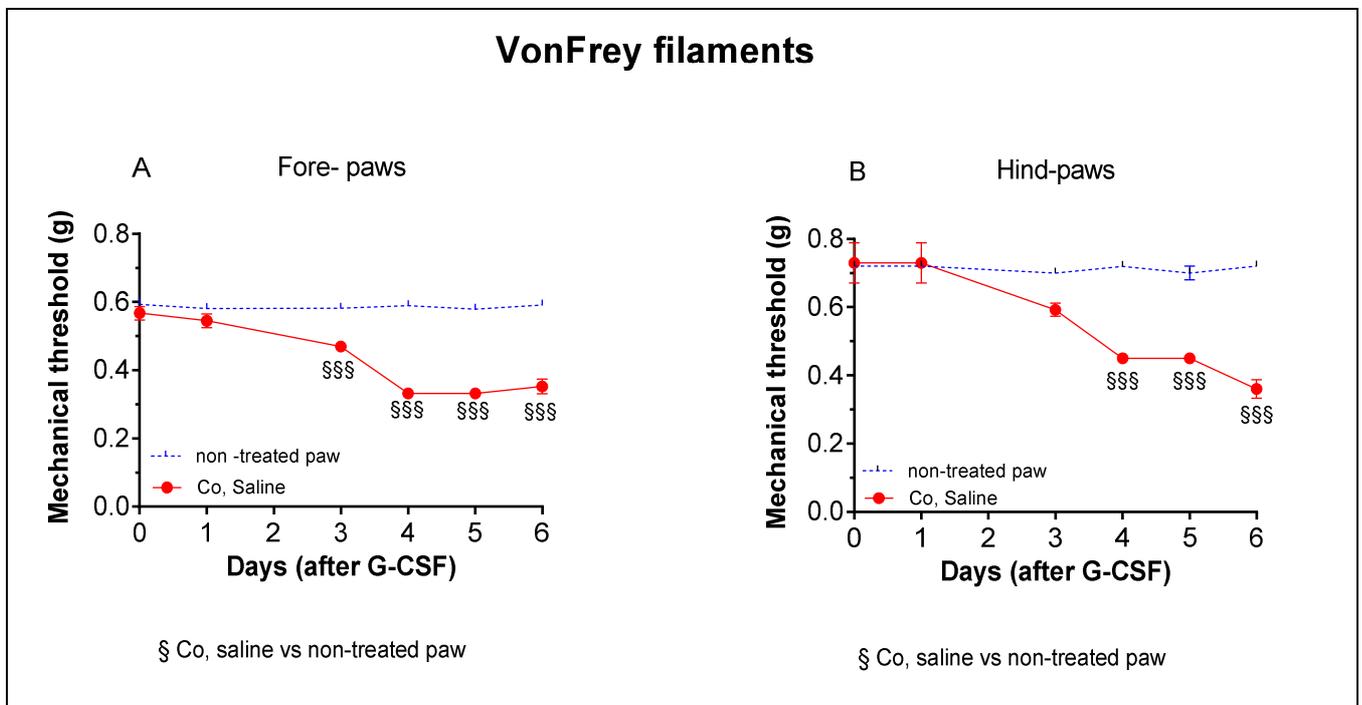


Fig.18- *Abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili indotto dalla somministrazione di G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) valutato mediante il Von-Frey test sulle zampe anteriori (A) e posteriori (B).*

Effetto del G-CSF sul numero di leucociti circolanti

In topi trattati con G-CSF (1, 5 μ g, i.pl. e 10 μ g, s.c.) e sacrificati dopo 5h dal G-CSF al picco dell'allodinia, il trattamento produce un incremento dose-dipendente nel numero di leucociti circolanti, che raggiunge il valore massimale in seguito alla somministrazione di 5 μ g, i.pl. e 10 μ g, s.c. di G-CSF (Fig.19A).

Il time-course della conta leucocitaria valutato in seguito a somministrazione di 5 μ g, i.pl. di G-CSF mostra che i leucociti circolanti raggiungono il valore massimale tra le 4-6h dallo stimolo con G-CSF, quando anche l'allodinia è massima (Fig. 19B).

Nel topo somministrazioni sistemiche ripetute di G-CSF (10 μ g, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) producono al 6 giorno un incremento significativo nel numero di leucociti circolanti (Fig.19C).

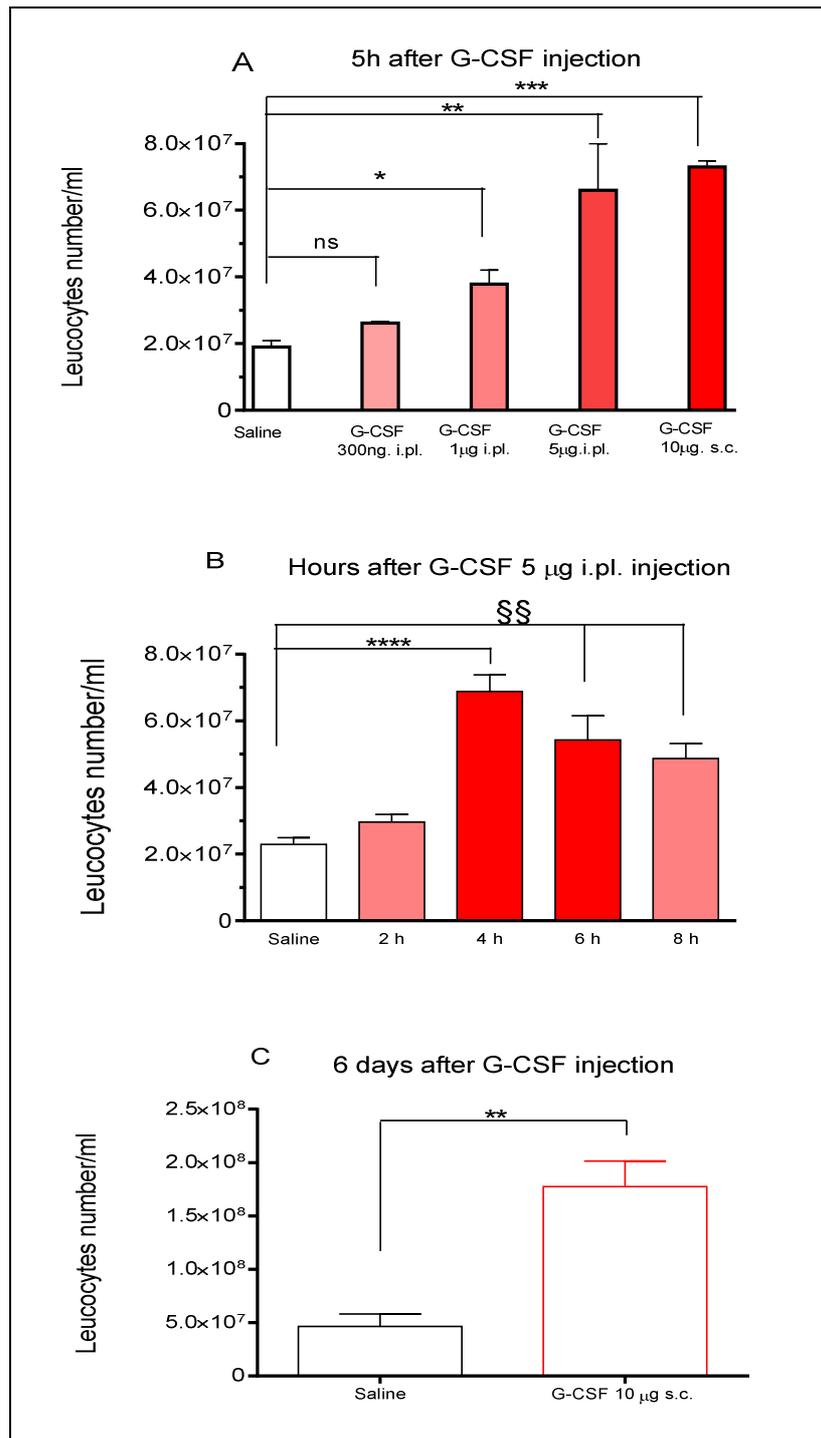


Fig.19- Incremento dose-dipendente nel numero di leucociti circolanti. La dose di 300 ng, i.pl. non determina un incremento significativo nel numero di leucociti circolanti (A). Time-course della conta leucocitaria dopo somministrazione i.pl. di 5 µg di G-CSF (B). Il trattamento ripetuto con G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) aumenta in maniera significativa il numero di leucociti circolanti (C).

Effetto del G-CSF sui livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo di topo

Nel topo il trattamento sistemico acuto con G-CSF (10 µg/topo, s.c.) determina allodinia tattile che è massima a 5h dal G-CSF. Per valutare se la riduzione della soglia nocicettiva a stimoli tattili dipenda da Bv8/PK2, abbiamo misurato i livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti isolati dal sangue intero, nella milza e nel midollo osseo al picco dell'allodinia tattile.

A tal fine abbiamo trattato i topi con G-CSF (10 µg/topo, s.c.) e salina, e, a 5h dall'iniezione, abbiamo prelevato campioni di leucociti circolanti, di milza e di midollo osseo, sui quali abbiamo effettuato l'analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR (RT-PCR).

Nel topo il trattamento sistemico ripetuto con G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) induce, a partire dal terzo giorno, un abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili, che si mantiene sino al sesto giorno.

Per valutare se l'abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili dipenda da Bv8/PK2, abbiamo trattato i topi con G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) e salina; a 6 giorni dal predetto trattamento, abbiamo prelevato campioni di leucociti circolanti, di milza e di midollo osseo, sui quali abbiamo effettuato l'analisi dell'espressione genica mediante RT-PCR.

L'analisi dell'espressione genica mediante Real Time PCR mostra i seguenti risultati:

- a livello dei leucociti circolanti un significativo incremento nei livelli di espressione di Bv8/PK2 sia a 5h (+16 volte rispetto al controllo) che 6 giorni (+62 volte rispetto al controllo) dal trattamento con G-CSF (Fig. 20A, 20B);
- a livello della milza, un significativo incremento nei livelli di espressione di Bv8/PK2 sia 5h (+50 volte rispetto al controllo) che a 6 giorni (+67 volte rispetto al controllo) dalla somministrazione di G-CSF (Fig.20A, 20B).
- a livello del midollo osseo, un significativo incremento nei livelli di espressione di Bv8/PK2 sia a 5h (+68 volte rispetto al controllo) che a 6 giorni (+62 volte rispetto al controllo) dalla somministrazione di G-CSF (Fig.20A, 20B);

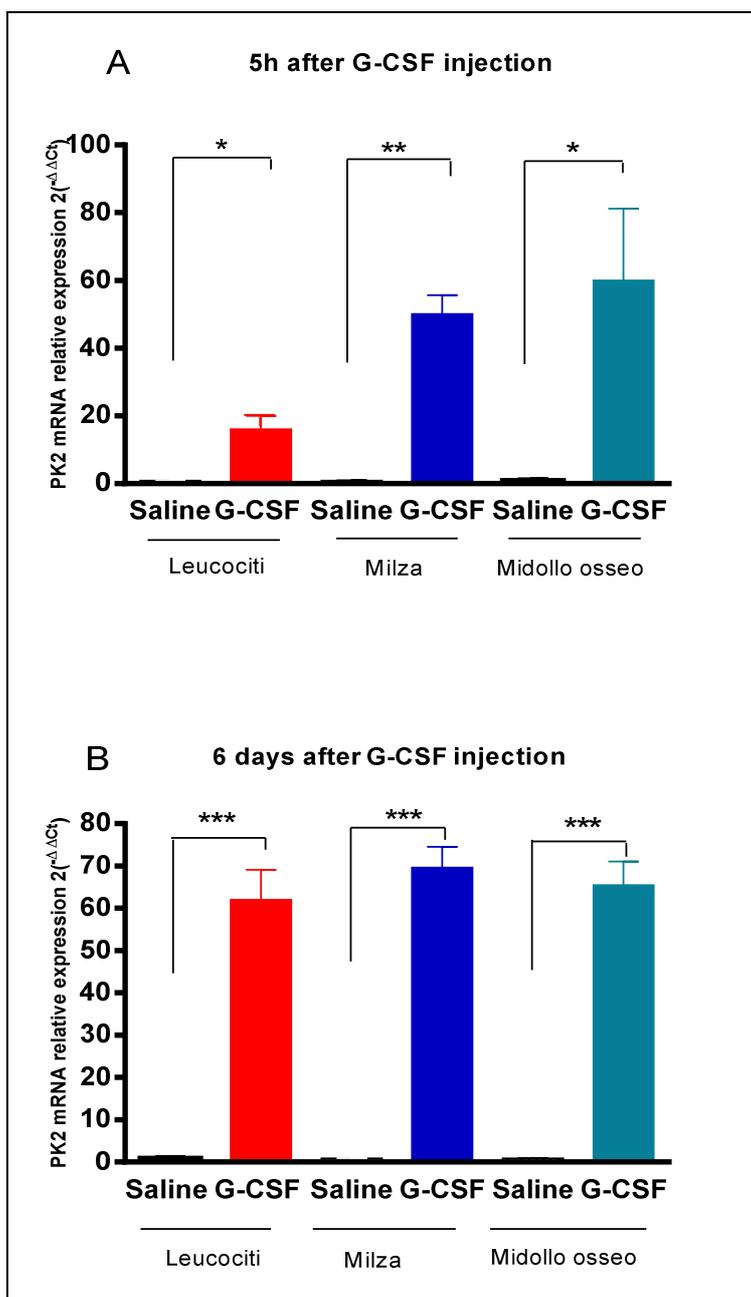


Fig.20- RT-PCR eseguita sui leucociti circolanti, sulla milza e sul midollo osseo di topo (A, B).

Effetto di PC1 sulla allodinia tattile da G-CSF

Nel topo il trattamento sistemico acuto con G-CSF (10 µg/topo, s.c.) determina allodinia tattile che dura circa 10h e che è massima a 5h dal trattamento con G-CSF. La singola somministrazione sistemica della molecola PC1 (150 µg/Kg, s.c.), antagonista dei recettori PKRs, 10 minuti prima del trattamento con G-CSF, inibisce per circa 3h lo sviluppo dell'allodinia tattile; la somministrazione di PC1 (150 µg/Kg, s.c.) in corrispondenza del picco dell'allodinia tattile, abolisce l'allodinia tattile per circa 3h (Fig.21A, 21B).

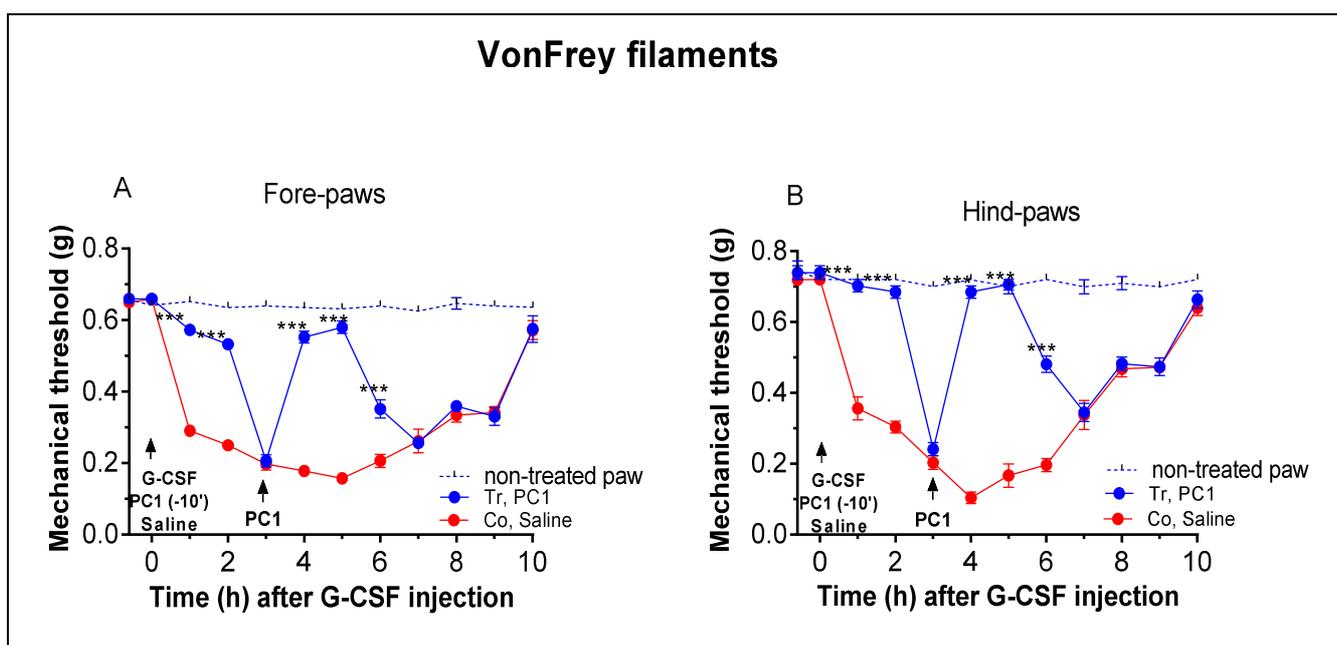


Fig.21- Nel topo la singola somministrazione sistemica di PC1 (150 µg/Kg, s.c.) abolisce l'allodinia tattile indotta dalla somministrazione di G-CSF (10 µg/topo, s.c.) sulle zampe anteriori (A) e posteriori (B).

Nel topo somministrazioni sistemiche ripetute di G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) inducono, a partire dal terzo giorno, un abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili, che si mantiene costante sino al sesto giorno. Il trattamento ripetuto con l'antagonista PC1 (150 µg/Kg, s.c., 2 volte al giorno, per 6 giorni) riduce in maniera significativa l'abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili sia sulle zampe anteriori che posteriori (Fig.22A, 22B).

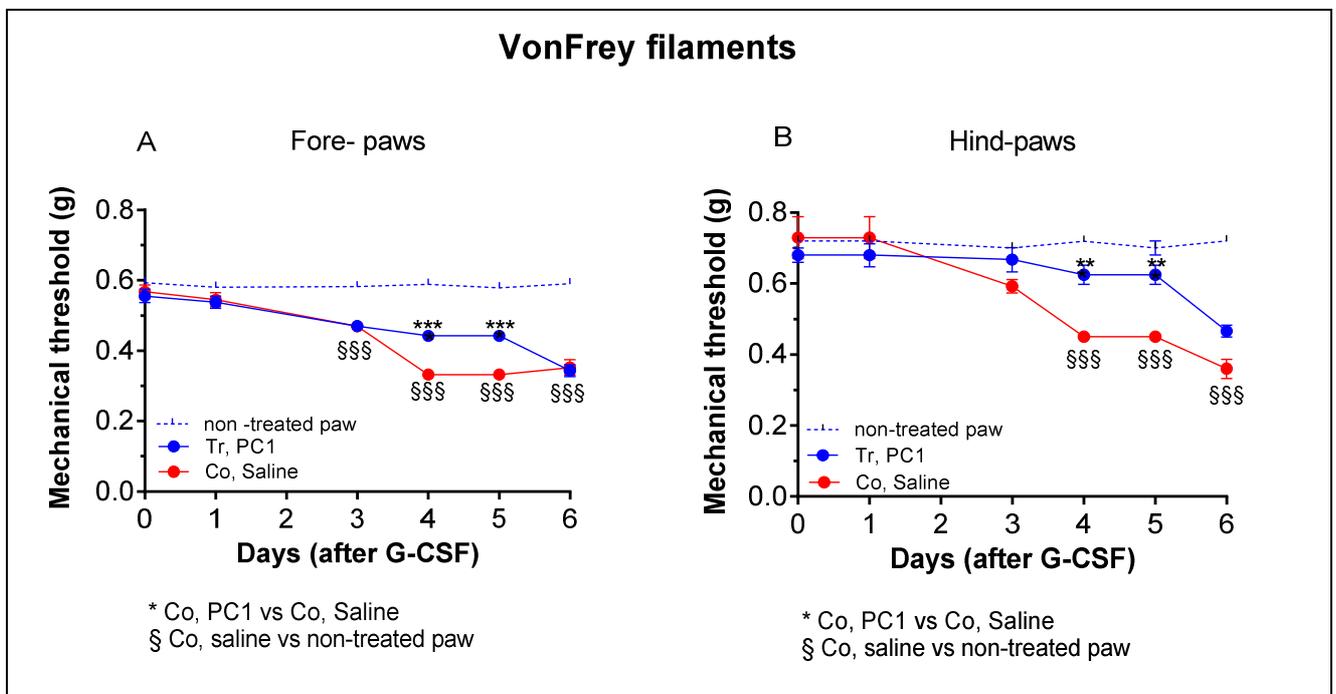


Fig.22- Nel topo il trattamento sistemico ripetuto con PC1 (150 µg/Kg, s.c., 2 volte al giorno, per 6 giorni) abolisce quasi del tutto l'abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili sia sulle zampe anteriori (A) che posteriori (B), prodotto da somministrazioni sistemiche ripetute di G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni).

Effetto di PC1 sul numero di leucociti circolanti

In topi trattati con G-CSF (10 µg/topo, s.c.) e PC1 (150 µg/Kg, s.c.), sacrificati a 5h dal G-CSF, la somministrazione della molecola PC1 10 minuti prima del G-CSF, è in grado di ridurre in maniera significativa l'aumento nel numero di leucociti circolanti indotto dal trattamento sistemico acuto con G-CSF (10 µg/topo, s.c.) (Fig.23A).

La somministrazione della molecola PC1 (150 µg/Kg, s.c., 2 volte al giorno, per 6 giorni) riduce in maniera significativa anche l'aumento nel numero di leucociti circolanti indotto dal trattamento sistemico ripetuto con G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) (Fig. 23B).

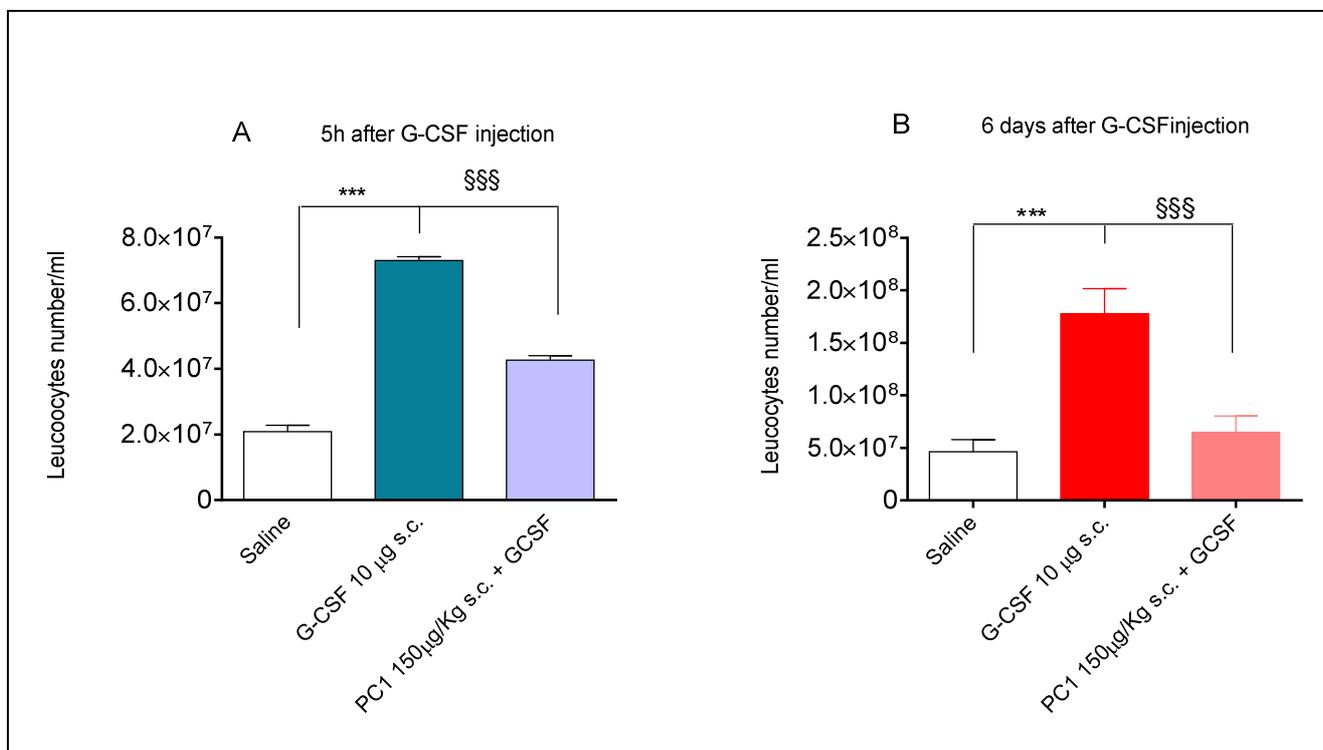


Fig.23- La pre-somministrazione di PC1 (150 µg/Kg s.c., -10') riduce in maniera significativa l'aumento nel numero di leucociti circolanti indotto dal G-CSF (10 µg s.c.) (A). Il trattamento con PC1 (150 µg/Kg, s.c., 2 volte al giorno, per 6 giorni) riduce in maniera significativa l'aumento nel numero di leucociti circolanti indotto dal trattamento ripetuto con G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni).

Effetto di PC1 sull'aumento dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo di topo indotto dal G-CSF

Nel topo il trattamento sistemico acuto (10 µg/topo, s.c.) e ripetuto (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) con G-CSF, determina aumenti nei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo.

La singola somministrazione sistemica della molecola PC1 (150 µg/Kg, s.c.) 10 minuti prima del G-CSF, riduce ma in maniera non significativa l'aumento nei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo, indotto dal trattamento sistemico acuto con G-CSF (10µg/topo,s.c.) (Fig. 24A)

La somministrazione della molecola PC1 (150 µg/Kg, s.c., 2 volte al giorno, per 6 giorni) riduce ma in maniera non significativa l'aumento nei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza e nel midollo osseo, prodotto dal trattamento sistemico ripetuto con G-CSF (10 µg, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) (Fig. 24B).

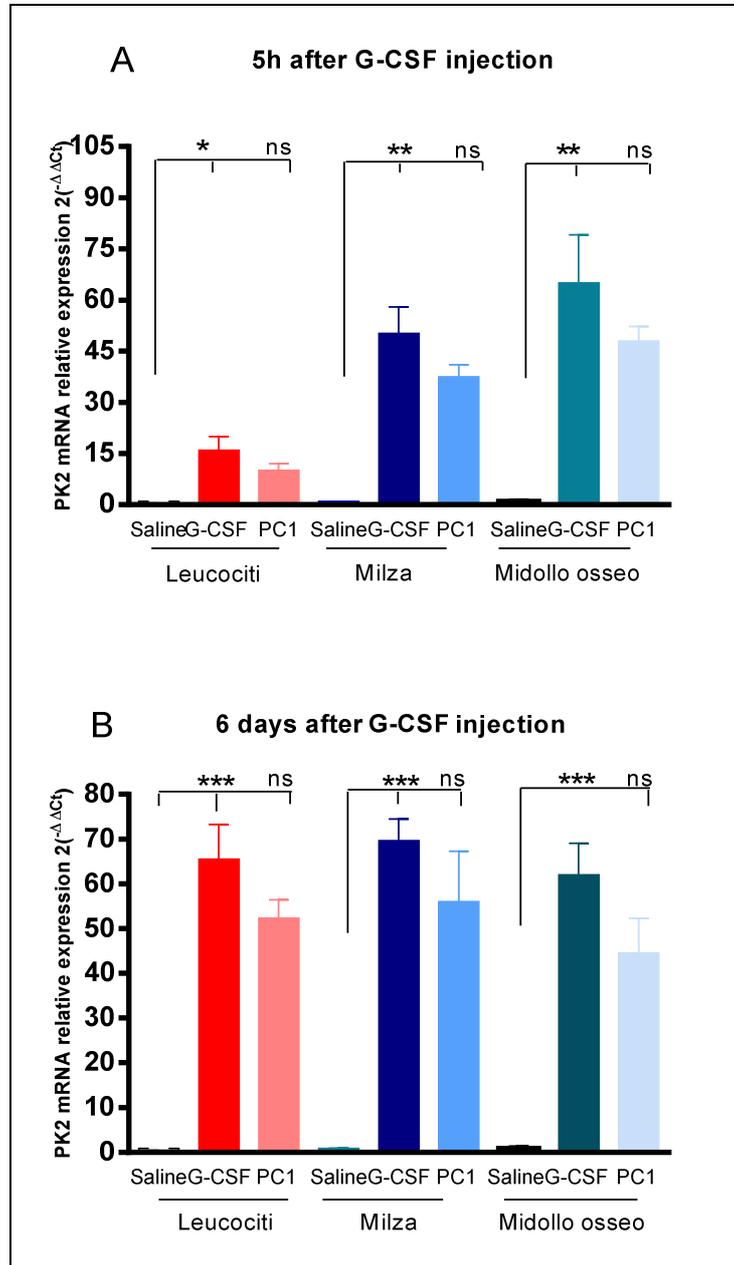


Fig. 24- RT-PCR eseguita su campioni di leucociti circolanti, di milza e di midollo osseo di topo (A,B).

DISCUSSIONE

Bv8/Prochineticina 2, che appartiene ad una nuova classe di proteine note come Bv8/Prochineticine (Bv8/PKs), è coinvolto nella regolazione della soglia nocicettiva tramite il legame ai recettori PKR1 e PKR2 sui neuroni sensitivi primari (Negri et al., 2002).

Bv8/PK2, la cui espressione nei granulociti è sovraregolata dal processo infiammatorio, è una delle principali proteine coinvolte nel dolore infiammatorio (Giannini et al., 2009).

I recettori PKRs rappresentano, quindi, un importante bersaglio farmacologico per il trattamento del dolore infiammatorio: in particolare, il blocco del recettore PKR1, data la distribuzione periferica (sulle fibre afferenti di piccolo diametro e sulla membrana cellulare di granulociti neutrofili e macrofagi), potrebbe essere una nuova strategia per ridurre l'attivazione e la sensitizzazione dei nocicettori afferenti primari.

Per questa ragione parte del dottorato di ricerca è stato dedicato allo studio e alla caratterizzazione farmacologica di antagonisti dei recettori PKRs, denominati PCs, in particolare di quello che per noi rappresenta il "*lead compound*" chiamato PC1.

Riguardo a PC1 è stato dimostrato che: i) è in grado di antagonizzare gli effetti Bv8-indotti sia *in vitro* che *in vivo*, ii) è un antagonista selettivo per i recettori PKRs, iii) è un ligando preferenziale per PKR1. L'effetto antiiperalgesico di PC1 insorge rapidamente, suggerendo un antagonismo diretto sui recettori PKRs dei nocicettori primari.

Dal momento che è stato dimostrato che PC1 è un antagonista selettivo per i recettori PKRs, tale molecola potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico nei modelli di dolore in cui viene dimostrata l'attivazione del sistema Bv8/Prochineticine.

Come abbiamo dimostrato in precedenza, Bv8/PK2 è responsabile del dolore infiammatorio associato ad infiltrazione granulocitaria (Giannini et al., 2009). Poiché in condizioni infiammatorie il G-CSF è il principale up-regolatore di Bv8/PK2 nei granulociti neutrofili CD11b+Gr1+ derivanti dal midollo osseo (Shojaei et al., 2007; Giannini et al 2009; Zhong C et al., 2009) e la sua somministrazione, sia nell'uomo sia nel topo, produce dolore (Johnston E., et al., 2000; Mense S and Simons DG., 2001; Holmes F.A. et al., 2002; Green M., et al., 2003; Carvalho TT et al., 2011), è plausibile ipotizzare che Bv8/PK2 sia un importante mediatore nel dolore da G-CSF. Tale ipotesi è stata valutata sia nell'uomo che nel topo.

Nell'uomo è stato dimostrato che la terapia adiuvante con G-CSF (100 µg/Kg, s.c.) induce nei leucociti circolanti una marcata up-regolazione di Bv8/PK2 a +1 giorno e +2 giorni dallo stimolo con G-CSF quando il paziente lamenta dolore e quando il numero di granulociti neutrofili circolanti è massimo.

La somministrazione di G-CSF determina anche un aumento significativo dei livelli ematici di proteina Bv8/PK2 a +6 giorni dal G-CSF che si registra quando il paziente lamenta dolore severo e quando il numero di granulociti neutrofili circolanti è ancora elevato. Il picco del dolore a +6 giorni dal G-CSF potrebbe dipendere da un duplice meccanismo: i) dall'attivazione dei recettori PKRs presenti sui nocicettori periferici (in particolare sulle fibre C) da parte di Bv8/PK2 ematico (Negri et al., 2002); ii) dall'azione diretta del G-CSF sui suoi recettori (G-CSFR) presenti sui nocicettori di gruppo III (fibre A δ) e gruppo IV (fibre C), localizzati nel midollo osseo, in particolare nel periostio (Johnston E., et al., 2000; Mense S and Simons DG., 2001; Holmes F.A. et al., 2002; Green M., et al., 2003).

Dal momento che non era possibile testare PC1 nell'uomo, abbiamo traslato lo studio dall'uomo al topo ed abbiamo valutato nel topo la capacità di PC1 di bloccare il dolore da G-CSF.

Nel topo è stato dimostrato che la singola somministrazione sistemica di G-CSF (10 μ g/topo, s.c.) induce allodinia tattile che correla temporalmente con l'up-regolazione dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza, nel midollo osseo e con l'aumento dei leucociti circolanti.

Nel topo somministrazioni sistemiche ripetute di G-CSF (10 μ g, s.c., 1 volta al giorno, per 6 giorni) inducono, a partire dal terzo giorno, un abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili che si mantiene costante sino al sesto giorno e che correla temporalmente con l'aumento dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti, nella milza, nel midollo osseo e con l'incremento nel numero di leucociti circolanti. Il trattamento sistemico acuto (150 μ g/kg, s.c.) e ripetuto (150 μ g/Kg, s.c., 2 volte al giorno, per 6 giorni) con la molecola PC1 è in grado di ridurre, in maniera significativa, l'allodinia tattile, l'abbassamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili e l'aumento dei leucociti circolanti indotti dal G-CSF. Il predetto trattamento con PC1 riduce, ma in maniera non significativa, l'up-regolazione dei livelli di espressione di Bv8/PK2 in tutti i campioni esaminati. Il ridotto numero di leucociti circolanti, probabilmente meno ricchi in Bv8/PK2, ci fa ipotizzare che il trattamento ripetuto con PC1 esiti in un ridotto livello ematico di proteina Bv8/PK2 che potrebbe spiegare l'innalzamento della soglia nocicettiva di base a stimoli tattili. Purtroppo noi non disponiamo dei dati riguardanti i livelli ematici di proteina Bv8/PK2 perché i Kit Elisa in commercio non ci hanno permesso di dosarla. Tuttavia nel 2007 Napoleone Ferrara ha dimostrato che al 6 giorno, il trattamento sistemico ripetuto con G-CSF, determinava aumenti dei livelli sierici di Bv8/PK2, confermando, in tal modo, la nostra ipotesi.

Il fatto che il trattamento sistemico acuto con PC1 sia in grado di revertire rapidamente (in meno di 30') l'iperalgia da G-CSF, indicherebbe una sua azione diretta sui recettori PKRs dei nocicettori primari attivati da Bv8/PK2 sistemica up-regolata dal G-CSF.

Per capire se il blocco del dolore da G-CSF mediato da PC1 fosse dovuto ad un antagonismo diretto sui recettori PKRs, abbiamo cercato di chiarire il meccanismo di modulazione periferica del dolore da G-CSF.

Nel topo la somministrazione locale di G-CSF (300 ng, i.pl.) induce iperalgesia termica localizzata nella zampa ipsilaterale. La somministrazione locale di G-CSF, però, non determina né un richiamo significativo di granulociti neutrofili né aumenti significativi dei livelli di espressione di Bv8/PK2 nella zampa iniettata rispetto alla salina, indicando che l'iperlgesia da G-CSF non sia mediata dalla liberazione di Bv8/PK2 come noi avevamo ipotizzato.

Recenti dati in letteratura, inoltre, hanno dimostrato una localizzazione funzionale del recettore G-CSFR nelle colture di DRG dove la sua attivazione da parte del G-CSF provoca la traslocazione della PKC- ϵ sulla membrana plasmatica dei nocicettori e la sensitizzazione del recettore TRPV1 (Schweizorf et al., 2009). Noi abbiamo già dimostrato una cooperatività funzionale fra PKR1 e TRPV1 sui neuroni di piccolo e medio calibro dove l'attivazione del recettore PKR1 da parte di Bv8/PK2, attiva la via di trasduzione del segnale che fa capo alla fosfolipasi C (PLC) e che provoca la sensitizzazione del recettore dei vanilloidi TRPV1 (Negri et al., 2006).

Sulla base dei risultati ottenuti e delle precedenti considerazioni, è stato valutato il ruolo dei recettori PKRs e del recettore vanilloide TRPV1 nella modulazione periferica del dolore da G-CSF. Nei topi mancanti del recettore PKR1 l'iperlgesia termica indotta dal G-CSF (300 ng, i.pl.) risulta minore per intensità e durata di quella indotta nei topi Wild Type (WT) e PKR2 knock-out (KO), *suggerendo che il recettore PKR1 giochi un ruolo nell'iperlgesia termica da G-CSF*. Inoltre la somministrazione intraplantare di PC1 (50 ng, i.pl.) è in grado di revertire l'iperlgesia termica da G-CSF nei WT e nei PKR2-KO, ma risulta inefficace nei topi PKR1-KO (fino a 500 ng, i.pl.), *confermando il ruolo modulatorio di PKR1 nella iperalgesia da G-CSF*.

La somministrazione locale della molecola antagonista del recettore vanilloide TRPV1, NF1-56 HCl (50 ng, i.pl.), antagonizza nei tre genotipi (WT, PKR1-KO e PKR2-KO) l'iperlgesia termica indotta dal G-CSF.

In base ai risultati ottenuti, è plausibile ipotizzare un cross-talk funzionale tra i recettori PKR1 e G-CSFR, mediato dalla sensitizzazione del recettore vanilloide TRPV1, che potrebbe spiegare il meccanismo di modulazione periferica del dolore da G-CSF (Fig. 25).

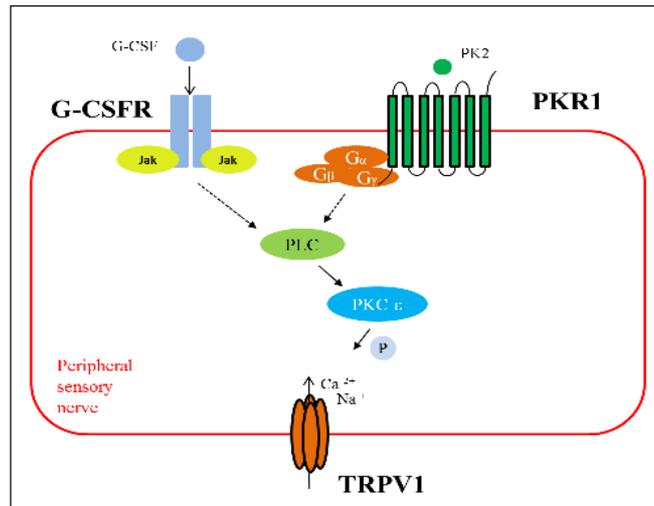


Fig. 25- *Ipotesi di cross-talk funzionale tra i recettori PKR1 e G-CSFR mediato dalla sensitizzazione del recettore TRPV1.*

Sebbene non siamo riusciti a dimostrare la presenza di Bv8/PK2 nella pelle della zampa neppure dopo iniezione di G-CSF, l'attivazione del recettore PKR1 potrebbe essere spiegata da una delle ipotesi seguenti: 1) ricordando che sono sufficienti fentomoli di Bv8/PK2 (<50) per attivare il recettore e produrre iperalgesia, è plausibile supporre che le metodiche a nostra disposizione non siano sufficientemente sensibili per rivelare livelli di espressione bassi dell'agonista Bv8/PK2. 2) una seconda suggestiva ipotesi è che il recettore PKR1 sia costitutivamente attivato.

L'uso della molecola PC1, antagonista selettivo dei recettori PKRs e preferenziale del recettore PKR1, si è dimostrato efficace nel contrastare il dolore da G-CSF, quindi PC1 potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per il controllo del dolore da G-CSF. Se questi dati verranno confermati *anche nell'uomo*, l'uso di antagonisti dei recettori PKRs costituirà un approccio innovativo per il controllo del dolore indotto da G-CSF nei pazienti oncologici in sostituzione ai farmaci oppioidi comunemente usati.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Il nostro studio ha incluso 8 pazienti di sesso femminile affetti da carcinoma della mammella infiltrante con stadiazione I ad alto rischio, II e III, radicalmente operati e sottoposti a chemioterapia secondo schema FEC-100 (Fluorouracile 500 mg/m², Epirubicina 100 mg/m², Ciclofosfamide 500 mg/m² ogni 21 giorni) e a terapia adiuvante con il G-CSF ricombinante umano (Pegfilgrastim, 100 µg/Kg, s.c.) per prevenire la neutropenia e le complicanze (infezioni, e la febbre, segno visibile di un'infezione in atto) ad essa associate. Il G-CSF (Pegfilgrastim, 100 µg/Kg, s.c.) è stato somministrato 48h dopo il primo ciclo di chemioterapia, per un totale di una singola fiala.

Lo studio è stato effettuato grazie alla stretta collaborazione con gli Oncologi, Prof. Silverio Tomao e Dr. Luigi Rossi, dell'Ospedale Santa Maria Goretti di Latina.

Tutti i pazienti hanno firmato il consenso a partecipare allo studio e al trattamento dei dati personali.

A tutti i pazienti sono stati eseguiti prelievi ematici secondo un preciso schema/prelievo, necessari per valutare i livelli di espressione di Bv8/PK2 nei leucociti circolanti isolati dal sangue intero (Real Time PCR) e i livelli ematici di proteina Bv8/PK2 (Test ELISA). Ad ogni prelievo è stato chiesto ai tutti i pazienti di assegnare al proprio dolore un punteggio numerico secondo Numerical Scale Rating (NRS).

Schema dei prelievi ematici:

- 1° prelievo: un'ora prima dell'infusione della chemioterapia (-1 giorno dal G-CSF);
- 2° prelievo: immediatamente prima della somministrazione di G-CSF (giorno 0);
- 3° prelievo: 1 giorno dopo la somministrazione del G-CSF (+1 giorno dal G-CSF);
- 4° prelievo: 2 giorni dopo la somministrazione del G-CSF (+2 giorni dal G-CSF);
- 5° prelievo: 6 giorni dopo la somministrazione del G-CSF (+6 giorni dal G-CSF);
- 6° prelievo: 8 giorni dopo la somministrazione del G-CSF (+8 giorni dal G-CSF);
- 7° prelievo: 10 giorni dopo la somministrazione del G-CSF (+10 giorni dal G-CSF).

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

I leucociti umani sono isolati dal sangue intero dei volontari sani e dei pazienti arruolati nello studio Myelostim-Neulasta, su gradiente di Ficoll (Lymphoprep, densità 1.077 g/ml, Sentinel Diagnostic, Italy). I leucociti murini sono isolati dal sangue intero dei topi controllo e dei topi trattati mediante un tampone di lisi dei globuli rossi (10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄ Cl, 0.1 mM EDTA) miscelato in un rapporto di 1:3 con il sangue. I leucociti umani, i leucociti murini, il midollo osseo e la milza prelevati dal topo sono lisati mediante un tampone RLT (RNA later) contenente sali di guanidina e successivamente omogenati. Il lisato viene poi diluito in etanolo al 70% nel rapporto 1:1. L'RNA totale viene estratto mediante colonne RNeasy (Mini Kit, Qiagen). La misurazione della concentrazione dell'RNA presente in ogni campione è effettuata mediante Saggio Fluorimetrico ed utilizzo del Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen). La Fluorescenza di ogni campione viene letta alla lunghezza d'onda di 525 nm mediante fluorimetro (VersaFluorTM Fluorometer, BIO-RAD). Le concentrazioni dei campioni sono determinate per interpolazione su di una curva standard a concentrazione nota ed espresse in ng/μl. Circa 250-500 ng di RNA purificato vengono utilizzati per la sintesi di cDNA in presenza dell'enzima retrotrascrittasi inversa MMLV-RT (Promega), in un volume finale di 20 μl.

La reazione di Retrotrascrizione (RT) prevede tre passaggi:

- 5 min a 70°, per permettere la denaturazione dell'RNA
- 60 min a 42°, temperatura ottimale per la retrotrascrizione,
- 15 min a 75, per l'inattivazione della trascrittasi inversa.

Il cDNA ottenuto mediante la reazione di RT viene sottoposto ad amplificazione mediante Real Time PCR, una reazione che permette la valutazione in termini quantitativi dell'espressione genica delle sequenze di nostro interesse. Primers specifici senso (Forward) ed antisenso (Reverse) sono stati sintetizzati (Primm, Milan Italy) per amplificare il cDNA corrispondente a PK2 nell'uomo e nel topo.

Uomo: PK2 F 5'-ATGTGCTGTGCTGTCAGTAT-3'

R 5'-AAAATGGAACCTTACGAGTCA-3' (103bp)

Topo: PK2 F 5'-CTCGGAAAGTTCCATTTTGG-3'

R 5'-AAAATGGAACCTTACGAGTCA-3' (113bp)

L'espressione del gene housekeeping della β-actina è stata usata come controllo per normalizzare l'espressione del gene di interesse, Uomo-PK2 o Topo-PK2, in ogni campione esaminato. Ogni reazione che contiene l'opportuna coppia di primers, 5 μl di cDNA ed il SYBR green (SensiMix

SYBR & Fluorescein Kit, Bioline), viene sottoposta a PCR, utilizzando il termociclatore iCycler (Bio-Rad) nelle seguenti condizioni termiche, per quarantacinque cicli:

- 30 sec a 94°
- 30 sec a 52° (Uomo-PK2) e a 56° (Topo-PK2)
- 30 sec a 72°

L'iCycler registra in tempo reale l'andamento della fluorescenza emessa dal fluoroforo SYBR green in ogni reazione, che risulta direttamente proporzionale alla quantità di amplificato presente ad ogni ciclo di PCR. Si definisce ciclo soglia (Threshold cycle, Ct), il ciclo della reazione di PCR in cui la fluorescenza del campione in esame supera il livello della fluorescenza di base (Threshold line).

Il confronto del valore del ciclo soglia per il gene d'interesse, normalizzato per il ciclo soglia della β -actina, permette di determinare il livello di espressione relativa, in base alla seguente formula:

$$\text{espressione relativa} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

dove, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gene di interesse}} - \Delta Ct_{\text{controllo}}$; $\Delta Ct = Ct_{\text{gene di interesse}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$

L'identità di ogni amplificato viene verificata effettuando la curva di melting: ogni reazione, gradualmente scaldata da 50° a 90°, emette un picco di fluorescenza che corrisponde alla temperatura di fusione caratteristica per il prodotto amplificato.

Valutazione dei livelli ematici di Bv8/PK2 (Test ELISA)

I livelli ematici di Bv8/PK2 sono valutati con il Kit Elisa per la Prochineticina 2 umana (Uscn Life Science Inc.).

In ciascun pozzetto della piastra, cui è adsorbito un anticorpo primario policlonale specifico per la PK2, vengono aggiunti 50 μ l di campione o di PK2 standard e 50 μ l di Detection Reagent A. La piastra viene, quindi, incubata per 1 h a 37°C. Successivamente, ciascun pozzetto è sottoposto a tre cicli di lavaggio con Wash Buffer (350 μ l); subito dopo, vengono aggiunti 100 μ l di Detection Reagent B e la piastra viene incubata per altre 30 minuti a 37°C a cui fanno seguito 5 cicli di lavaggio con Wash Buffer (350 μ l). Ad ogni pozzetto vengono, poi, aggiunti 90 μ l di TMB substrato e la piastra è incubata per 20 minuti a 37°C, protetta dalla luce. Questo passaggio è importante affinché avvenga la reazione colorimetrica. Ad ogni pozzetto vengono, poi, aggiunti 50 μ l di Stop Solution e, infine, si legge la Densità Ottica alla lunghezza d'onda di 450 nm con un

lettore di micropiastre (BIOTEK EL808). Le concentrazioni di Bv8/PK2 dei nostri campioni sono espresse in pg/ml.

Modelli cellulari e relativa tecnica di coltura

La linea cellulare utilizzata per gli esperimenti di Western Blotting, è quella delle cellule CHO (Chinese Hamster Ovary cells) stabilmente transfettate con i recettori PKR1 e PKR2 delle prochineticine (gentile concessione Dr Hui Tian, Tularik, San Francisco, U.S.A.)

Le cellule CHO sono state coltivate in terreno DMEM-F12 addizionato con 10% di siero fetale bovino (FCS), 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomina e 1% di L-glutamina. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni allo scopo di evitare una acidificazione eccessiva.

I cloni stabili CHO esprimenti i recettori PKR1 e PKR2 sono stati mantenuti in presenza di 0.2 mg/ml di G418 solfato (geneticina) al fine di mantenere in selezione le cellule esprimenti i recettori. Raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate dalle fiasche utilizzando una soluzione 1mM di EDTA diluito in PBS. Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm² e mantenute in incubatore Haereus a 37°C, in atmosfera satura di umidità e in presenza di 5% CO₂.

Western Blotting e SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Le cellule CHO-R1, stabilmente transfettate con il recettore PKR1 umano, sono state utilizzate nel saggio funzionale del Western Blotting, per valutare la capacità di PC1, molecola antagonista dei recettori PKRs, di bloccare la fosforilazione delle MAPK indotta da Bv8/PK2.

Per il saggio funzionale del Western Blotting, le cellule CHO-R1, sono piastrate in dish per colture da 6 pozzetti (Nunc), alla densità di 4×10^4 cellule/pozzetto. Una volta raggiunta la subconfluenza, le colture di cellule CHO-R1 vengono mantenute 16 ore a 37°C in assenza di FBS (Fetal Bovine Serum), in modo da ridurre al minimo l'attività basale di p44/42 MAPK. Il giorno dell'esperimento, dopo aver effettuato gli stimoli, le cellule CHO-R1 vengono prima trattate con il buffer di lisi (10 mM TRIS HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 1% TRITON; 1 mM EDTA; 10% glicerolo; inibitori delle proteasi: - 1 mM PMSF; -10 µg/ml leupeptina; -10 µg/ml aprotinina; inibitori delle fosfatasi: -1 mM NaV; - 50 mM NaF; - 25 mM β-glicerofosfato) e, poi, lasciate in ghiaccio per 10'. In seguito si centrifugano per 10' a 14000 rpm. Gli estratti proteici, contenuti nel sopranatante, vengono raccolti e conservati a -20°C.

Un'aliquota dei campioni è usata per la determinazione del contenuto proteico. La concentrazione proteica viene determinata mediante Saggio Clorimetrico di Bradford e l'utilizzo del colorante Protein-Assay (BIORAD). Nel Saggio Colorimetrico di Bradford, il colorante Coomassie Blue forma composti colorati in "blu" con le proteine, tramite legami elettrostatici proteina-gruppi

sulfonici del colorante in soluzione acida. A pH acido il colorante non legato alle proteine ha due picchi di assorbimento nel visibile, a 470 e a 650 nm; quando si lega ad una proteina ha un picco massimo di assorbimento a 595 nm. La lettura della concentrazione delle proteine è effettuata a 595 nm tramite spettrofotometro (GeneQuant *pro*), precedentemente calibrato con una curva standard allestita con una soluzione di albumina a concentrazione nota.

Le proteine estratte dalle cellule CHO-R1 sono separate mediante SDS-PAGE, su gel di poliacrilammide al 10% composto da:

RUNNING gel per 10 ml:

3.35 ml H₂O;

4 ml acrilammide;

2.5 ml di Tris/HCl 1,5 M pH 8.8 ;

100 µl SDS 10%;

100 µl APS 10%;

10 µl TEMED.

STACKING gel per 10 ml:

1.5 ml di H₂O;

330 µl di acrilammide/bis;

630 µl di Tris/HCl 0,5M pH 6.8;

25 µl di TEMED 10%;

25 µl di APS 10%;

5 µl di TEMED

Di ogni campione si caricano 40 µg. La separazione elettroforetica che viene eseguita utilizzando un apparato elettroforetico (BioRad Mini Protean II Cell, Hercules, USA), è condotta a 50mA per superare lo stacking e in seguito a 70mA per circa 3 ore, utilizzando come soluzione conduttrice il Running Buffer 1X (1g Tris; 14g Glicina; SDS 1% in un litro di acqua distillata). Al termine della corsa le proteine del gel sono trasferite su una membrana di nitrocellulosa Hybond C (Amershan Pharmacia) in un sistema di trasferimento contenente Transfer Buffer 1X (1g tris; 14,4g di Glicina; 200ml di metanolo in un litro di acqua distillata). Il trasferimento viene effettuato per un ora a 120mV, usando un sistema *semidry electroblotting* (BioRad, Transblot SD). Dopo il trasferimento la membrana è immersa nel colorante Rosso Ponceau allo scopo di verificare l'esatto caricamento e trasferimento delle proteine. La membrana è quindi saturata per un ora in soluzione di Blotting

(1% di latte; 1% di BSA in TBS-Tween allo 0,005%) e incubata per tutta la notte con l'anticorpo policlonale anti-pERK1/2, 1:1000 (Cell Signaling).

Successivamente vengono effettuati 3 lavaggi di 15' con TBS-Tween allo 0,005% e quindi si procede all'incubazione con la "perossidasi di rafano" coniugata con l'opportuno anticorpo secondario diluito in soluzione di Blotaggio per un ora. La membrana è nuovamente sottoposta a 3 lavaggi per 15' con TBS-Tween allo 0,005%.

Le proteine immunoreattive sono poi rilevate tramite chemiluminiscenza trattando la membrana per 1' con ECL (Amersham, Arlington Heights, IL). La membrana è quindi trasferita insieme alla lastra di sviluppo nell'apposita cassetta. Dopo un tempo di esposizione variabile la lastra viene sviluppata.

Le immagini delle lastre sono poi acquisite al computer tramite scanner in formato TIF ed elaborate tramite il programma Scion Image (NIH). Il programma è in grado di convertire l'intensità della banda in valori numerici.

Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati topi adulti CD1 Wild Type (WT) maschi del peso di 30-35 grammi (gr) e topi C57BL/6 PKR1-KO e PKR2-KO generati dalla Lexicon Genetics (The Woodlands, TX).

Gli animali sono stati stabulati in condizioni standard di luce (illuminazione dalle 7:00 alle 19:00), di temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e di umidità relativa ($60\% \pm 10\%$), con cibo ed acqua “*ad libitum*”.

Per ogni test nocicettivo e per ogni dose di sostanza iniettata, sono stati utilizzati gruppi di almeno cinque animali. Tutte le procedure sperimentali utilizzate in questo lavoro sono in accordo con le direttive del Ministero Italiano Della Salute (D.L.116/92).

Test per la valutazione del dolore

Permettono la valutazione della soglia nocicettiva di animali sottoposti ad uno stimolo algogeno. Per la valutazione della soglia nocicettiva, è fondamentale ottenere delle risposte costanti e ripetibili; a tal fine, nei giorni precedenti l'esperimento gli animali devono essere abituati all'ambiente dove si effettua il test e in alcuni casi al test stesso, per evitare alterazioni delle risposte dovute allo stress. Il giorno dell'esperimento il test viene effettuato due volte, a distanza di 30 minuti, prima della somministrazione della sostanza e la media dei due valori rappresenta la soglia nocicettiva di base (NTb). La variazione di tale parametro, indotta dalla somministrazione del composto in studio, viene seguita nel tempo ad intervalli stabiliti. Il test viene condotto su entrambe le zampe in modo alternato e il valore registrato è la media di tre misure consecutive (NTts).

Schema sperimentale degli esperimenti

Somministrazione acuta di G-CSF

Nei topi (n=5) il G-CSF è stato somministrato alle dosi di 1, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{topo}$. Le dosi di 1 e 5 μg sono state somministrate per via intraplantare (i.pl.) in un volume di 20 μl nella zampa posteriore del topo; la salina è stata iniettata in un volume di 20 μl per via intraplantare (i.pl.) nella zampa controlaterale. L'allodinia tattile è stata misurata immediatamente prima della somministrazione del G-CSF e per 8h (1 volta ogni ora) dopo il trattamento con G-CSF. Il G-CSF è stato somministrato per via sottocutanea (s.c.) alla dose di 10 $\mu\text{g}/\text{topo}$. L'allodinia tattile è stata misurata immediatamente prima della somministrazione del G-CSF e per 10h (1 volta ogni ora) dopo il

trattamento con G-CSF. I topi trattati e i topi controllo sono stati sacrificati per il prelievo di sangue, milza e midollo osseo, a 5h dall'iniezione di G-CSF, ovvero al picco dell'allodinia tattile.

Somministrazioni sistemiche ripetute di G-CSF

Il G-CSF è stato somministrato alla dose di 10 µg, s.c. una volta al giorno per 6 giorni. Un gruppo di topi (n=5) è stato pre-trattato con salina o con PC1 (150 µg/kg, s.c.) 2 volte al giorno (-10' e a 3h dal trattamento con G-CSF). L'allodinia tattile è stata misurata ogni giorno: immediatamente prima del trattamento con G-CSF, per 10h dopo somministrazione acuta di G-CSF (1 volta ogni ora) e alla fine del predetto trattamento giornaliero per ognuno dei 6 giorni. A 6 giorni dall'inizio del trattamento con G-CSF, gli animali trattati e controllo sono stati sacrificati per il prelievo di sangue, milza e midollo osseo.

Somministrazione locale di G-CSF

Nei topi (n=5) il G-CSF è stato iniettato in un volume di 20 µl nella regione plantare della zampa posteriore destra; la salina è stata iniettata in un volume di 20 µl per via intraplantare (i.pl.) nella zampa posteriore controlaterale. L'iperalgia termica è stata misurata immediatamente prima della somministrazione di G-CSF e per 8h (1 volta ogni ora) dal predetto trattamento. I topi trattati e controllo sono stati sacrificati per il prelievo della zampa posteriore, a 4h dall'iniezione di G-CSF, ovvero al picco dell'iperalgia termica.

Test Termici

PAW-IMMERSION TEST

Con questo test si misura il tempo di retrazione della zampa del topo, quando questa viene immersa in un bagno termostato a 48°C.

L'animale viene preso afferrando la plica cutanea dorsale del collo tra pollice ed indice della mano dell'operatore e posizionando poi la coda tra le restanti tre dita della stessa mano; a questo punto la zampa trattata con la sostanza e la zampa controlaterale, vengono immerse nel bagno, in modo alternato, per tre volte. Contemporaneamente, ad ogni immersione della zampa dell'animale si attiva un cronometro, tramite un pulsante, per registrare il tempo, in secondi, che intercorre tra l'immersione e la retrazione della zampa dell'animale dalla fonte dolorosa (risposta dell'animale allo stimolo doloroso).

PLANTAR-TEST: con questo test è possibile valutare la sensibilità dell'animale ad uno stimolo termico radiante applicato sulla pianta delle zampe (Hargreaves et al., 1988). Le misurazioni sono effettuate su animali non costretti infatti i topi vengono collocati singolarmente in gabbie trasparenti cubiche di plexiglass, separate le une dalle altre da una parete opaca e lasciati abituare al loro ambiente 30 minuti prima di iniziare i tests. Nelle gabbie i topi poggiano su un pavimento di plexiglass che li separa da una sorgente in grado di generare radiazioni infrarosse (I.R.); la sorgente viene posizionata direttamente sotto la zampa posteriore dell'animale e pigiando un pulsante, si attiva sia la radiazione I.R. che un timer digitale. Quando l'animale sente dolore e ritrae la zampa la radiazione cessa e il timer si blocca, rilevando il tempo di latenza intercorso tra l'applicazione dello stimolo termico e la risposta da parte dell'animale. L'I.R., viene calibrata in modo tale da ottenere un tempo di latenza, negli animali di controllo, tra gli 8 e gli 11 secondi.

Test Tattili

VON-FREY: è un test che ci permette di valutare l'allodinia, ossia uno stimolo normalmente innocuo, che viene recepito come nocivo. In questo test, gli animali vengono posti in recinti di plexiglass su una grata metallica. Come stimolo tattile vengono utilizzati una serie di filamenti di nylon di diametro crescente, a cui corrisponde una scala di forza espressa in grammi (da 0.07 a 6 g per i topi e da 1,56 a 15,0 g per i ratti). I filamenti vengono applicati, uno per volta, perpendicolarmente alla superficie della zampa posteriore (ipsilaterale e contro laterale) o sulla fronte dell'animale per 7 secondi e la soglia nocicettiva determinata secondo il metodo "up and down" descritto da Dixon (Dixon et al., 1980).

Elaborazione dei dati

In tutti i tests di tipo tattile e termico l'effetto della sostanza in esame è stato calcolato come variazione percentuale nella soglia nocicettiva rispetto alla soglia di base (% Δ NT), secondo la seguente formula:

$$\% \Delta NT = (NT_{ts} - NT_b) / NT_b \times 100$$

dove NT_{ts} indica la soglia nocicettiva dopo il trattamento che è stato valutato ad intervalli di tempo regolari fino al termine dell'effetto della sostanza testata.

Misura dell'infiltrazione granulocitaria nella regione plantare delle zampe posteriori del topo: saggio della mieloperossidasi (MPO)

Il saggio dell'MPO consente di valutare l'attività della mieloperossidasi, un enzima contenuto nei granuli azzurofilari intracellulari dei granulociti polimorfonucleati (PMNs).

L'attività mieloperossidasi è usata come indice di accumulo dei neutrofili nella regione plantare delle zampe posteriori (ipsilaterale e controlaterale) del topo trattate o con G-CSF o salina. I topi vengono sacrificati al picco dell'iperalgia mediante inalazione di CO₂ e i campioni di tessuto di zampa sono stati raccolti in 2.0 ml di K₂HPO₄ 50 mM (pH = 6.0) contenente 0.5 % di bromuro esadeciltrimetilammonio (HTAB), omogenati, sonicati, sottoposti a 3 cicli di congelamento e scongelamento (un ciclo = 15 minuti a -80°C o a 37°C), sonicati di nuovo e centrifugati a 40000 g per 15 minuti a 4°C. Al surnatante recuperato è aggiunto K₂HPO₄ 50 mM, pH = 6.0, contenente 0.167 mg/ml di dianisidina-O-dicloridrato e 0.0005% di H₂O₂. L'attività mieloperossidasi di ciascun campione è analizzata a 460 nm con uno spettrofotometro. Il numero dei neutrofili richiamati è estrapolato da una curva standard dove a un numero noto di neutrofili peritoneali (ottenuti dopo induzione di peritonite con 1% di glicogeno d'ostrica) corrisponde un determinato valore d'assorbimento.

Separazione e Conta dei Leucociti nel sangue di topo

Questo metodo ci ha permesso di determinare il numero di leucociti circolanti nei topi trattati con G-CSF rispetto ai topi controllo trattati con salina.

Il giorno dell'esperimento, dopo aver effettuato gli stimoli, gli animali vengono sacrificati e il sangue è prelevato per decapitazione in tubi sterili trattati con Na₂EDTA 10 %.

Successivamente il sangue viene miscelato, in un rapporto di 1:3, con il tampone di lisi dei globuli rossi (10 mM KHCO₃, 155 mM NH₄Cl, 0.1 mM EDTA) e quindi posto in agitazione blanda per 10' a temperatura ambiente, fino a raggiungimento della "laccatura del sangue", segno visibile di avvenuta lisi dei globuli rossi. Avvenuta la "laccatura del sangue", i tubi vengono centrifugati per 10' a 4 °C a 1200 rpm. Terminata la centrifuga, il pellet di cellule contenente i leucociti, è raccolto, risospeso in PBS 1X (Phosphate Buffer saline) e infine, in seguito ad opportuna diluizione, un'aliquota del pellet risospeso è utilizzata per la conta cellulare mediante Microscopio ottico (T1-SM, Nikon) e la camera di Burker.

Sostanze

Bv8 è stato estratto dalle secrezioni cutanee della pelle della rana *Bombina variegata*, ottenuta in seguito a blanda stimolazione elettrica, purificato al 98% mediante HPLC (Mollay et al., 1999); infine è stato diluito in soluzione fisiologica sterile (0.9% NaCl).

Le molecole di sintesi, sciolte in dimetilsolfossido (DMSO) al 10%, sono opportunamente diluite in soluzione fisiologica sterile.

Il Myelostim (Italfarmaco S.p.a, Italy) ci è stato gentilmente donato dal Prof. Silverio Tomao e dal Dr. Luigi Rossi, dell'Ospedale Santa Maria Goretti di Latina.

Tutti i composti vengono somministrati, a diluizione opportuna per diverse vie:

- per via sottocutanea (s.c.) in un volume 50 μ l/10g b.w. nel topo;
- e per via intraplantare (i.pl.) in un volume di 20 μ l nella zampa posteriore del topo.

Analisi Statistica

I punti sperimentali sono stati espressi come medie \pm errore standard. Tutti i dati sono stati elaborati al computer utilizzando il programma Prism 4.0, con Two-way ANOVA, Bonferroni test. Sono state considerate come differenze significative quelle con un valore di $p \leq 0.05$ (*), come molto significative quelle con $p \leq 0.01$ (**), e come altamente significative quelle con $p \leq 0.001$ (***)).

BIBLIOGRAFIA

Akgul C, Moulding DA, Edwards SW., (2001); "Molecular control of neutrophil apoptosis" *FEBS Lett.*; 487(3):318-22.

Bober LA, Grace MJ, Pugliese-Sivo C, Rojas-Triana A, Waters T, Sullivan LM, Narula SK., (1995) "The effect of GM-CSF and G-CSF on human neutrophil function". *Immunopharmacology*. 29(2):111-9.

Bobrowski wf, McDuffie je, Sobocinski g, Chupka j, Olle e, Bowman a, Albassam m., (2005). "Comparative methods for multiplex analysis of cytokine protein expression in plasma of lipopolysaccharide-treated mice". *Cytokine*; 32 (5) pp. 194-8.

Bullock C.M., Li and D.J. Zhou Q.Y., (2004): "Structural determinants required for bioactivities of prokineticins and identification of prokineticin receptor antagonists." *Molecular Pharmacology* 65 p. 582–588

Cabrera-Vera, T.M., et al., (2003); "Insights into G protein structure, function, and regulation". *Endocr Rev.*, 24(6): p. 765-81.

Carvalho TT., Flauzino T., Otaguiri ES., Batistela AP., Zarpelon AC., Cunha TM., Ferreira SH., Cunha FQ., Verri WA Jr., (2011): "Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induces mechanical hyperalgesia via spinal activation of MAP kinases and PI3K in mice". *Pharmacol Biochem Behav.* 98(2):188-95.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D., (1997): "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway". *Nature* , 389 (6653): 816-824.

Cheng M.J., Bullock C.M., Li C., Lee A.G., Bermak J.C., Belluzzi J., Weaver D.R., Leslie F.M. and Zhou Q.Y., (2002): "Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus." *Nature* 417, p. 405–410.

Chucklovin A., (2000): "Enhanced ex vivo apoptosis of peripheral granulocytes is a sufficient factor of neutropenia following myeloablative chemotherapy". *Leuk Res* 24:507-9.

Cunha Thiago M., Waldiceu A. Verri, Jr., Ieda R. Schivo, Marcelo H. Napimoga†, Carlos A. Parada, Stephen Poole‡, Mauro M. Teixeira§ Sergio H. Ferreira and Fernando Q. Cunha., (2008). “Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception”. *Journal of Leukocyte Biology* 83, pp.824-831.

De Koning JP, Soede-Bobok AA, Ward AC, Schelen AM, Antonissen C, van Leeuwen D, Löwenberg B, Touw IP., (2000). "STAT3-mediated differentiation and survival of myeloid cells in response to granulocyte colony-stimulating factor: role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (Kip1)". *Oncogene*, 19(29):3290-8.

Demetri GD, Griffin JD., (1991): "Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor." *Blood*. 78(11):2791-808. Review.

Ferrara N., (2001): “Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium.” *Nature* 412, pp. 876–884.

Ferrara N., Frantz G., LeCouter J., Dillard-Telm L., Pham T., Draksharapu A., Giordano T. and Peale F., (2003). “Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries”. *American Journal of Pathology* 162, pp. 1881–1893

Fields HL, Heinricher M , Mason P., (1991) “Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits”. *Annu Rev Neurosci* 14: 219-45. Review .

Fields HL, Malick A., Burstein R., (1995). “Dorsal horn projections targets of ON and OFF cells in the rostral ventromedial medulla”. *J Neurophysiol* 74: 1742-1759.

Fields HL, Bausbaum AI., (1999). “Central nervous system mechanisms of pain modulation ”. In: *Wall PD., Melzack R. (Eds). Textbook of Pain. Edinburgh: Churchill Livistone, 123: 43-52.*

Fields HL ., (2004). “State-dependent opioid control of pain”. *Nat Rev Neurosci*, 5: 565-575.

Franchi S., Giannini E., Lattuada D., Lattanzi R., Tian H., Melchiorri P., Negri L., Panerai A.E. and Sacerdote P., (2008) The prokineticin receptor agonist Bv8 decreases IL-10 and IL-4 production in mice splenocytes by activating prokineticin receptor-1. *BMC Immunol* 9: 60–73

Fukunaga R, Seto Y, Mizushima S, Nagata S., (1990) "Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 8702-8706.

Giannini E, Lattanzi R., Nicotra A., Campese A.F., Gazioli P., Screpanti I., Balboni G., Salvadori S., Sacerdote P. e Negri L., (2009). "The chemokine Bv8/prokineticin 2 is up-regulated in inflammatory granulocytes and modulates inflammatory pain". *PNAS* 106; pp. 14646-14651.

Green MD et al., (2003) "A randomized double-blind multicenter phase III study of fixed-dose single-administration pegfilgrastim versus daily filgrastim in patients receiving myelosuppressive chemotherapy". *Ann Oncol* 14: 29, 2003

Hepler J.R. and A.G. Gilman., (1992); "G proteins". *Trends Biochem Sci*, 17(10): p. 383-7.

Holmes FA et al., (2002). "Blinded, randomized, multicenter study to evaluate single administration pegfilgrastim once per cycle versus daily filgrastim as an adjunct to chemotherapy in patients with high-risk stage II or stage III/IV breast cancer". *J Clin Oncol* 20: 727.

Hyun Kyung K, De La Luz Sierra M, Cassin Kimmel Williams, A. Virginia Gulino, and Tosato G. (2006). " G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells". *Blood* 108: 812-820.

Hunt SP et al., (1987) "Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation". *Nature*, 328: 632-4

Iida N., Haisa, M., Igarashi, A., Pencev, D. and Grotendorst, G.R., (1996) "Leukocyte-derived growth factor links the PDGF and CXC chemokine families of peptides". *Faseb J*; 10: 1336-45.

Jilek A, Engel E, Beier D, Lepperdinger G., (2000): "Murine Bv8 gene maps near a synteny breakpoint of mouse chromosome 6 and human 3p21". *Gene*, 256 (1-2): p. 189-95.

Johnston E., (2000) "Randomized, dose-escalation study of SD/01 compared with daily filgrastim in patients receiving chemotherapy". *J Clin Oncol* 18: 2522, 2000

Jordt SE, Tominaga M, Julius D., (2000):" Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(14):8134-9.

Joubert F.J. and Strydom D.J., (1980). "Snake venom. The amino acid sequence of Protein A from *Dendroaspis polylepis* (black mamba) venom". *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie* 361, pp. 1787–1794

Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U. (1999): "Capsaicin binds to the intracellular domain of the capsaicin-activated ion channel "*Neurosci*, 19(2):529-38.

Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM., (1992) "Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils". *J Exp Med*; 176: 587-92.

Kawakami M., Tsutsumi H., Kumakawa T., Abe H., Hirai M., Kurosawa, S., Mori, M., and Fukushima, M., (1990). "Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections". *Blood* 76:1962-1964

Kaser A., Winklmayr M., Lepperdinger G. and Kreil G., (2003): "The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions." *EMBO Reports*, 4: p. 469–473.

Khandaker MH, Mitchell G, Xu L, Andrews JD, Singh R, Leung H, Madrenas J, Ferguson SS, Feldman RD, Kelvin DJ., (1999) "Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression". *Blood*; 93: 2173-85.

Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y., (2003): "Two novel Bv8-like peptides from skin secretions of the toad *Bombina maxima*". *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*;134(3): p.509-14.

Lattanzi R., Giannini E. and Negri L., (2001). "Bv8, a small protein from frog skin induces antidiuresis in rats. *Pharmacol. Res.* 43 (A), 30

Lattanzi R, Sacerdote P, Franchi S, Canestrelli M, Miele R, Barra D, Visentin S, Denuccio C, Porreca F, De Felice M, Guida F, Luongo L, de Novellis V, Maione S, Negri L., (2012). "Pharmacological activity of a Bv8 analogue modified in position 24". *Br J Pharmacol.*;166(3):950-963.

LeCouter., Kowalski J., Foster J., Hass P., Zhang Z., Dillard-Telm L., Frantz G., Rangell L., DeGuzman L., Keller GA., Peale F., Gurney A., Hillan KJ., Ferrara N., (2001) "Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium". *Nature.* 412(6850):877-84

LeCouter J., Lin R., Frantz G., Zhang Z., Hillan K. and Ferrara N., (2003): "Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis." *Endocrinology* 144, p. 2606–2616.

LeCouter J., Lin R., Tejada M., Frantz G., Peale F., Hillan K.J. and Ferrara N., (2003): "The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: localization of Bv8 receptors to endothelial cells." *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 100, p. 2685–2690.

Li M., Bullock C.M., Knauer D.J., Ehlert F.J. and Zhou Q.Y., (2001): "Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle". *Molecular Pharmacology* 59, pp. 692–698.

Li J.D., Hu W.P., Boehmer L., Cheng M.Y., Lee A.G., Jilek A., Siegel J.M. and Zhou Q.Y., (2006): "Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene." *Journal of Neuroscience* 26, p. 11615–11623.

Lukacs NW, Prosser DM, Wiekowski M, Lira SA, Cook DN (2001). "Requirement for the chemokine receptor CCR6 in allergic pulmonary inflammation". *J Exp Med*; 194: 551-5.

- Luo HR, Loison F., (2008); "Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation". *Am J Hematol* 83(4):288-95. Review
- Malberg A.B., Yaksh T .L., (1992a). "Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or SP receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition". *Science* 257: 1276-1279.
- Mannion RJ, Woolf CJ., (2000): "Pain mechanisms and management: a central perspective." *Clin J Pain*, 16 (3 Suppl):S144-56. Review.
- Martucci C, Franchi S, Lattuada D, Panerai AE, Sacerdote P., (2007): "Differential involvement of relb in morphine-induced modulation of chemotaxis , NO and cytokine production in murine macrophages and lymphocytes." *J Leukoc Biol*, 81:344-354.
- Masuda Y., Takatsu Y., Terao Y., Kumano S., Ishibashi Y., Suenaga M., Abe M., Fukusumi S., Watanabe T., Shintani Y., Yamada T., Hinuma S., Inatomi N., Ohtaki T., Onda H. and Fujino M., (2002): "Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293, p. 396-402.
- McLemore ML, Grewal S, Liu F, Archambault A, Poursine-Laurent J, Haug J, Link DC., (2001). "STAT-3 Activation Is Required for Normal G-CSF-Dependent Proliferation and Granulocytic Differentiation". *Immunity*, 14(2):193-204.
- Melchiorri D., Bruno V., Besong G., Ngomba R., Cuomo L., Deblasi A., Copani A., Moschella C., Storto M., Nicoletti F., Lepperdinger G. and Passarelli F., (2001): "The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways." *European Journal of Neuroscience* 13, p. 1694-1702.
- Mendell LM., (1966): "Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord." *Exp Neurol*.16(3):316-32.
- Mense S and Simons DG Muscle pain., (2001). Understanding its nature, diagnosis, and treatment. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Merskey H., (1979) Pain Terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6:249-52

Merskey H and Bogduk N., (1994). "Classification of Chronic Pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms". 2nd edn. Seattle: IASP Press.

Metcalf D., (1993) "Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?" *Blood*. 82(12):3515-23.

Miele R., Lattanzi R., Bonaccorsi di Patti M.C., Paiardini A., Negri L. and Barra D., (2010) "Expression of Bv8 in *Pichia pastoris* to identify structural features for receptor binding". *Protein Expr Purif.*, 73:10-4.

Mollay C., Wechselberger C., Mignogna G., Negri L., Melchiorri P., Barra D. and Kreil G., (1999). "Bv8, a small protein from frog skin and its homolog from snake venom induce hyperalgesia in rats". *European Journal of Pharmacology* 374, pp. 189–196.

Moore AK, Kohno T, Karchewski LA et al., (2002) "Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord". *J Neurosci*, 22: 6724-6731.

Morikawa K, Morikawa S, Nakamura M, Miyawaki T., (2002)., "Characterization of granulocyte colony stimulating factor receptor expressed on human lymphocytes". *Br J Haematol*; 118: 296-304.

Morstyn G, Foote M, Lieschke GJ., (1996); "Hematopoietic growth factors in cancer chemotherapy". *Cancer Chemother Biol Response Modif*. 16:295-314.

Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Metere A., Colucci M., Barra D., Kreil G. and Melchiorri P., (2002): "Nociceptive sensitisation by the secretory protein Bv8." *British Journal of Pharmacology* 137, p. 1147–1154.

Negri L., Lattanzi R., Giannini E., De Felice M., Colucci A. and Melchiorri P., (2004): “Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats.” *British Journal of Pharmacology* 142, p. 141–151.

Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Colucci A., Mignogna G., Barra D., Grohovaz F., Codazzi F., Kaiser A., Kreil G. and Melchiorri P., (2005): “Biological activities of Bv8 analogues.” *British Journal of Pharmacology* 146, p. 625–632.

Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Melchiorri P., (2006): “Modulators of pain: Bv8 and prokineticins”. *Curr Neuropharmacol* 4(3): 207-215.

Negri L., Lattanzi R., Giannini E., Melchiorri P., (2007): “Bv8/prokineticin proteins and their receptors”. *Life Sci* 81:1103–1116.

Nicola, N.A., and Metcalf, D., (1985). "Binding of 125I-labeled granulocyte colony stimulating factor to normal murine hemopoietic cells". *J Cell Physiol* 124:313-321.

Schweizerhof M., Stösser S., Kurejova M., Njoo C., Gangadharan V., Agarwal N., Schmelz M., Bali KK., Michalski CW., Brugger S., Dickenson A., Simone DA., Kuner R., (2009): "Hematopoietic colony-stimulating factors mediate tumor-nerve interactions and bone cancer pain". *Nat Med.*, 7:802-7.

Shojaei F., Wu X., Zhong C., Yu L., Liang XH., Yao J., Blanchard D., Bais C., Peale FV., van Bruggen N., Ho C., Ross J., Tan M., Carano RA., Meng YG., Ferrara N., (2007): "Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis". *Nature.*, 7171:825-31.

Soga T. Matsumoto S., Oda T., Saito T., Hiyama H., Takasaki J., Kamohara M., Ohishi T., Matsushime H. and Furuichi K., (2002): “Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1579, p. 173–179.

Stösser S, Schweizerhof M, Kuner R. (2010). "Hematopoietic colony-stimulating factors: new players in tumor–nerve interactions". *J Mol Med (Berl)* 89(4):321-9.

Tian SS., (1994) "Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor". *Blood* ., 84(6):1760-4.

Torres G., et al. (2001); "Expression of the HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 on placental macrophages and the effect of IL-10 on their expression". *Placenta*., 22 Suppl A: p. S29-33.

Tsuji k., and Ebihara Y., 2001. "Expression of G-CSF receptor on myeloid progenitors". *Leuk Lymphoma*, 42:1351-7.

Vellani V, Colucci M, Lattanzi R, Giannini E, Negri L, Melchiorri P, McNaughton PA., (2006). "Sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 by the prokineticin receptor agonist Bv8" *J Neurosci*. 26(19):5109-16.

Vidal-Mosquera M, Fernández-Carvajal A, Moure A, Valente P, Planells-Cases R, González-Ros JM, Bujons J, Ferrer-Montiel A, Messeguer A., (2011). "Triazine-based vanilloid 1 receptor open channel blockers: design, synthesis, evaluation, and SAR analysis". *J Med Chem.*; 54(21):7441-52

Watkins LR and Maier S (2002) "Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states". *Physiol Rev*, 82: 981-1011.

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

Wechselberger C., Puglisi R., Engel E., Lepperdinger G., Boitani C. and Kreil G., (1999). "The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes". *FEBS Letters* ,462 pp. 177–181.

Welte K, Platzer E, , Gabilove JL, Lu L, Harris P, Mertelsmann R, Moore MA., (1985): "Biological activities of a human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor on normal and leukemic cells". *J Exp Med*. 162(6):1788-801.

Westlund KN, Bowker RM, Ziegler M G., et al (1983). "Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat". *Brain Res*, 263: 15-31.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schroder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6". *Science*; 286: 525-8.

Zhang Y, Cheng G, Yang K, Fan R, Xu Z, Chen L, Li Q, Yang A, Jin B., (2009). "A novel function of granulocyte colony-stimulating factor in mobilization of human hematopoietic progenitor cells". *Immunol Cell Biol.* 87(5): 428-32

Zhu QS, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ., (2006). "G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth". *Blood*, 107(5):1847-56.