



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

---

Dipartimento di Farmacologia

Dottorato di Ricerca in  
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

**INDAGINE SUL COINVOLGIMENTO DEL SISTEMA  
NEUROPEPTIDERGICO NOCICETTINA/RECETTORE  
NOP A CARICO DELLA TRASMISSIONE NOCICETTIVA**

*Presentata da:*

Dott. Giuseppe Lopetuso

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Giorgio Cantelli Forti**

**Tutore:**

**Dott. Sanzio Candeletti**

**XIX CICLO**

**[2004-2006]**

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	5
<b>1. INTRODUZIONE</b>	
<b>1.1 La nocicettina e il suo recettore</b>	9
1.1.1 Il recettore per la nocicettina	9
1.1.2 Il neuropeptide nocicettina	13
1.1.3 Effetti farmacologici della nocicettina	18
1.1.4 Analoghi della nocicettina	24
1.1.5 I dendrimeri	31
1.1.6 Analoghi non peptidici della nocicettina	36
<b>1.2 Il sistema nocicettina/NOP e il sistema oppioide</b>	37
<b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>	39
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	
<b>3.1 Animali</b>	43
<b>3.2 Farmaci</b>	43
<b>3.3 Metodiche sperimentali</b>	45
3.3.1 Incannulazione cronica dello spazio subaracnoideo	45
3.3.2 Incannulazione cronica intracerebroventricolare	47
3.3.3 Impianto di minipompe osmotiche	48
3.3.4 Perfusionone spinale	49
3.3.5 Valutazione della soglia nocicettiva	51

3.3.6	Binding recettoriale	53
3.3.7	Purificazione dei peptidi	55
3.3.8	Dosaggio radioimmunologico	57
<b>3.4</b>	<b>Procedure sperimentali</b>	<b>60</b>
3.4.1	Modalità di somministrazione della nocicettina e suoi derivati	60
3.4.2	Trattamento cronico con buprenorfina	61
3.4.3	Perfusione dello spazio subaracnoideo	62
<b>3.5</b>	<b>Analisi statistica</b>	<b>67</b>
<b>4.</b>	<b>RISULTATI</b>	
<b>4.1</b>	<b>Somministrazione. di nocicettina e derivati</b>	<b>68</b>
4.1.1	Effetti della somministrazione intratecali di nocicettina, [Arg <sup>14</sup> , Lys <sup>15</sup> ]nocicettina e UFP-101 sulla soglia nocicettiva nel ratto.	68
4.1.2	Effetti della co-somministrazione intratecale di nocicettina, [Arg <sup>14</sup> , Lys <sup>15</sup> ]nocicettina con UFP-101 sulla soglia nocicettiva nel ratto	72
<b>4.2</b>	<b>Somministrazione del dendrimero MAP-N/OFQ</b>	<b>76</b>
4.2.1	Effetti della somministrazione intratecale di MAP-N/OFQ	76
4.2.2	Effetti di somministrazioni intratecali ripetute di MAP-N/OFQ	79
4.2.3	Effetti della somministrazione intratecale di UFP-101 sull'azione antinocicettiva della MAP-N/OFQ	82
4.2.4	Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di MAP-N/OFQ	85

4.2.5	Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di MAP-N/OFQ sull'azione antinocicettiva della morfina	87
4.3	<b>Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di nocicettina e di [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]nocicettina sull'azione antinocicettiva del paracetamolo</b>	92
4.4	<b>Effetti della somministrazione sottocutanea prolungata di buprenorfina, sulla densità recettoriale di NOP</b>	95
4.5	<b>Effetto di stimolazioni esterne sulla liberazione di nocicettina a livello spinale</b>	98
4.5.1	Perfusione con CSF ad elevata concentrazione di K <sup>+</sup>	98
4.5.2	Applicazione di stimoli nocicettivi	.....100
5.	<b>CONCLUSIONI</b>	103
6.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	117

## **RIASSUNTO**

Oggetto di studio in questa tesi è stato il ruolo modulatorio svolto dal neuropeptide nocicettina/orfanina FQ a carico della trasmissione nocicettiva.

A scopo introduttivo, sono state illustrate le conoscenze attuali sul sistema nocicettina-NOP; sono state descritte le funzioni, la struttura e la distribuzione del recettore NOP, le azioni farmacologiche finora note e la distribuzione della nocicettina stessa al livello del S.N.C. e in periferia.

Lo studio è stato condotto principalmente con due approcci differenti

**A)** E' stata studiata la capacità della nocicettina esogena o di suoi analoghi agonisti e antagonisti, di modificare la trasmissione nocicettiva.

**B)** Sono state studiate le variazioni a carico del sistema endogeno nocicettina/recettore NOP in seguito a trattamenti di tipo farmacologico.

**A)**

E' stata indagata la capacità della nocicettina e degli analoghi sintetici [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ e UFP-101 di modificare la soglia nocicettiva nel ratto, rilevata con il test del tail-flick, a seguito di somministrazione diretta nello spazio subaracnoideo, in confronto con la nocicettina stessa.

La somministrazione intratecale del neuropeptide nocicettina (10 nmol/ratto) ha determinato un innalzamento statisticamente significativo delle latenze di risposta al test del tail-flick. L'analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ è stato somministrato alla dose di 1 nmole/ratto i.t. provocando un innalzamento massimale delle soglie di latenza per tutto il periodo di osservazione, mentre alla dose 0,2 nmoli/ratto i.t ha provocato un effetto antinocicettivo sottomassimale pur dimostrandosi significativo rispetto ai controlli ( $p < 0,05$  vs controlli a tutti i tempi di rilevazione). Il

composto antagonista UFP-101 è risultato capace di antagonizzare l'azione sulla soglia analgesica sia della nocicettina sia dell'analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ nel suo dosaggio minore, mentre contro la dose di 1 nmole/ratto i.t ha prodotto solamente una riduzione di effetto.

Anche la somministrazione intratecale di MAP-N/OFQ si è dimostrata in grado di modificare la soglia nocicettiva determinata mediante il test del tail-flick, nel ratto, in modo dose dipendente. differentemente una seconda somministrazione di MAP-N/OFQ dopo 24 ore, si è dimostrata totalmente inefficace nel modificare la soglia nocicettiva nei ratti precedentemente trattati, pur permanendo la loro suscettibilità all'azione analgesica della morfina, mostrando quindi il rapido sviluppo di tolerance al potente peptide nocicettinergico somministrato per via i.t..

Inoltre l'antagonista UFP-101 oltre ad essere in grado di antagonizzare l'effetto della MAP-N/OFQ, ha mostrato la capacità di ridurre la tolerance sviluppata nei confronti del dendrimero.

La somministrazione di MAP-N/OFQ per via i.c.v. ha prodotto variazione della soglia nocicettiva, producendo un innalzamento del valore soglia, dato contrastante con la maggior parte dei dati riguardanti la nocicettina in letteratura. Ha invece replicato l'effetto di antagonismo funzionale nei confronti della morfina, la quale dopo somministrazione di MAP-N/OFQ è risultata essere incapace di modificare la soglia nocicettiva nel ratto. Tale effetto perdura dopo 24 ore, quando una somministrazione di morfina produce un effetto analgesico inversamente proporzionale alla dose ricevuta di MAP-N/OFQ 24 ore prima.

E' stato indagato il possibile ruolo neuromodulatorio del neuropeptide nocicettina esogeno, nell'analgesia prodotta da un

farmaco di natura non oppiacea. In tal senso si è proceduto ad indagare l'eventuale capacità della nocicettina esogena, somministrata per via intracerebroventricolare e del suo analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OAQ, di antagonizzare l'analgesia prodotta dal farmaco paracetamolo. La nocicettina ha evidenziato la capacità di antagonizzare il potere antinocicettivo del paracetamolo fino a bloccare completamente l'effetto al dosaggio più elevato, mostrando quindi proprietà antagonista dose-dipendente. Inoltre l'UFP-101, che di per se non altera l'analgesia indotta da paracetamolo, è in grado di antagonizzare l'effetto della nocicettina sul paracetamolo in maniera dose-dipendente. Medesimo è risultato il comportamento dell'analogo della nocicettina, la Arg-Lys nocicettina.

## **B)**

Sono state indagate le relazioni tra il sistema nocicettina/NOP e le proprietà farmacologiche di un noto farmaco oppiaceo quale la buprenorfina, le cui peculiari caratteristiche farmacodinamiche sono state recentemente collegate alla sua capacità di agire come agonista diretto al recettore NOP. In tal senso si è proceduto ad osservare l'effetto della somministrazione di buprenorfina sull'assetto recettoriale di NOP, inseguito ad un trattamento prolungato con somministrazione sottocutanea mediante minipompe osmotiche nel ratto, rilevando successivamente, tramite uno studio di binding, le variazioni della densità recettoriale di NOP in alcune aree di interesse per la trasmissione nocicettiva. Sia nell'ippocampo che nel talamo e nella frontal cortex, la somministrazione prolungata di buprenorfina ha causato una riduzione significativa della densità recettoriale di NOP.

Come ultimo aspetto indagato, al fine di determinare la presenza del neuropeptide nel liquido cerebrospinale e le sue eventuali modificazioni a seguito di manipolazioni

farmacologiche e non farmacologiche, è stata messa a punto una metodica di perfusione dello spazio subaracnoideo nel ratto, che consentisse di ottenere materiale biologico su cui compiere la ricerca e quantificazione della presenza di nocicettina mediante dosaggio radioimmunologico. La perfusione di CSF artificiale arricchito di ione potassio ad una concentrazione pari a 60 mM ha evidenziato la possibilità di stimolare la liberazione della nocicettina nel liquido cerebrospinale di ratto, suggerendo quindi una sua provenienza da elementi eccitabili. E' stato quindi possibile osservare l'andamento dei livelli di peptide a seguito della stimolazione nocicettiva prodotta da due agenti irritanti con caratteristiche differenti, la carragenina e la formalina.

La somministrazione sottocutanea di carragenina (100 µl al 3 %) nella regione subplantare di entrambe le zampe posteriori del ratto non ha determinato alterazioni significative dei livelli di neuropeptide. Invece, la somministrazione di formalina (50 µl al 5 %), dopo un iniziale periodo di 30 minuti, ha causato un incremento significativo della liberazione di N/OFQ a partire dal terzo intervallo di raccolta seguente la somministrazione della sostanza. Questo rispecchia l'andamento di risposta al formalin test ottenuto anche mediante test di natura differente dagli analgesimetrici (es. comportamentale, elettrofisiologico), in quest'ottica l'aumento di nocicettina può essere interpretato come un evento dovuto alla sensibilizzazione centrale all'effetto pronocicettivo.



## INTRODUZIONE

---

### 1.1 La nocicettina e il suo recettore

#### *1.1.1 Il recettore per la nocicettina*

Differenti gruppi di ricerca, impiegando tecniche di biologia molecolare, hanno messo in evidenza, nel breve volgere di un biennio (1994-'95), l'esistenza di sequenze geniche codificanti per una proteina di circa 370 aminoacidi, la cui struttura primaria mostrava le caratteristiche di un recettore a 7 domini transmembranari (3).

Questo recettore, i cui geni sono stati identificati nel topo, nell'uomo (4) e nel ratto (5), presenta marcate analogie di sequenza aminoacidica con i differenti tipi di recettore per gli oppioidi (Fig. 1) e, tuttavia, non è in grado di interagire efficacemente con ligandi per tali recettori quali la diprenorfina (6).

In particolare, l'allineamento delle sequenze aminoacidiche del "recettore orfano" con quella dei recettori oppioidi  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  ha evidenziato un'identità superiore all'80 % nel 2°, 3° e 7° dominio transmembranario e leggermente inferiore nelle anse citoplasmatiche; il livello di omologia è molto inferiore nella porzione N-terminale, nonché nella 2° e 3° ansa extracellulare.

Benché esistano alcune differenze di sequenza tra le varie forme di recettore per la nocicettina isolato in differenti specie, permane tuttavia un'omologia superiore al 90 %.

Sulla base delle sue caratteristiche di sequenza, il "recettore orfano" è stato successivamente denominato come recettore ORL-1 (da: Opioid Receptor-Like receptor) e, più recentemente, come NOP (7).

Gli studi relativi alla distribuzione del recettore in oggetto, ne hanno rivelato la presenza sia a livello del S.N.C. (cervello e midollo spinale), sia in alcuni tessuti periferici; in questi ultimi esso sembra presente nell'intestino, vasi deferenti, fegato e milza, ma non nel muscolo scheletrico, esofago, rene, testicoli e surrenali (6).

Per quanto riguarda invece la sua presenza nel S.N.C., studi di ibridizzazione *in situ* hanno rivelato che i livelli più elevati del suo mRNA compaiono nell'ipotalamo, amigdala, corteccia piriforme, rafe dorsale e nucleus coeruleus. Esso è anche presente nella corteccia, talamo, ippocampo, sostanza grigia periacqueduttale e midollo spinale (8, 9, 10, 11).

In contrasto con quanto noto per i recettori oppioidi, l'mRNA per il "recettore orfano" (indicando così le varie forme con cui è stato identificato il recettore per la nocicettina) non è stato ancora evidenziato a livello dello striato.

Malgrado la già citata incapacità del recettore orfano di legare ligandi oppioidi, esiste un'interessante omologia funzionale con i classici recettori  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ . Infatti, il potente agonista oppioide etorfina è in grado di diminuire l'accumulo di cAMP stimolato con forskolina in cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) stabilmente transfettate con il gene che codifica per ORL-1 (4); tuttavia, questo avviene con concentrazioni di etorfina tre ordini di grandezza superiori a quelli necessari per l'interazione con i recettori oppioidi.

```

NOP                                     MESLF 5
μ                                     MDSSTGPGNTSDCSPLAQASC-PA 25
κ                                     MESPIQIFRGEPEGPC 16
δ                                     MELVPS 6

- ^ ^ ^
NOP PAPYWEVLYGSHFQGNLSLLNETVPHHLLLNASHSAFLPLGLKVTIVGLY 55
μ --GSLNLSHVDGN-SDPCG--R-GLGGNDSLCPQTGSPSMVTAI--MA-- 75
κ APSACLLPNS-SWFP-WAESDSNGSVGSEDQQLEP-HISPAIP-I-TAV- 66
δ ARAELQSSPLVNLSDAFPSAFPAGANASGSPGARSASS-A-AIA-TA-- 56

- *
NOP LAVCIGLLGNCLVMYVILRHTKMKATNIYIFNLALADTLVLLTLPFQG 105
μ SI--VV--F--F-----V--Y-----A-ATS-----S 125
κ SV-FVV--V--S--F--I--Y-----A--TT-M--S 116
δ S---AV-----V---FG-V-Y--L-----A-ATS-----S 106
TM1 TM2

= *
NOP TDILLGFWPFGNALCKTVIAIDYNNMFTSTFTLTAMSDRYVAICHPIRA 155
μ VNY-M-T---TI---I--S-----I---CI-----I-V---VK- 175
κ AVY-MNS---DV---I--S-----I---M-----I-V---VK- 166
δ AKY-MET---ET---A-LS-----I---M-----I-V---VK- 156
TM3

$ =
NOP LDVRTSSKAQAVNVAIWALASVVGVPVAIMGSAQVEDEEIECLVEIPAPQ 205
μ --F--PRN-KI---CN-I-S-AI-L--MF-ATTKYRQGS-D-TLTFSH-T 225
κ --F--PL--KII-IC--L--S--ISAVL-GTK-REDVDVIECSLQF-D 216
δ --F--PA--KLI-IC--V---G---IMV-AVI-PR-GAVV-MLQF-S-S 206
TM4

NOP DY WGPVFAICIFLFSFIIPVLIISVCYSLMIRRLRGVRLLSGSREKD 252
μ W- -ENLLK--V-I-A--M-I---T---G---L--KS--M---K--- 272
κ -EYSW-DLFMK--V-V-A-V-----I---T---L--KS----- 266
δ W- -DT-TK--V---A-VV-I---T---G--LL---S-----K--- 253
TM5

°
NOP RNLRRIRLVLVVAVFVGCWTPVQVFVLVQGLGVQPGSETAVAILRF C 301
μ -----M-----IV---IHIY-IIKA-ITI-ETTFQTVSWH- - 321
κ -----K-----II---IHI-I--EA--STSH-TAVLSSYY- - 315
δ -S-----M---GA--V--A-IHI--I-WT-VDINRRDPL-VAALHL- 303
TM6

# $
NOP TALGYVNSCLNPILYAFDENFKACFRKFCASSLHREMQVSDRVRSAIK 315
μ I---T-----V-----R---E--IPT-STI-Q-N-T---QNTR 371
κ I---T--S--V-----R---D--FPIKMRM-R-STN---NTVQ 365
δ I---A--S--V-----R---QL-RTPCGRQ-PGSLR-P-QATT 353
TM7

NOP DVGLGCKTSETVPRPA 367
μ EHPSTAN-VDRTNHQLENLEAETAPLP 398
κ -PASMRDVGGMNKPV 380
δ RERVITAC-PSDG-GGGRAA 372

```

**Fig. 1** Allineamento delle sequenze del “recettore orfano” (indicato con NOP) con quelle dei tre recettori oppioidi. (-) aminoacidi identici; i 7 domini idrofobici transmembranari sono sottolineati ed indicati da TM1 a TM7; (=) residui di cisteina probabilmente coinvolti in legami disolfuro; (\*) residui di acido aspartico che possono interagire con gruppi aminici primari di ligandi; (^) potenziali siti di glicosilazione; (\$) potenziali siti per la PKC; (°) potenziale sito per protein-chinasi cAMP-dipendenti; (#) potenziale sito di palmitoilazione. Gli spazi vuoti sono stati introdotti per l’allineamento ottimale.

Questi dati quindi hanno suggerito due importanti considerazioni:

- 1) il recettore orfano è un recettore accoppiato a proteine G di tipo inibitorio nei confronti dell'enzima adenilatociclastasi;
- 2) gli oppioidi endogeni non rappresentano i ligandi fisiologici per questo recettore.

Come precedentemente accennato, questo recettore, indipendentemente isolato da differenti gruppi di ricerca (4-11), è stato dapprima collettivamente indicato come ORL-1.

In seguito, un tentativo di riorganizzazione della nomenclatura dei recettori con “struttura oppioide” lo ha designato con il nome di OP4 e, infine, si è raggiunto un generale consenso con la denominazione di recettore NOP (Nociceptin Opioid Peptide).

Conseguentemente, questa denominazione indicata dagli appositi comitati della IUPHAR (7), aggiornata e correntemente accettata dalla comunità scientifica, verrà utilizzata in questa sede per indicare il recettore in oggetto.

### ***1.1.2 Il neuropeptide nocicettina***

Due gruppi indipendenti sono giunti, nel 1995, all'isolamento di un agonista endogeno per il recettore NOP (1, 2).

Meunier e collaboratori (1) hanno impiegato purificazioni cromatografiche successive di un estratto acido di cervello di ratto, mentre Reinscheid (2) e collaboratori hanno utilizzato ipotalamo suino come materiale di partenza.

Per rivelare la presenza di materiale biologico attivo nelle diverse frazioni cromatografiche, entrambi i gruppi hanno utilizzato la stessa strategia, consistente nel dosaggio biologico dell'inibizione dell'accumulo di cAMP in cellule che esprimevano il "recettore orfano".

Il successivo sequenziamento del materiale biologico, ha rilevato che la sua struttura corrisponde a quella di un eptadecapeptide che manifesta alcune analogie con certi peptidi oppioidi già noti (Fig. 2) e che è stato denominato come nocicettina, sulla base di una possibile azione nocicettiva a seguito di somministrazione intracerebroventricolare nel topo (1) o come orfanina FQ (2).

Quest'ultima denominazione fa più semplicemente riferimento al "recettore orfano", per il quale il neuropeptide costituirebbe l'agonista endogeno, e agli aminoacidi N- e C-terminali costituiti dalla fenilalanina e glutammina (rispettivamente F e Q nel codice a singola lettera per gli aminoacidi).

Al di là delle analogie di struttura con alcuni peptidi oppioidi (vedi Fig. 2), un'importante caratteristica della nocicettina sembra essere l'assenza dell'aminoacido tirosina in posizione 1 (presente in tutti i peptidi oppioidi), sostituito dalla fenilalanina.

A seguito dell'isolamento del gene che codifica per la nocicettina, è stato possibile dedurre la sequenza del polipeptide precursore (pre-pronocicettina, PPNOC) da cui la nocicettina

stessa deriva (1) (Fig. 3). Nella sequenza del precursore, la nocicettina è affiancata dall'usuale coppia di aminoacidi basici lisina-arginina.

Nocicettina Phe-**Gly-Gly-Phe**-Thr-Gly-Ala-Arg-**Lys-Ser**-Ala-Arg-**Lys**-Leu-  
Ala-**Asn-Gln**

Dinorfina A Tyr-**Gly-Gly-Phe**-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-**Lys**-Trp-  
Asp-**Asn-Gln**

$\gamma$ -Endorfina Tyr-**Gly-Gly-Phe**-Met-Thr-Ser-Glu-**Lys-Ser**-Gln-Thr-Pro-Leu-  
Val-Thr-Leu

Met-enkefalina Tyr-**Gly-Gly-Phe**-Met

**Fig. 2** – Sequenza aminoacidica della nocicettina confrontata con quella di alcuni peptidi oppioidi. Le omologie di sequenza e posizione sono evidenziate in grassetto.

Poco prima della nocicettina stessa, è inoltre presente una possibile sequenza peptidica di 35 aminoacidi, mentre a valle si ritrova un'altra sequenza di 17 aa portante anch'essa la fenilalanina e la glutammina, rispettivamente in posizione N- e C-terminale. Quest'ultimo peptide, tuttavia, così come la sua estensione C-terminale fino a 28 aa, manca di affinità per il recettore NOP (12).

Gli studi compiuti per indagare le relazioni struttura-attività nella sequenza aminoacidica della nocicettina, hanno indicato che la nocicettina (**1-13**) mantiene la piena capacità di legarsi con il recettore, mentre l'affinità cala drasticamente con i frammenti nocicettina (**1-11**) e (**1-7**) (13, 14).

Risultati simili sono stati ottenuti *in vitro* per quanto riguarda l'attività biologica di tali frammenti (15).

Insospettatamente, anche la nocicettina (**6-17**) e (**12-17**) mostrano un'elevata affinità per il recettore NOP (16).

Questo complesso di osservazioni indica che la porzione significativa della nocicettina è rappresentata dalla sua porzione interna altamente basica; questo è valido sia in termini di riconoscimento che di attivazione del suo recettore (Fig. 4).

Tutto ciò suggerisce che, malgrado l'omologia strutturale del NOP con i recettori oppioidi e dei peptidi oppioidi con la nocicettina, quest'ultima non sembra legarsi al suo recettore nello stesso modo in cui la dinorfina A lega i recettori oppioidi. In particolare, l'evidenza di un'affinità della nocicettina (**6-17**) per il recettore NOP indica che la teoria del "message-address", finora utilizzata per i peptidi oppioidi, possa non essere applicabile per la nocicettina (17).

```

001 CTCTCCAGCGTGTTCAGGAGCTGTCCCGAGGACTGCCTCACCTGCCAGGAGAGGCTCCAC 060
001 L S S V F S S C P E D C L T C Q E R L H 020

061 GCGGCTCCGGGCGAGCTTCAACCTGAAGCTGTGCATCCTCCAGTGTGAAGAGAAGGTCTTC 120
021 P A P G S F H L K L C I L Q C E E K V F 040

121 CCCGGCCCTCTCTGGACTCTTTGCACCAAAGCCATGGCCAGTGACTCTGAGCAGCTCAGC 180
041 P R P L W T L C T K A H A S D S E Q L S 060

181 CCTGCTGATCCAGAGCTCACGTCCGGTGTCTTTACCAGTCGAAAGCCTCGGAGATGCAG 240
061 P A D P E L T S A A L Y Q S K A S E M Q 080

241 CACCTGAAGAGAATGCCGCGTGTCCAGGAGTGTGGTGCAAGCCCGAGACGCAGAGCCTGAG 300
81 H L K R H P R V R S V V Q A R D A E P E 100

301 GCAGATGCAGAGCCTGTGCGCAGATGAGGCCGATGAGGTGGAGCAGAAGCAGCTGCAGAAA 360
101 A D A E P V A D E A D E V E Q K Q L Q K 120

361 AGGTTTGGGGGCTTCACTGGGGCCCGGAAGTCAGCCCGAAGTTGGCCAACCAGAAGCGG 420
121 R F G G F T G A R K S A R K L A N Q K R 140

421 TTCAGTGAGTTTATGAGGCAGTACCTGGTCTGAGCATGCAGTCAAGCCAACGCCGGCGC 480
141 F S E F H R Q Y L V L S H Q S S Q R R R 160

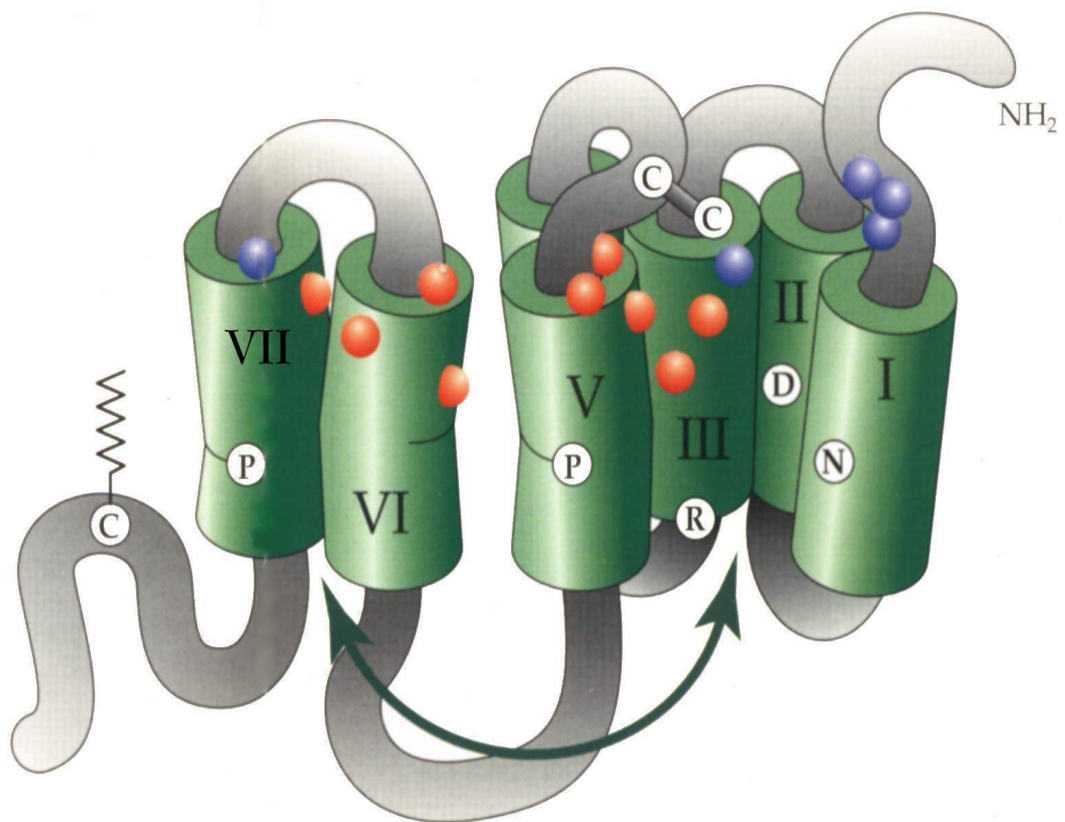
481 ACTCTGCACCAGAATGGTAATGTGTAGCCAGAAGGAGCCCTCCAGCTGCACCGGCCAC 540
161 T L H Q H G H V * 168

541 TGCAACCCATGAGCATCCAGGTGAGCCCCGTACAGCATGTGTCCACCAAGACCTGCA 600
601 GGCCGGGAGTCAGGATTCCTCCTCCCTGAGGCACTGAACACCCGGGCACCTCCCACA 660
661 GCATGTCTCACCACAATCCTGTGTGCTACATCAGAGTGTATTTTGTAAATCCTCCAGGTA 720
721 ACATTTTAAATGGCCCCATCTTCTGTCTCATCCTCTGCCCTCTCGTAGGGCCAGGTGAGAG 780
781 GAACATGAAATCAGACCTGGGGTTTGCCTCACCCTGCCATAACTGGTTTGTAAAGGAG 840
841 CTGTTCTTTTGGACTGATTGTTTGAACAACCTTCTCCATTAAACTTCTACTGAGCAAAA 900
901 TGGTTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 925

```

**Fig. 3** – Sequenza nucleotidica del cDNA di ratto codificante per il polipeptide precursore della nocicettina e sequenza aminoacidica del precursore stesso. La sequenza del peptide nocicettina è sottolineata in maniera continua; due altre possibili sequenze sono sottolineate in maniera tratteggiata. I riquadri indicano gli aminoacidi basici, possibili siti di taglio enzimatico.





**Fig. 4** – *Rappresentazione schematica di un recettore a sette domini transmembranari, accoppiato a proteine G.*

A livello del S.N.C., la distribuzione di questo nuovo eptadecapeptide sembra essere più limitata rispetto a quella del suo recettore. La nocicettina è presente, tra l'altro, nell'area preottica, nel setto, amigdala ed eminenza mediana; invece, bassi livelli del peptide sembrano presenti in numerose aree in cui il recettore risulta altamente espresso, come ad esempio nella corteccia, nucleo soprachiasmaottico, nuclei sopraottico, paraventricolare e ventromediale dell'ipotalamo e nel rafe dorsale (18).

Livelli elevati, infine, sono stati riscontrati negli strati superficiali delle corna dorsali del midollo spinale, nel complesso trigeminale ed in altre aree coinvolte nella trasmissione del dolore quale la sostanza grigia periacqueduttale (19, 20).

### ***1.1.3 Effetti farmacologici della nocicettina***

Le risposte evocate dalla nocicettina a livello cellulare sono simili a quelle ottenute da altri agonisti di recettori appartenenti alla superfamiglia a 7 domini transmembranari ed accoppiati a proteine di tipo  $G_i/G_o$ . Tuttavia, è opportuno ricordare che, in mancanza di antagonisti sicuramente selettivi nei confronti del recettore orfano, le sole azioni della nocicettina finora attribuibili con certezza all'interazione con il NOP sono solamente quelle osservate in cellule transfettate con questo recettore, mentre in tessuti neuronali non transfettati il coinvolgimento di questo recettore è da considerarsi tutt'oggi solo come probabile. In cellule transfettate, la nocicettina inibisce marcatamente l'enzima adenilatociclastasi (12, 13) stimolato con forskolina e determina l'apertura del canale del  $K^+$  del tipo "inward rectifier" (21).

Quest'ultima azione sui canali al  $K^+$  è stata osservata anche nel rafe dorsale, locus coeruleus e sostanza grigia periacqueduttale (22, 23, 24).

Il neuropeptide è inoltre in grado di inibire l'entrata di  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i canali voltaggio-sensibili in colture cellulari (SH-SY5Y; 24) e in colture di neuroni piramidali ippocampali (26). L'inibizione di canali del  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-sensibili a livello ippocampale coinvolge le proteine G dal momento che è prevenuto da un pretrattamento con tossina della pertosse e coinvolge più tipi di canali per il  $\text{Ca}^{2+}$  (di tipo N, L e P/Q). Sempre a livello del S.N.C., è stato osservato che la nocicettina inibisce, con meccanismi attualmente non chiariti, sia la liberazione di glutammato sia quella di GABA dai terminali nervosi (24, 27).

Per quanto riguarda la periferia, la nocicettina è in grado di bloccare la liberazione di acetilcolina causata dalla stimolazione luminosa nella retina di coniglio (28).

Relativamente al sistema nervoso simpatico, questo neuropeptide è in grado di bloccare efficacemente la trasmissione neuromuscolare nei vasi deferenti di ratto, coniglio (29) e topo (15, 30). In questo ambito, alcuni test eseguiti su tratti isolati di arterie renali, mesenteriche, femorali di gatto dove era stata indotta una pre-contrazione con fenilefrina hanno evidenziato l'attività rilassante della nocicettina sul muscolo liscio; inoltre, la somministrazione e.v., così come la intracerebroventricolare, ha indotto una significativa diminuzione della pressione arteriosa nel ratto per azione vasodilatatoria diretta (31).

L'infusione intravenosa continua aumenta marcatamente il flusso urinario, evidenziando allo stesso tempo un effetto antinatriuretico, favorendo la formazione di urina povera di  $\text{Na}^+$ . Analoghi effetti a livello renale sono stati osservati a seguito di somministrazione intracerebroventricolare del peptide; tale osservazione (simili effetti sia in seguito a somministrazione periferica che centrale) ha sollevato la possibilità che la nocicettina possieda la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica (31).

In relazione al sistema parasimpatico, alcuni risultati indicano (32) che la nocicettina è in grado di inibire parzialmente la liberazione di acetilcolina da terminazioni nervose a livello della trachea.

Riguardo agli effetti a carico della trasmissione nocicettiva, le stesse indagini che hanno condotto all'isolamento e caratterizzazione di questo peptide (1, 2) hanno anche evidenziato come la sua somministrazione i.c.v. nel topo produca un abbassamento della soglia sia nel test della piastra calda (1), sia in quello del "tail-flick" (2).

Inoltre, la natura pro-nocicettiva del neuropeptide sembra ulteriormente avvalorata dall'osservazione che, riducendo l'espressione del recettore orfano mediante la somministrazione di oligonucleotidi antisenso per il recettore NOP, si ottiene un effetto opposto, vale a dire un innalzamento della soglia nocicettiva (15).

Tuttavia, con il procedere degli studi effettuati, il quadro generale delle azioni prodotte dalla nocicettina a carico della trasmissione nocicettiva si è rivelato più complesso.

Alcuni autori hanno suggerito un coinvolgimento di meccanismi di autoanalgesia indotta da stress nell'azione della nocicettina (33). Altri studi hanno anche proposto l'esistenza di una risposta bifasica, comprendente un'iperalgia seguita da un periodo di analgesia (34).

L'azione esercitata dalla nocicettina a livello spinale è ancora controversa. Infatti, alcuni autori non hanno osservato alterazioni significative della soglia nocicettiva dopo somministrazione intratecale di nocicettina nel ratto (35), mentre altre indagini hanno rivelato un effetto inibitorio del neuropeptide sulle risposte sinaptiche da fibre di tipo C (36, 37), nonché un aumento della soglia nocicettiva nel test del tail-flick, nel ratto (38).

E' stato osservato (39) che la nocicettina è in grado di diminuire la liberazione di tachichinine a livello del terminale periferico di neuroni afferenti primari, con un'azione non modificata dal naloxone.

Questi risultati, oltre ad indicare che la nocicettina può essere efficace nel sopprimere i fenomeni infiammatori neurogeni (che comportano cioè liberazione di tachichinine), suggerisce anche che la stessa azione di inibizione di neurotrasmettitori possa verificarsi anche a livello delle terminazioni centrali delle medesime fibre afferenti primarie, vale a dire nel midollo spinale.

Gli effetti evocati da questo neuropeptide sull'attività locomotoria, risultano ancora controversi. Infatti, mentre alcuni gruppi hanno osservato una diminuzione, alcuni dati depongono a favore di un incremento della locomozione a seguito di somministrazioni i.c.v. di basse dosi del peptide (40).

Per quanto riguarda l'attività motivazionale, la nocicettina non sembra produrre effetti gratificanti o aversivi (41), benché nel nucleus accumbens sia stata dimostrata la presenza di alti livelli di mRNA per il suo recettore e che il peptide sia in grado di diminuire la liberazione di dopamina nello stesso nucleo (42). Infatti è noto da tempo che il nucleus accumbens è implicato in numerose funzioni che includono il rinforzo, la gratificazione da farmaco ed il comportamento locomotore (43). I ratti hanno dimostrato di sviluppare tolleranza agli effetti locomotori indotti da nocicettina (44).

Recenti risultati hanno suggerito che la nocicettina sopprime l'attività delle vie di gratificazione dopaminergiche del sistema mesolimbico, non producendo tuttavia, come già accennato, né aversione né preferenza nei test di scelta condizionata (place preference). Al fine di valutare possibili alterazioni della preferenza indotta da morfina, sono stati svolti degli studi che hanno indicato che la nocicettina antagonizza la preferenza indotta da morfina (45).

E' stato recentemente osservato che l'uso cronico di alte dosi di morfina accelera il rilascio e la biosintesi di nocicettina nel cervello di ratto, per antagonizzare l'effetto degli oppioidi. Questo effetto sembra che possa giocare un ruolo nello sviluppo della tolleranza alla morfina. E' stato inoltre suggerito che la nocicettina può servire come controllo a feed-back negativo ritardato sull'analgesia oppioide (46, 47).

Alcuni risultati indicano che la nocicettina diminuisce l'attività dei neuroni dopaminergici mesolimbici attraverso un'azione nell'area ventrale tegmentale. Tuttavia, questo effetto è transitorio e determina un rapido sviluppo di tolleranza; è quindi insufficiente a prevenire lo sviluppo di sensibilizzazione alla cocaina. La capacità del peptide di indurre sensibilizzazione alla cocaina quando somministrato da solo, nonostante i suoi effetti inibitori acuti, è unica e richiede ulteriori studi per delucidare i meccanismi responsabili (48).

Un comportamento di rinforzo influenzato dal nucleus accumbens e dall'ipotalamo è quello della nutrizione. E' stato dimostrato un definito aumento nell'effetto centrale gratificante delle droghe d'abuso negli animali sottoposti a restrizione di cibo (49).

E' stato anche dimostrato che somministrazioni di nocicettina nel nucleo ipotalamico ventromediale o nel nucleus accumbens aumentano l'assunzione di cibo nei ratti (50).

Il ruolo della nocicettina nella regolazione del comportamento di alimentazione è sostenuto da altri risultati, che dimostrano una riduzione dell'iperfagia indotta da nocicettina, in seguito alla somministrazione centrale di una sonda antisense nei confronti del recettore NOP (51).

Questo effetto del neuropeptide in oggetto presenta, tuttavia, alcuni aspetti non completamente chiariti. Infatti, alcuni autori (52) hanno riferito che l'azione iperfagica (o oressigena) esplicita dalla nocicettina risulta ridotta da un pretrattamento con l'antagonista oppioide naloxone, ponendo quindi qualche dubbio

sul fatto che l'azione del neuropeptide dipenda esclusivamente da un'interazione con il suo specifico recettore e suggerendo, comunque, il possibile intervento anche di altri sistemi.

D'altronde, altri autori (53) hanno osservato come un analogo della nocicettina corrispondente al [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, apparentemente dotato di attività antagonista nei confronti del NOP, risulti in grado di antagonizzare l'effetto iperfagico della nocicettina, suggerendo così che l'effetto del neuropeptide dipenda da un'interazione con il NOP stesso.

D'altra parte, gli stessi autori hanno anche descritto come la somministrazione di [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> in ratti a digiuno da 20 ore provochi una riduzione dell'assunzione di cibo rispetto ai corrispondenti, il che non contribuisce a rendere chiaro il substrato neurochimico delle azioni svolte dalla nocicettina sul comportamento alimentare.

Infine, a complicare ulteriormente il quadro, si sono recentemente aggiunti dati secondo cui il mifepristone, un antagonista dei recettori di tipo II per il corticosterone (GR), risulta in grado di bloccare l'effetto oressigeno della nocicettina (54).

#### ***1.1.4 Analoghi sintetici peptidici della nocicettina***

L'ampia distribuzione del neuropeptide nocicettina e del suo recettore NOP suggerisce che il chiarimento del suo ruolo biologico sarebbe certamente in grado di accrescere le nostre conoscenze su importanti funzioni fisiologiche.

Un simile risultato potrebbe essere utile per sviluppare nuove strategie terapeutiche potenzialmente utili per differenti condizioni patologiche quali il dolore, la tolleranza e dipendenza da oppiacei nonché l'ipertensione, le situazioni collegate a stress o i disordini di tipo neuroendocrino.

Ovviamente, come è stato sottolineato da diversi autori (55, 56) la possibilità di influenzare farmacologicamente il sistema neuronale che utilizza la nocicettina come neuromediatore richiede la disponibilità di nuovi ligandi capaci di interagire con il recettore NOP come agonisti o, preferibilmente, come antagonisti.

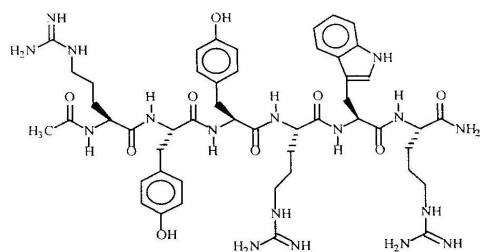
A tal fine, sono state finora compiute differenti ricerche che hanno portato all'individuazione di molecole, a struttura peptidica o non peptidica, capaci di legarsi al recettore NOP (Fig. 5).

Come già accennato, alcune di queste indagini (57) hanno ad esempio tentato di definire i rapporti struttura-attività della sequenza aminoacidica della nocicettina, al fine di definire la sequenza minima del peptide naturale ancora capace di interagire positivamente con il recettore NOP.

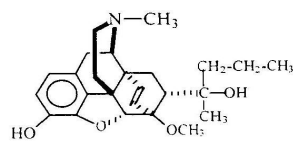
In questo senso, la sequenza **1-13**-amide della nocicettina naturale risulta essere un agonista pienamente attivo sul recettore NOP con una potenza assai simile a quella della sequenza naturale composta da 17 aminoacidi (58).

Su questa base, sono stati quindi compiuti studi di chimica farmaceutica tendenti a sviluppare analoghi di questa sequenza in grado di esprimere un'attività di tipo antagonista nei confronti del recettore NOP

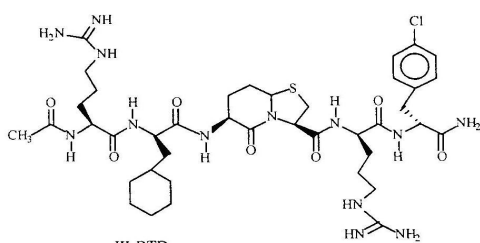




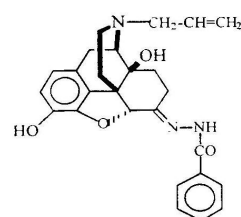
Ac-Arg-Tyr-Tyr-Arg-Trp-Arg-NH<sub>2</sub>



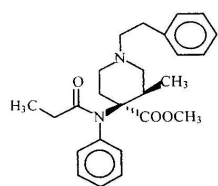
Etorphine



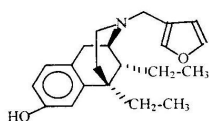
III-BTD



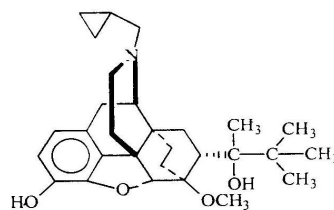
NalBzoH



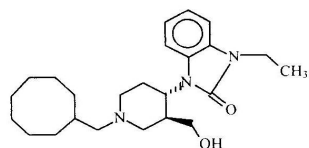
Lofentani l



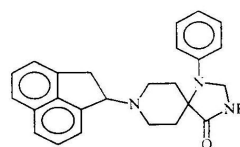
Mr 2266



Buprenorphine



J-113397



Roche agonist

**Fig. 5** – *Struttura di alcuni ligandi sintetici del recettore ORL-1.*

Come risultato di questa linea di ricerca è stato sintetizzato un derivato in cui il legame peptidico Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup> è modificato mediante riduzione a funzione amminica (CO-NH → CH<sub>2</sub>-NH) fornendo così il composto denominato [Phe<sup>1</sup>Ψ(CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>]-nocicettina (1-13)-NH<sub>2</sub>.

Questo analogo della nocicettina (1-13) amide (vedi Fig. 6) verrà di seguito indicato con la sigla [F/G]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> o come “pseudopeptide”; quest’ultimo termine designa infatti la perdita delle caratteristiche di un legame peptidico tra la fenilalanina in posizione 1 e la glicina in posizione 2, rispettivamente. In realtà la dizione attualmente più corretta per quest’ultimo composto dovrebbe corrispondere a [F/G]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, dal momento che con la revisione della nomenclatura ufficiale riferita alla nocicettina ed al suo recettore, la nocicettina stessa andrebbe indicata con la sigla N/OFQ (7).

Questo composto ha dimostrato, *in vitro*, di essere in grado di antagonizzare l’effetto inibitorio esercitato dalla nocicettina sulla contrazione di un preparato di muscolatura liscia, vale a dire il dotto deferente di topo, indotta elettricamente (58).

In questo studio, lo “pseudopeptide” ha anche mostrato di non modificare l’azione inibitoria esercitata dalla dermorfina (un agonista selettivo per i recettori oppioidi di tipo μ) sulle contrazioni elettricamente indotte della muscolatura dell’ileo di cavia né l’effetto della deltorfina I (un agonista selettivo per i recettori oppioidi di tipo δ) a carico della muscolatura liscia del dotto deferente di topo.

Sulla base di queste azioni si è quindi ritenuto che lo “pseudopeptide” potesse agire da selettivo antagonista per il recettore NOP.

Tuttavia, sono successivamente comparsi in letteratura alcuni risultati a favore di azioni di tipo agonista esercitate da [F/G]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>. E’ stato infatti osservato (59) che questo composto era in grado di inibire l’accumulo di AMP ciclico indotto da forskolina in cellule CHO (cellule di ovaio di criceto

cinese) opportunamente transfettate e rese quindi in grado di esprimere il recettore NOP. Inoltre, lo “pseudopeptide” ha mostrato un profilo farmacologico caratteristico di un agonista parziale nell’inibire la liberazione di noradrenalina da fettine cerebrali di corteccia di topo (60) ed è risultato in grado di replicare alcuni effetti elettrofisiologici e comportamentali della nocicettina, nel Sistema Nervoso Centrale di roditori (61, 62). Infine, una analisi estesa dei suoi effetti a carico della trasmissione nocicettiva, effettuata distintamente a livello cerebrale e spinale nel ratto (38), ha indicato come lo pseudopeptide [F/G]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> si comporti, in vivo, da agonista del NOP.

L’ulteriore sviluppo della ricerca a carattere chimico-farmaceutico, tendente ad ottenere nuovi ligandi per il NOP utili per lo studio della neurobiologia del sistema neuronale che utilizza la nocicettina, ha recentemente fornito altri composti potenzialmente interessanti.

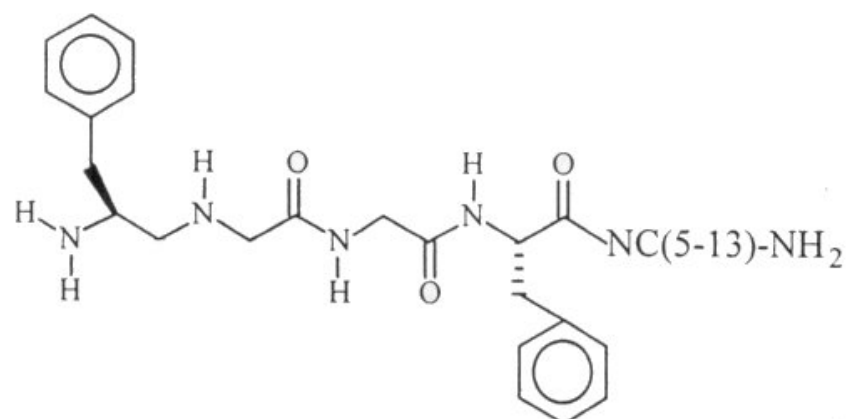
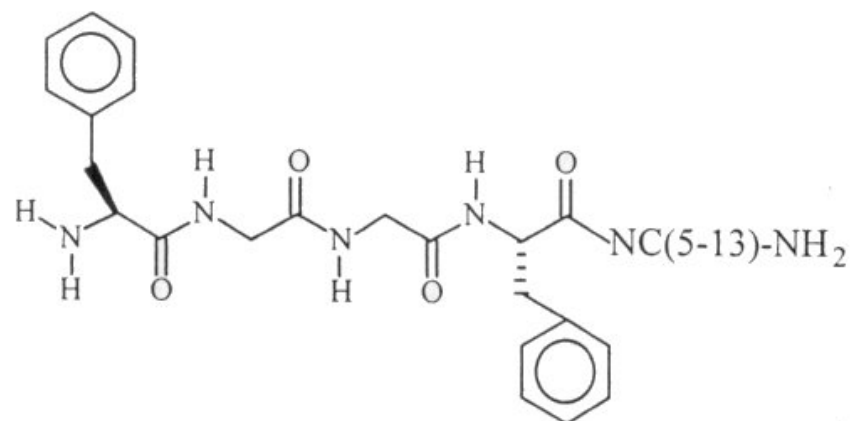
In tal senso, lo spostamento del raggruppamento benzilico dall’atomo di carbonio  $\alpha$  nella Phe<sup>1</sup> all’atomo di azoto ha fornito un buon antagonista peptidico (63) dotato di elevata selettività per il NOP ma di scarsa potenza ( $pA_2 = 6.43$ ), denominato come [Nphe<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>.

Inoltre, l’inserimento della sequenza Arg-Lys nelle posizioni 14 e 15 della nocicettina ha fornito un composto ad attività agonista (64) di elevata potenza ( $pEC_{50}$  nel test del dotto deferente di ratto pari a 8.13, in confronto ad un  $pEC_{50}$  di 7.14 per la nocicettina nello stesso test) denominato [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ o [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]Nocicettina.

Infine, la combinazione delle due alterazioni strutturali, cioè l’introduzione della sequenza Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup> e la modificazione Nphe<sup>1</sup> hanno condotto alla sintesi del composto peptidico [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ(1-17)NH<sub>2</sub>, denominato come UFP-101 (65) (vedi Fig. 7).

Indagini compiute nel nostro laboratorio sull'attività di questi ultimi analoghi a carico della trasmissione nocicettiva a livello spinale, nel ratto, hanno evidenziato una elevata potenza come agonista di [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ in confronto al neuropeptide nocicettina, nonché le ottime proprietà antagoniste del UFP-101, che si è dimostrato in grado di antagonizzare gli effetti indotti dai suddetti agonisti.

Una potenziale ulteriore possibilità di disporre di ligandi potenzialmente utili per lo studio di un sistema trasmettitoriale potrebbe essere rappresentata da una classe di composti denominati dendrimeri che sono genericamente definibili come molecole iper-ramificate portanti un numero variabile di superfici funzionali che possono essere costituite anche da intere sequenze di peptidi o neuropeptidi (dendrimeri peptidici).



**Fig. 6** – *Struttura della porzione N-terminale della nocicettina (1-13) (sopra) e dell’analogo [Phe<sup>1</sup>Ψ(CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>]-nocicettina (1-13)-NH<sub>2</sub> (sotto).*

*In particolare, vengono mostrati i primi 4 aminoacidi (Phe-Gly-Gly-Phe), in maniera da evidenziare la modificazione strutturale (CO-NH → CH<sub>2</sub>-NH) che determina la perdita delle ----- caratteristiche di legame peptidico tra Phe<sup>1</sup> e Gly<sup>2</sup>, con le conseguente denominazione di “pseudopeptide” dell’analogo stesso.*

Nocicettina

Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-  
Ala-Asn-Gln

Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup>-Nocicettina

Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-**Arg-**  
**Lys**-Asn-Gln

[Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] Nocicettina (1-17) amide (**UFP-101**)

[Nphe<sup>1</sup>] Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-**Arg-Lys-**  
Asn-GlnNH<sub>2</sub>

**Fig. 7** – Sequenze aminoacidiche dell'agonista per il NOP Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup>-Nocicettina e dell'antagonista [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] Nocicettina (1-17) amide (UFP-101), in confronto con quella della nocicettina.

### ***1.1.5 I dendrimeri***

I dendrimeri sono macromolecole costituite da tre componenti: un nucleo centrale, un certo numero di elementi funzionali ed unità ramificate di collegamento (vedi Fig. 8)

Il vantaggio apportato dall'utilizzo dei dendrimeri è di associare ad una elevata selettività e specificità tipica dei peptidi monomerici, una maggiore stabilità metabolica e resistenza alla degradazione enzimatica.

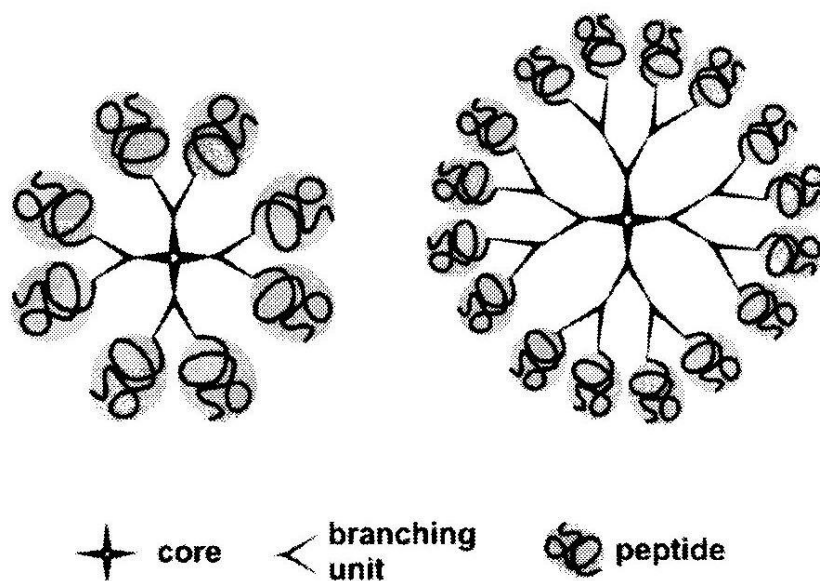
Negli ultimi anni significativi progressi sono stati compiuti nella sintesi e nello studio di glicodendrimeri, ottenuti a partire da carboidrati, e dendrimeri peptidici, ottenuti appunto da peptidi.

La natura multimerica dei dendrimeri peptidici, la composizione certa e la semplicità di produzione conferiscono a questi composti potenziale applicabilità in campo biotecnologico, biochimico e biomedico. I dendrimeri peptidici sono infatti più solubili in acqua, più stabili alle proteolisi e meno tossici per le cellule umane rispetto ai loro analoghi lineari (66).

Ad esempio, durante la prima fase dell'infezione, molte particelle batteriche e virali tendono ad aderire alle cellule ospiti mediante interazioni polivalenti.

In quest'ottica, grazie ai siti funzionali multipli presenti sulla superficie dei dendrimeri, queste molecole possono trovare applicazioni potenzialmente interessanti mimando le funzioni di recettori e ligandi nel prevenire le risposte patofisiologiche come l'infiammazione e le reazioni autoimmuni.

I dendrimeri potrebbero essere utili anche nel processo di inibizione delle metastasi di varie cellule tumorali (67). Efficace in tal senso si è dimostrato un dendrimero multimerico della laminina (una proteina della matrice extracellulare); questa efficacia è in parte attribuibile alla capacità di competere con la



**Fig. 8** – *Illustrazione schematica della struttura di dendrimeri peptidici di differenti dimensioni, che evidenzia chiaramente le tre componenti fondamentali di tali molecole, ovvero il nucleo, le unità ramificate di collegamento ed i peptidi.*



laminina per il recettore della laminina, bloccando il legame delle cellule maligne con le pareti dei vasi sanguigni.

Una ulteriore applicazione di queste molecole deriva dalla loro capacità di indurre una risposta immunitaria. Un efficiente immunogeno sintetico deve possedere sequenze peptidiche che attivino l'appropriato tipo di risposta immunologica e la flessibilità dei MAP permette di incorporare molteplici epitopi nella stessa struttura.

I dendrimeri peptidici sono utilizzati come vaccini sintetici essendo sicuri, selettivi e chimicamente definiti. Il vantaggio è quello di poter inserire l'epitopo di interesse e poter omettere gli epitopi non necessari o dannosi. Essi risultano inoltre resistenti alla denaturazione e possono essere facilmente conservati e trasportati senza congelamento. Secondo tale strategia è stato recentemente sviluppato un vaccino dendrimerico peptidico per la malaria che, inoculato in volontari sani, ha determinato lo sviluppo di una buona risposta anticorpale (67).

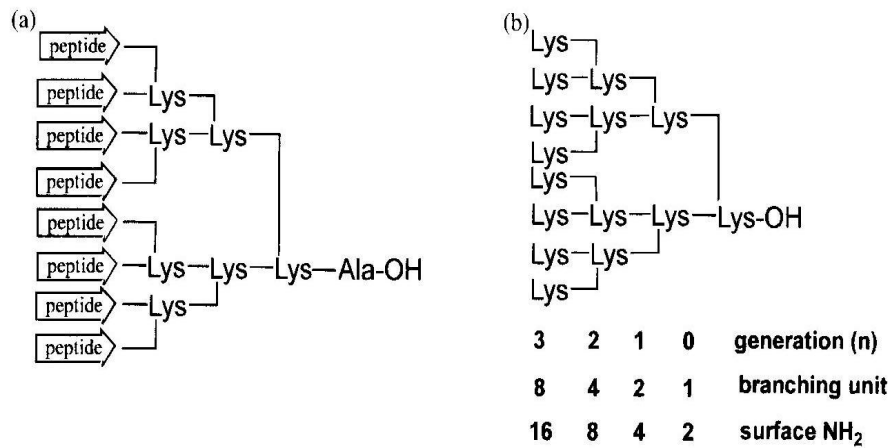
Infine, promettente sembra essere l'impiego dei dendrimeri come sistemi in grado di veicolare DNA, farmaci o altri agenti terapeutici.

In questo ambito, risulta interessante la loro applicazione come veicoli di radiofarmaci per specifiche forme tumorali nonché come strumenti utili nelle tecniche di imaging in vivo. L'esempio più noto di dendrimeri peptidici è dato dai MAP, multiple antigen peptide (67). I MAP hanno solo due delle tre componenti strutturali, le unità ramificate e i gruppi funzionali superficiali. Sono infatti costituite da un nucleo peptidico di lisine radialmente ramificate sulle quali vengono inseriti i peptidi (vedi Fig. 9). Le lisine rappresentano i più comuni aminoacidi utilizzati come unità ramificate (68), ma un'alternativa è fornita dall'uso di acidi policarbossilici e composti eterociclici. Molte variazioni sono poi apportate alla lisina stessa; per esempio una

variante contiene  $\beta$ -alanina come spaziatore all'estremità  $\alpha$  amminica dalla lisina.

Come già accennato, una proprietà interessante dei MAP è rappresentata dalla loro elevata stabilità metabolica che costituisce quindi una differenza rilevante rispetto al peptide monomero corrispondente.

Recentemente, è stato osservato (66) come dendrimeri tetramerici della neurotensina e della nocicettina risultino resistenti alla degradazione enzimatica assai più a lungo dei relativi monomeri. Questa caratteristica fa ipotizzare un'ulteriore potenziale impiego di queste molecole quali tools farmacologici per lo studio della funzione biologica di specifici sistemi neuropeptidergici.



**Fig. 9** - (a) Rappresentazione schematica di un MAP (multiple antigen peptide), incorporante otto monomeri peptidici. (b) Illustrazione di come l'incremento nel numero di Lisine, quali elementi di ramificazione, aumenti il numero di gruppi funzionali amminici.

### ***1.1.7 Analoghi non peptidici della nocicettina***

Attualmente il settore dell'industria farmaceutica grazie alle notevoli capacità di sintesi e di screening di nuove molecole ha prodotto alcuni composti con struttura non peptidica e attività selettiva per il recettore NOP (69).

<b>Agonisti</b>	<b>Antagonista</b>
Ro 65-6570	NalBzoH
NNC-63-0532	J-113397
Ro 64-6198	JTC-801
	SB-612111
	Trap-101
	Compound 24

**Tab. 1** *Principali ligandi non peptidici del recettore NOP*

## 1.2 Il sistema nocicettina/NOP e il sistema oppioide

È stato evidenziato, e ciò è di elevato interesse potenziale, il fatto che la N/OFQ sia in grado di svolgere una sorta di “antagonismo funzionale” nei confronti del sistema oppioide endogeno (70).

Infatti, benché la N/OFQ non si leghi efficacemente ai differenti tipi di recettori per gli oppioidi, la sua somministrazione è in grado di ridurre l'efficacia antinocicettiva di agonisti oppiacei.

Questi ed altri risultati (70, 71), fanno scaturire l'ipotesi che la N/OFQ possa essere coinvolta nei meccanismi neurochimici che sottendono lo sviluppo di tolleranza all'effetto antinocicettivo degli agonisti oppiacei.

Questo complesso fenomeno è stato infatti indagato secondo differenti approcci sperimentali che comprendono: a) l'analisi delle modificazioni della biosintesi dei precursori oppioidi, b) lo studio delle possibili alterazioni della funzionalità dei recettori oppioidi nonché c) dei loro meccanismi intracellulari di traduzione.

Indagini svolte nel nostro laboratorio ottenuti hanno indicato che in condizioni accertate (determinazione della soglia nocicettiva) di tolleranza all'effetto antinocicettivo della morfina, si verificano alterazioni significative dei livelli di N/OFQ a livello ippocampale mentre non si registrano modificazioni di rilievo nell'ipotalamo e nello striato.

Nelle medesime condizioni sperimentali, studi di binding hanno indicato che, sempre a livello ippocampale, si verifica anche un significativo aumento dei valori di Bmax per la <sup>3</sup>H-N/OFQ, vale a dire un aumento della densità di recettori NOP.

In conclusione, questi risultati sembrano attribuire al sistema della N/OFQ, in particolare nell'area ippocampale, un ruolo di responsabilità nello sviluppo del fenomeno di tolleranza all'effetto antinocicettivo degli oppiacei.

L'attività antioppiacea della nocicettina è stata osservata non univocamente nei confronti della morfina, la stimolazione del recettore NOP opera un antagonismo funzionale nei confronti del sistema oppioide, rilevabile a seguito di somministrazione di diversi oppiacei anche di varia selettività d'azione sui recettori oppioidi classici  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ .

In quest' ambito recentemente ha suscitato un notevole interesse le relazioni tra il sistema nocicettina/NOP e le proprietà farmacologiche di un noto farmaco oppiaceo quale la buprenorfina. Questo farmaco è risaputo avere caratteristiche farmacodinamiche peculiari rispetto ad altri farmaci di natura oppiaceo, oltre a essere considerato un agonista parziale  $\mu$  e un antagonista al recettore  $\kappa$ , la sua curva dose-risposta dell'effetto antinocicettivo mostra un caratteristico effetto tetto, tipico per gli agonisti parziali, e un andamento della curva a campana, ossia una diminuzione della efficacia all'aumentare della dose (75). Tale caratteristica è stata di recente collegata alla capacità della buprenorfina di agire da agonista al recettore NOP (73, 74), la cui azione antioppiacea potrebbe rappresentare la causa della limitata potenza farmacologia antinocicettiva del farmaco, osservazione che trova riscontro negli dati sperimentali ottenuti in topi knockout per il recettore NOP e con l'utilizzo di antagonisti selettivi per tale recettore (75), mostrando in questi casi la scomparsa dell'andamento a campana della curva dose-risposta della buprenorfina.

## 2. SCOPO DELLA RICERCA

---

Come è stato ampiamente illustrato nel capitolo introduttivo la scoperta del neuropeptide nocicettina e del suo recettore costituiscono un brillante risultato di identificazione di un nuovo neurotrasmettitore-neuromodulatore, raggiunto secondo approcci di “farmacologia inversa”.

Ovviamente, l’identificazione di questo sistema di neurotrasmissione ha stimolato nuove indagini tendenti, in primo luogo all’identificazione del ligando endogeno per il recettore NOP (ex recettore “orfano”) culminate con l’isolamento del neuropeptide nocicettina, quindi a chiarire la regolazione fisiologica delle funzioni che risultano farmacologicamente modificate dopo somministrazione esogena della nocicettina stessa.

Tra le azioni farmacologiche svolte dalla nocicettina è da annoverare, come riportato in precedenza, la sua capacità di influenzare la trasmissione nocicettiva.

In particolare, l’azione della nocicettina a carico di questa funzione si presenta articolata e ancora non completamente chiarita.

In primo luogo, la nocicettina sembra svolgere azioni opposte a carico della soglia nocicettiva nelle distinte sedi cerebrale e spinale. Infatti, la somministrazione esogena del neuropeptide a livello intracerebroventricolare determina un abbassamento della soglia nocicettiva stessa che è stato finora interpretato sia come un vero e proprio effetto iperalgesico o, piuttosto, come il risultato di un’azione “anti-oppioide” che esita in un apparente abbassamento della soglia nocicettiva.

Invece, a livello spinale, la somministrazione esogena di nocicettina provoca un innalzamento dei tempi di latenza

osservati nei differenti tests analgesimetrici, dimostrando così un'azione antinocicettiva.

E' chiaro quindi che una definizione del ruolo fisiologico svolto dal neuropeptide in oggetto a carico della trasmissione nocicettiva richiede un approfondimento delle indagini e, la per corretta esecuzione di queste ultime è necessaria la disponibilità di ligandi per il recettore NOP, capaci di agire da agonisti o da antagonisti, che siano dotati di elevata selettività, efficacia e potenza.

Alla luce di quanto fin qui esposto, durante il periodo di dottorato mi sono occupato di approfondire le indagini sul ruolo del neuropeptide nocicettina a carico della trasmissione nocicettiva nel ratto.

Lo studio è stato condotto principalmente con due approcci differenti

**A)** E' stata studiata la capacità della nocicettina esogena o di suoi analoghi agonisti e antagonisti, di modificare la trasmissione nocicettiva, rilevata mediante differenti test analgesimetrici e in diverse condizioni sperimentali.

**B)** Sono state studiate le variazioni a carico del sistema endogeno nocicettina/recettore NOP in seguito a trattamenti di tipo farmacologico.

**Studio sulla trasmissione nocicettiva mediante somministrazione esogena di nocicettina e derivati:** è stata indagata la capacità degli analoghi sintetici [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ e della stessa nocicettina di modificare la soglia nocicettiva nel ratto, rilevata con il test del tail-flick, a seguito di somministrazione diretta nello spazio subaracnoideo, in confronto con la nocicettina stessa.

Quindi è stata studiata la capacità dell'analogo con proprietà di antagonista, l'UFP-101, di modificare l'effetto di nocicettina e



[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ sulla soglia nocicettiva, in seguito a co-somministrazione con le sostanze appena citate.

Inoltre si è provveduto alla caratterizzazione del profilo farmacologico, a seguito di somministrazione intracerebroventricolare e intratecale, di un nuovo ligando del recettore NOP di natura tetradendimerica, potenzialmente dotato di potenza e durata d'azione elevate nell'attivazione del sistema nocicettinergico, il che può risultare utile per comprendere meglio il ruolo biologico di questo sistema peptidergico.

Quindi si è considerato importante osservare il possibile ruolo neuromodulatorio dal neuropeptide nocicettina esogeno, nell'analgesia prodotta da un farmaco di natura non oppiacea. In tal senso si è proceduto ad indagare l'eventuale capacità della nocicettina esogena, somministrata per via intracerebroventricolare e del suo analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ, di antagonizzare l'analgesia prodotta dal farmaco paracetamolo, noto analgesico ad azione centrale, sia soprasspinale che spinale, che periferica.

**Studio sulle modificazioni a carico del sistema nocicettina/recettore NOP in seguito a trattamenti farmacologici:** mi sono occupato di indagare le relazioni tra il sistema nocicettina/NOP e le proprietà farmacologiche di un noto farmaco oppiaceo quale la buprenorfina, le cui peculiari caratteristiche farmacodinamiche sono state recentemente collegate alla sua capacità di agire come agonista diretto al recettore NOP.

In tal senso si è proceduto ad osservare l'effetto della somministrazione di buprenorfina sull'assetto recettoriale di NOP, inseguito ad un trattamento prolungato con somministrazione sottocutanea mediante minipompe osmotiche nel ratto, rilevando successivamente, tramite uno studio di

binding, le variazioni della densità recettoriale di NOP in alcune aree di interesse per la trasmissione nocicettiva.

Infine, per meglio comprendere il ruolo del neuropeptide nocicettina nella trasmissione nocicettiva a livello spinale si è reso necessario ottenere ulteriori informazioni mediante un approccio diverso dalla somministrazione esogena anche nell'animale da esperimento, al fine di determinare la presenza del neuropeptide nel liquido cerebrospinale e le sue eventuali modificazioni a seguito di manipolazioni farmacologiche e non farmacologiche.

A questo scopo è stata messa a punto una metodica di perfusione dello spazio subaracnoideo nel ratto, che consentisse di ottenere materiale biologico su cui compiere la ricerca e quantificazione della presenza di nocicettina, utilizzando, come tecnica di quantificazione, il dosaggio radioimmunologico, in tal modo è stato possibile osservare l'andamento dei livelli di peptide a seguito della stimolazione nocicettiva prodotta da due agenti irritanti con caratteristiche differenti, la carragenina e la formalina.

### **3. MATERIALI E METODI**

---

#### **3.1 Animali**

Gli esperimenti sono stati condotti sul ratto. Sono stati utilizzati maschi del ceppo Sprague-Dawley, del peso di  $250 \pm 10$  g (Harlan Italia).

Gli animali erano alimentati con una dieta standard in pellets (MIL, Morini) ed acqua liberamente disponibili, ed erano alloggiati in gabbie di makrolon.

L'illuminazione era regolata in modo automatico in cicli di 12 ore di luce (h 7-h 19) e 12 ore di buio (h 19-h 7) e la temperatura era mantenuta costante a  $21 \pm 2$  °C. Per facilitare l'acclimatazione degli animali, si lasciava trascorrere un periodo di 5-7 giorni, nelle condizioni sopra descritte, prima del loro utilizzo sperimentale. Trascorso tale periodo i ratti sono stati sottoposti all'intervento di incannulazione cronica dello spazio subaracnoideo spinale (secondo la metodica di seguito riportata).

Dopo l'intervento chirurgico, in attesa del completo recupero di tutte le normali attività fisiologico-metaboliche prima dei trattamenti (4-5 giorni), gli animali sono stati stabulati singolarmente nelle medesime condizioni ambientali precedentemente riportate

#### **3.2 Farmaci**

Sono stati utilizzati: il neuropeptide nocicettina (N/OFQ, Bakem UK), gli analoghi [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>] Nocicettina (1-17) amide (UFP-101) e [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]Nocicettina o [Arg-Lys]N/OFQ (sintetizzati presso il Dipartimento di Scienze

Farmaceutiche dell'Università di Ferrara, secondo metodiche già pubblicate (76) (77).

La nocicettina (N/OFQ), l'[Arg-Lys]N/OFQ e l'UFP-101 sono stati disciolti in un veicolo avente la seguente composizione

-NaCl	7,46 g/l
-KCl	0,19 g/l
-MgCl <sub>2</sub>	0,19 g/l
-CaCl <sub>2</sub>	0,14 g/l
-Albumina bovina	3,00 g/l

La composizione del veicolo permette di realizzare una soluzione osmoticamente bilanciata, isotonica rispetto al liquido cefalorachidiano. L'aggiunta di albumina ha lo scopo di limitare le perdite che possono verificarsi per la capacità delle sostanze di natura peptidica di aderire alle varie superfici con cui vengono a contatto in virtù di interazioni aspecifiche (ad es. forze di Van der Waals).

Inoltre sono stati utilizzati: la morfina cloridrato (Carlo Erba, Milano), il naloxone cloridrato (RBI, USA), il dendrimero tetramerico della nocicettina, MAP-nocicettina (MAP-N/OFQ, sintetizzati presso il Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Siena, secondo metodiche già pubblicate (66).

### 3.3 Metodiche Sperimentali

#### 3.3.1 *Incannulazione cronica dello spazio subaracnoideo.*

L'incannulazione dello spazio subaracnoideo è stata effettuata, apportando alcune modifiche alla tecnica di Yaksh e Rudy (78).

I ratti vengono anestetizzati con una miscela di *sodio pentobarbitale* e *cloralio idrato* (30/130 mg/kg i.p.), rasati sulla parte dorsale del collo e quindi opportunamente posizionati su un apparecchio stereotassico.

Con un bisturi si pratica un'incisione longitudinale nel mezzo del collo, a partire da una linea a livello delle orecchie e per due centimetri circa caudalmente; quindi i vari strati dei muscoli sottostanti vengono divaricati e trattenuti con pinze chirurgiche, per rendere visibile la prima vertebra e la membrana atlanto-occipitale.

Usando il bordo tagliente di un ago da iniezione (18G), viene eseguita una incisione nel centro della membrana, della sottostante dura madre e dell'aracnoide che si trova strettamente adesa a quest'ultima, facendo attenzione a non danneggiare la superficie dorsale del midollo spinale sottostante.

Dopo questa incisione, se l'operazione è eseguita correttamente, si può osservare l'uscita di una certa quantità di liquido cerebro-spinale.

A questo punto si passa ad inserire un catetere. Quest'ultimo è costituito da un tubicino di polietilene (PE-10, Beckton Dickinson, diametro esterno 0.61 mm, interno 0.28 mm), precedentemente preparato come segue:  
in un segmento di PE-10 lungo circa 16 cm, viene fatto un nodo abbastanza lento da non occludere il lume interno, ricoperto e fissato con una pellicola di materiale inerte; si taglia quindi una estremità a 8.0 cm da quest'ultima.

Tale lunghezza permette il raggiungimento dell'allargamento lombare, a partire dalla membrana atlanto-occipitale, in un ratto di circa 300g.

Prima di essere inserito, il catetere viene disinfettato e quindi lavato, sia internamente che esternamente, con soluzione fisiologica sterile. Si riempie poi con una soluzione di uguale pressione osmotica rispetto al liquido cefalo-rachidiano, la cui composizione viene riportata più avanti.

L'inserimento del catetere avviene attraverso il foro praticato nella membrana atlanto-occipitale, dura madre ed aracnoide, e deve essere eseguito con lentezza e l'attenzione necessaria per non ledere il sottostante tessuto nervoso e le radici dei nervi spinali.

Una volta terminato l'inserimento, si lava il catetere con circa 7 µl di soluzione fisiologica sterile mediante l'ausilio di una microsiringa (Hamilton 702), ed infine si chiude per compressione a caldo l'estremità superiore dello stesso.

A questo punto si provvede a riunire, mediante sutura, tutti gli strati muscolari singolarmente sino alla cute compresa utilizzando filo Polifil E.P.2 (Bieffe Medital, S.A).

Dopo l'operazione si lasciano trascorrere 7-10 giorni prima dell'utilizzo sperimentale, per permettere un corretto recupero dell'animale dall'intervento.

Sono stati utilizzati solamente quegli animali che non mostravano, dopo tale periodo, disturbi motori o sensoriali attribuiti all'operazione.

### ***3.3.2 Incannulazione cronica intracerebroventricolare (i.c.v.)***

La tecnica di seguito riportata mira all'inserimento di un catetere nel ventricolo laterale cerebrale.

Il ratto in anestesia da sodio pentobarbitale e cloralio idrato (30/130 mg/kg i.p.) viene rasato sul cranio e quindi adeguatamente posizionato su di un apparecchio stereotassico. Con un bisturi si pratica longitudinalmente una incisione di circa 2 cm nella porzione mediana dell'area frontale fino all'area intraparietale, ivi si pongono 1-2 gocce di anestetico locale (ossibuprocaina cloridrato 4,0 mg/ml) per desensibilizzare ulteriormente l'area interessata all'operazione chirurgica. Tamponato con garza sterile il liquido e l'essudato residui sulla superficie cranica si localizza il *bregma* e si procede a forare l'osso parietale destro 2 mm lateralmente e posteriormente al *bregma* medesimo. Il foro viene eseguito con una punta di trapano dentistico di tipo standard posizionata perpendicolarmente alla parete della volta cranica. In posizione diametralmente opposta viene praticata una piccola sede nell'osso frontale sinistro utilizzando una fresa dentistica. L'operazione di fresatura deve essere condotta scrupolosamente onde evitare la perforazione dell'osso cranico, evento che potrebbe compromettere le successive fasi dell'operazione e causare danni cerebrali all'animale. Nella suddetta sede si inserisce una piccola vite in acciaio servendosi di una pinzetta come supporto e di un adatto cacciavite. Si può quindi collocare la porzione interna del catetere nel primo foro praticato scendendo fino a una profondità calcolata di 4,5 mm e ripiegare i due bracci del catetere costituiti dalle serpentine di filo di rame (vedi "Preparazione del catetere") facendo in modo che queste cingano la vite costituendo con essa un sistema solidale. Su quanto predisposto (catetere, filo di rame e vite) si pone una preparazione estemporanea di cemento dentistico a presa rapida

(polimetilmetacrilato) costituito da una polvere (il catalizzatore perossido di benzoile) e una fase liquida (il monomero metilmetacrilato) in modo da bloccare la base del catetere e le altre componenti del sistema di ancoraggio. In questa fase è necessario forgiare opportunamente il cemento quando questo è ancora plastico durante la ricopertura in modo che non siano presenti imperfezioni grossolane nel profilo dello stesso che, essendo di natura vetrosa, potrebbe recare danno all'animale e compromettere la tenuta della sutura e una buona cicatrizzazione della ferita. Si procede quindi al lavaggio interno della cannula tramite soluzione fisiologica sterile mediante l'ausilio di una microsiringa (Hamilton 702), alla chiusura dell'estremità superiore per compressione a caldo e infine alla suturazione della cute con filo Polifil E.P.2 (Bieffe Medital, S.A.).

### ***3.3.3 Impianto di minipompe osmotiche***

Sono state impiantate minipompe osmotiche che rilasciavano 1 $\mu$ l/h (Alzet, Model 2001) (Fig 10). Le minipompe, sterili e monouso vengono riempite con la soluzione da somministrare e avviate mediante immersione *overnight* in soluzione fisiologica. I ratti vengono brevemente anestetizzati, una incisione preticata all'altezza delle scapole tra le quali scollando la cute si ricava una tasca all'interno della quale viene deposta la minipompa. L'incisione viene suturata.



**Fig 10** *Rappresentazione grafica di minipompe osmotiche (Alzet, Model 2001)*



### ***3.3.4 Perfusionione spinale***

I ratti vengono anestetizzati con una miscela di *sodio pentobarbitale* e *cloralio idrato* (30/130 mg/kg i.p.), quindi rasati sulla parte frontale e dorsale del collo. Al fine di facilitare la respirazione dell'animale durante la perfusione, prima del posizionamento dello stesso sull'apparato stereotassico viene effettuata una tracheotomia. Quest'ultima è eseguita facendo un'incisione a metà della trachea e inserendovi poi, per circa 0,7 cm, una cannula di polietilene lunga circa 5 cm, con un'estremità opportunamente tagliata a becco di flauto per facilitarne l'inserimento in trachea.

Dopo aver fissato bene la cannula alla trachea mediante filo di sutura Polifil E.P.2 (Bieffe Medital, S.A), si procede con il posizionamento dell'animale sull'apparato stereotassico per la perfusione, facendo però sempre attenzione alle condizioni della cannula in trachea, per evitare la formazione di accumuli di secrezioni o di sangue al suo interno.

Al fine di perfondere lo spazio subaracnoideo, è necessario il posizionamento di due cateteri, entrambi inseriti attraverso la membrana atlanto-occipitale.

Il primo catetere, di ingresso, è collegato direttamente alla pompa peristaltica multicanale e, attraverso questa, al serbatoio di liquido da perfondere, opportunamente termostato.

Il secondo catetere, di uscita, è collegato mediante il braccio dell'apparato stereotassico alla pompa, e da questa ai tubi di raccolta del perfuso, mantenuti in ghiaccio.

L'incannulazione dello spazio subaracnoideo viene effettuata apportando alcune modifiche alla tecnica di Yaksh e Rudy (78).

Con un bisturi si pratica un'incisione longitudinale nel mezzo del collo, a partire da una linea a livello delle orecchie e per 2 cm

circa caudalmente; quindi, i vari strati dei muscoli sottostanti vengono divaricati e trattenuti con pinze chirurgiche, per rendere visibile la prima vertebra e la membrana atlanto-occipitale.

Usando il bordo tagliente di un ago da iniezione (21G), viene eseguita un'incisione nel centro della membrana, della sottostante dura madre e dell'aracnoide che si trova strettamente adesa a quest'ultima, facendo attenzione a non danneggiare la superficie dorsale del midollo spinale sottostante.

Dopo questa incisione, se l'operazione è eseguita correttamente, si può osservare l'uscita di una certa quantità di liquido cerebrospinale.

A questo punto, si passa ad inserire un catetere di 9-10 cm, lunghezza che permette il raggiungimento dell'allargamento lombare, a partire dalla membrana atlanto-occipitale, in un tratto di circa 300 g. Il catetere è costituito da un tubicino di polietilene (PE-10, Beckton Dickinson, diametro esterno 0.61 mm, interno 0.28 mm).

Prima di essere inserito, il catetere viene disinfettato e quindi lavato, sia internamente che esternamente, con soluzione fisiologica sterile.

L'inserimento del catetere avviene attraverso il foro praticato nella membrana atlanto-occipitale, dura madre ed aracnoide, e deve essere eseguito con lentezza e l'attenzione necessaria per non ledere il sottostante tessuto nervoso e le radici dei nervi spinali.

Il catetere inserito è collegato al tubo di mandata (PE-50) di una pompa peristaltica (Gilson Miniplus 2), che preleva liquido cerebrospinale artificiale, mantenuto immerso in un bagno termostato alla temperatura di 37°C.

Il liquido diffonde così a livello dell'allargamento lombare e risale lungo il midollo fino a raggiungere l'incisione effettuata sulla membrana atlanto-occipitale, da cui il liquido può fuoriuscire.

Attraverso il secondo tubo in PE-50 collegato a un ago, la pompa aspira il liquido in costante fuoriuscita dalla membrana, e lo convoglia all'interno dei tubi di raccolta. All'interno dei tubi sono aggiunti, prima della raccolta, 100 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'1%, perché si è osservato che in ambiente acido viene inibita la proteolisi del neuropeptide nocicettina (79).

L'ago, attraverso cui è aspirato il liquido, dev'essere opportunamente sistemato all'imboccatura del foro eseguito sulla membrana, accanto al catetere, facendo attenzione a non scendere troppo, rischiando così di danneggiare il midollo. Per poter posizionare correttamente l'ago, esso viene fissato sull'apparecchio stereotassico, e si utilizza uno stereomicroscopio per osservare la zona di lavoro con un adatto ingrandimento.

E' necessario regolare correttamente la velocità di flusso della pompa, in modo da mantenere un livello di liquido sufficiente al di sopra della membrana atlanto-occipitale, tale da evitare una possibile occlusione della cannula dovuta ad aspirazione di piccoli lembi di tessuto, oppure formazione di bolle d'aria all'interno dei tubi.

### ***3.3.5 Valutazione della soglia nocicettiva***

La soglia nocicettiva è stata determinata mediante l'impiego del test del tail-flick, una procedura analgesimetrica capace di fornire indicazioni sulla risposta degli animali a stimoli nocicettivi di natura termica nonché di determinare risposte comportamentali integrate a differenti livelli del Sistema Nervoso Centrale (ovvero a livello spinale o soprasspinale).

Il test del tail-flick permette di determinare la soglia algogena in animali liberi di muoversi, impiegando uno stimolo termico ottenuto concentrando l'energia proveniente da una sorgente luminosa. Per fini sperimentali si sceglie di concentrare

lo stimolo termico sulla coda dell'animale (ratto), che dopo un certo intervallo, corrispondente alla sua soglia algogena, risponde con uno spostamento rapido della coda (da cui "tail-flick").

L'apparecchio utilizzato (Ugo Basile, Varese), mostra automaticamente l'intervallo di tempo (in secondi e decimi di secondo), tra l'applicazione dello stimolo e la risposta dell'animale (vale a dire la soglia nocicettiva).

L'intensità della sorgente luminosa dell'apparecchio è stata opportunamente regolata in modo da determinare valori soglia basali tra 3 e 5 secondi. Al fine di evitare possibili danni tessutali, lo stimolo termico è stato applicato fino ad un tempo massimo (cut-off) di 10 secondi. Per limitare condizioni stressanti, durante la procedura sperimentale, gli animali venivano coperti e trattenuti con un panno e i valori basali della soglia nocicettiva sono stati rilevati ogni 30 minuti per un intervallo di due ore prima della somministrazione delle sostanze.

La media delle due ultime rilevazioni è stata utilizzata come valore basale.

L'azione della nocicettina o analoghi sull'analgesia prodotta dal paracetamolo è stata valutata utilizzando come procedura analgesimetrica il test dell' Hot-Plate, scelto in quanto produce due risposte comportamentali (licking e jumping), misurabili come tempo di reazione e considerate entrambe come risposte integrate di origine soprasspinale. L'apparato consiste una superficie riscaldata elettricamente (Socrel DS-35, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy) mantenuta a temperatura costante di  $54 \pm 0.4$  °C; la soglia di cut-off è stata fissata a 45 secondi.

### ***3.3.6 Binding recettoriale***

Per determinare le eventuali alterazioni della densità recettoriale del recettore NOP, in seguito a somministrazione prolungata di buprenorfina, sono stati eseguiti studi di binding recettoriale. Questa indagine è stata condotta su tre aree di interesse per la trasmissione nocicettiva, ippocampo, talamo e corteccia.

I tessuti campione, prelevati a fine trattamento secondo la metodica di Glowinski ed Iversen (80), sono stati omogeneizzati in 40 volumi di tampone A (per composizione vedi Tab. 2) in un'omogenizzatore di vetro. In seguito si è proceduto alla centrifugazione degli omogenati a 1000 x g per 10 min a 4 °C.

I sovrantanti venivano poi centrifugati a 35.000 x g per 10 min e quindi i pellets risospesi in 50 volumi di tampone B (per composizione vedi Tab. 2)

Aliquote di questa sospensione di membrane sono state utilizzate per la determinazione della concentrazione proteica, utilizzando il metodo di Lowry.

Dopo il prelievo delle aliquote necessarie per la determinazione della concentrazione proteica, alla sospensione finale è stata aggiunta albumina bovina (BSA, 2 mg/ml) e le membrane sono state immediatamente utilizzate per il binding.

Quest'ultimo è stato condotto in tampone B, in un volume finale di 0,25 ml contenente 70-100 µg di proteine/tubo. Gli esperimenti di competizione venivano effettuati in presenza di [leucyl-<sup>3</sup>H]-N/OFQ 1 nM (attività specifica 165 Ci/mmol; Amersham Biosciences).

**Tab.2** – *Composizione dei tamponi A e B impiegati per la procedura di binding recettoriale.*

---

**Tampone B** (pH 7.4)

TRIZMA base	50 mM
EDTA	2 mM
PMSF	100 $\mu$ M
BSA	0.1 %

**Tampone A** (tampone di omogeneizzazione; pH 7.4)

TRIZMA base	50 mM
EDTA	2 mM
PMSF	100 $\mu$ M
BSA	0.1 %
Saccarosio	0.3 M

---

Le curve di competizione sono state ottenute usando N/OEQ non marcata (Bachem) a nove differenti concentrazioni usando un intervallo compreso tra 0.010 e 10000 nM. I tubi da saggio, infine, sono stati incubati a 25°C per 1h.

### ***3.3.7. Purificazione dei peptidi***

I peptidi, contenuti nel sovrinatante dei campioni estratti, sono stati purificati attraverso colonnine Sep-Pak C18 (Peninsula Y 1000).

Tali colonnine vengono utilizzate previo avviamento con due soluzioni di eluizione:

- Soluzione B: 1 ml per una volta (per composizione vedi Tab. 3)
- Soluzione A: 3 ml per tre volte (per composizione vedi Tab. 3)

Terminato l'avviamento, i campioni sono addizionati di 1 ml di soluzione A ed eluiti attraverso le colonnine, eliminando poi il "run through". Successivamente, in ciascuna colonnina sono aggiunti 3 ml di soluzione A per due volte, seguiti da 3 ml di soluzione B. Questi ultimi 3 ml, contenenti il peptide purificato, vengono raccolti e posti in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

I campioni, purificati e congelati, vengono liofilizzati e nuovamente posti in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Tab. 3** - *Composizione delle soluzioni buffer A e B impiegate per la purificazione dei peptidi*

---

—

**Soluzione A**

Soluzione di acido trifluoroacetico all'1 %

1 ml di TFA a 99 ml di DW (per 100 ml di soluzione)

**Soluzione B**

Soluzione di acetonitrile al 60 % in TFA 1 %

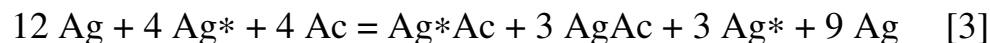
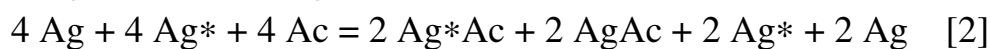
60 ml di acetonitrile + 40 ml di TFA 1 % (per 100 ml di soluzione)

---



### 3.3.8. Dosaggio radioimmunologico

I livelli di nocicettina sono stati determinati impiegando il metodo radioimmunologico. Esso si basa sull'impiego di un peptide marcato, nel nostro caso nocicettina, di un peptide freddo e di un anticorpo specifico per la nocicettina col quale il peptide forma un complesso antigene-anticorpo. La tecnica si basa sulla competizione tra il peptide freddo e una quantità fissa del peptide marcato per il legame con un numero limitato di siti anticorpali presenti in una quantità costante di antisiero. In condizioni standard, la quantità di antigene marcato legata all'anticorpo diminuirà man mano che l'antigene freddo aumenta nel campione. I principi possono essere schematizzati dalle seguenti equazioni:



dove Ac, Ag, Ag\* e AgAc rappresentano rispettivamente un equivalente di anticorpo, di antigene freddo, di antigene marcato e di complesso antigene anticorpo. La concentrazione di un campione sconosciuto viene determinata paragonando l'inibizione osservata con quella prodotta da una o più soluzioni standard che contengono quantità note del peptide di cui si deve determinare la quantità.

All'equilibrio della reazione [1] è possibile misurare separatamente la radioattività del peptide marcato non legato (Ag\*) e quella del peptide marcato legato all'anticorpo (Ag\*Ac). Il sistema viene tarato in modo che all'equilibrio della reazione [1] corrisponda un determinato valore del rapporto Ag\*Ac/Ag\*, ad esempio 1. In questo caso le concentrazioni relative di antigene marcato e di anticorpo vengono scelte in modo tale che all'equilibrio il 50 % del peptide sia in forma libera e il 50 % sia

in forma combinata. Se la reazione è fatta avvenire mantenendo costante la concentrazione dell'anticorpo e quella dell'antigene marcato, in presenza di concentrazioni crescenti di antigene nativo Ag1, Ag2, Ag3 ... Agn, si verificherà una progressiva riduzione del rapporto  $Ag^*Ac/Ag^*$ , cioè una progressiva inibizione della reazione fra l'antigene marcato e l'anticorpo, come risultato di una reazione competitiva parallela:



La quantità di antigene marcato e quindi la radioattività legata all'anticorpo, all'equilibrio [4], andrà progressivamente decrescendo al crescere della concentrazione di Ag; parallelamente andrà aumentando la quantità di antigene marcato libero  $Ag^*$ .

In dettaglio, i campioni liofilizzati vengono ripresi con 25  $\mu$ l di soluzione B (per composizione vedi Tab. 4). Come standard si utilizza la nocicettina sempre diluita in soluzione B. In ogni provetta di polistirene sono aggiunti e messi a incubare (a 4°C per 24 ore) 100  $\mu$ l di nocicettina marcata (Bachem Ltd.UK), analogamente diluita in Soluzione A (circa 5.000 cpm, per composizione Sol. A vedi Tab. 4), 25  $\mu$ l del campione e 100  $\mu$ l di antisiero per la nocicettina.

L'antisiero utilizzato, originariamente sviluppato per immunizzazione verso la nocicettina (81), denominato come Ab 96:2+ e gentilmente fornito dalla Prof. Nylander dell'Università di Uppsala (Svezia), è stato utilizzato ad una diluizione adeguata a fornire un legame del 30-34% di antigene marcato aggiunto.

Al termine del periodo di incubazione, si aggiungono 200  $\mu$ l di una sospensione di anticorpo secondario (anticorpo di pecora diretto nei confronti dell'anticorpo di coniglio; Sheep anti-rabbit antibody), allo scopo di precipitare il complesso antigene-anticorpo (nocicettina-Ab 96:2+), seguito da un nuovo

periodo di incubazione a 4°C per 45 minuti e a temperatura ambiente per altri 45 minuti.

Le provette sono infine centrifugate (4.000 giri, 4°C, per 30 minuti) e, eliminato il sovrantante, si conta la radioattività presente nel precipitato mediante un contatore di emissioni gamma (Minigamma 1275, LKB-Wallac). Le concentrazioni di materiale immunoreattivo (nocicettina nel campione) sono espresse come fmoli.

I risultati sperimentali relativi alla quantificazione di nocicettina immunoreattiva liberata sono stati riportati come femtomoli per frazione (media  $\pm$  errore standard (E.S.)), o come variazione percentuale relativa ad ogni intervallo di determinazione, rispetto alla media delle tre/quattro frazioni precedenti il trattamento.

**Tab. 4** - *Composizione delle soluzioni tampone A e B impiegate per il dosaggio radioimmunologico*

---

**Soluzione A:** tampone di RIA

- NaCl 0,15 M
- Na azide 0,02%
- Gelatina 0,1%
- Triton X-100 0,1%
- BSA 0,1%

in tampone fosfato 0,05 M pH 7,4.

**Soluzione B:** solvente dei campioni

- Metanolo/HCl 0,1 M (1:1)

## **3.4 Procedure sperimentali**

### ***3.4.1 Modalità di somministrazione della nocicettina e suoi derivati***

Per gli esperimenti i differenti gruppi di ratti sono stati somministrati per via intratecale o intracerebroventricolare, mediante l'ausilio di una microsiringa (Hamilton 702) opportunamente connessa al catetere mediante prolungamento della cannula di polietilene (PE10) ed un ago per uso dentistico (30 G; diametro esterno 0,30 mm).

Le sostanze N/OFQ, [Arg-Lys]N/OFQ, UFP-101, MAP-nocicettina sono state somministrate in volumi variabili a seconda del dosaggio impiegato, comunque compresi tra 1 e 5  $\mu$ l seguiti da un opportuno volume di veicolo per il lavaggio del catetere.

Nei gruppi sperimentali per i quali era previsto un co-trattamento (ad esempio N/OFQ + UFP-101 o [Arg-Lys]N/OFQ + UFP-101) si è proceduto mediante somministrazione unica che ha reso necessario l'inserimento di un spazio, all'interno del prolungamento, costituito da aria tra le due sostanze per evitare il preventivo miscelamento delle stesse e agevolare l'intera operazione di somministrazione che grazie a tale riferimento è risultata maggiormente precisa e accurata. I gruppi di controllo sono stati trattati con soluzione fisiologica sterile (NaCl 0,9%) seguendo le stesse modalità riportate precedentemente per ciascuno dei gruppi sperimentali.

Lo studio sull'effetto della nocicettina sul profilo farmacologico dell'analgescico paracetamolo, è stato condotto somministrando in ratti, impiantati con cannule per la somministrazione intracerebroventricolare (I.C.V.), la nocicettina o salina come controllo alla dose di 1, 5, 10 nmol 5 minuti prima della somministrazione di paracetamolo (400 mg/kg i.p.), stesso

vale per l'analogo della nocicettina Arg-Lys nocicettina somministrato alle dosi di 0,1, 0,2, 0,5 e 2 nmol.

### ***3.4.2 Trattamento cronico con buprenorfina.***

Per determinare la densità recettoriale di NOP a seguito di un trattamento prolungato con buprenorfina, due gruppi di ratti maschi Sprague-Dawley sono stati impiantati con minipompe osmotiche (Alzet 2001) rilascianti rispettivamente buprenorfina con un rate di 3.125 mg/h (i.e. 0.3 mg/kg/die) o veicolo come controllo per ciascun gruppo di ratti. Dopo 7 giorni i ratti sono stati sacrificati, le aree prelevate e le eventuali alterazioni della densità recettoriale del recettore NOP sono state determinate tramite studi di binding recettoriale omologo per competizione nel talamo, ippocampo e corteccia frontale.

### ***3.4.3 Perfusiones dello spazio subaracnoideo.***

Per le prime esperienze di perfusione, è stato utilizzato solo liquido cerebrospinale (CSF) artificiale, la cui composizione è riportata in Tab. 5.

I primi 30-45 minuti di ogni perfusione sono necessari per raggiungere un corretto assestamento delle condizioni operative. Le perfusioni sono state poi proseguite per almeno due-quattro ore.

Sono state effettuate raccolte di frazioni di perfusato ad una velocità di flusso della pompa di 100 µl/min per 15 minuti (1,5 ml ogni campione).

Nei successivi esperimenti, al CSF artificiale è stata aggiunta, al momento dell'uso, una soluzione contenente due diversi inibitori delle proteasi, *fenilmetilsulfonil-fluoruro* (PMSF) e *tiorfano*. Per questa ragione, sia la soluzione di CSF che quella

di inibitori devono essere preparate in concentrazione 2x e di seguito miscelate in rapporto 1:1.

Le singole soluzioni di ogni inibitore sono state preparate in modo tale da avere una concentrazione finale di 2 mM per il PMSF e di 0,2 mM per il tiorfano. Per permetterne la dissoluzione, il PMSF deve prima essere dissolto in 100 µl di etanolo puro.

La presenza degli inibitori delle proteasi limita la degradazione del neuropeptide nocicettina. E' stato osservato, infatti, che essa è causata principalmente da due diverse proteasi: l'endopeptidasi-24.11 (82) e la serina-endopeptidasi, che induce il rilascio del più importante metabolita della nocicettina, ovvero il frammento 1-11 (83). Un efficace inibitore dell'endopeptidasi-24.11 è risultato essere il tiorfano; il PMSF si comporta invece da inibitore irreversibile della serina-endopeptidasi, agendo con meccanismo di solfonazione del residuo di serina nel sito attivo della proteasi. La scelta di questi due inibitori delle proteasi si è basata, oltre che sull'elevata efficacia di inibizione (82), anche sulla mancanza di interferenza con la coagulazione del sangue, rendendo così più semplice la centrifugazione dei campioni raccolti e, di conseguenza, l'eliminazione dei residui di sangue accidentalmente perfusi. Il PMSF, infatti, non chelando i metalli, non interferisce con i processi di coagulazione del sangue.

Nelle successive esperienze di perfusione, al CSF artificiale è stato aggiunto, oltre alla miscela dei due inibitori, anche BSA (Bovine Serum Albumin) con una concentrazione finale di 0,3 %, con lo scopo di limitare le perdite di nocicettina che possono verificarsi per la capacità delle sostanze di natura peptidica di aderire alle varie superfici con cui vengono a contatto, in virtù di interazioni aspecifiche (ad es. forze di Van der Waals).

In seguito, il nostro interesse si è concentrato sugli effetti di alcuni stimoli esterni sulla liberazione spinale di nocicettina.

La prima tipologia di stimolo che abbiamo considerato è stata la perfusione di un'elevata concentrazione di ione potassio al fine di indagare la liberabilità del neuropeptide da elementi eccitabili.

Dopo circa 60-90 minuti dall'inizio della perfusione di liquido cerebrospinale artificiale, addizionato di BSA e di inibitori delle proteasi, è stato perfuso CSF artificiale arricchito di potassio 60 mM (Tab. 6), per 5 minuti ad una velocità di flusso di 100  $\mu$ l/min. L'isotonicità è stata mantenuta riducendo la concentrazione di NaCl da 150 a 93 mM (considerando la presenza di 3 mM di KCl). Sono quindi state raccolte frazioni da 15 minuti per le successive due ore circa.

Il secondo tipo di stimolazione che abbiamo valutato riguarda la somministrazione di due sostanze ad azione irritante, in particolare 50  $\mu$ l di formalina 5 %, ottenuta da formaldeide 36 % (Sigma) e 100  $\mu$ l di carragenina 3 % (Lambda, Sigma), entrambe somministrate, in studi diversi, per iniezione sottocutanea subplantare in ambedue le zampe posteriori.

**Tab. 5** - *Composizione del liquido cerebrospinale artificiale*

---

**Soluzione A**

- NaCl	150 mM
- KCl	3 mM
- CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	1,4 mM
- MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,8 mM

**Soluzione B**

- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,8 mM
- NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O	0,2 mM

Le due soluzioni vengono miscelate in rapporto 1:1.

La concentrazione finale di ogni ione, in mM, è 150 per il sodio, 3,0 per il potassio, 1,4 per il calcio, 0,8 per il magnesio, 1,0 per il fosforo e 155 per il cloro.



**Tab. 6** - *Preparazione del liquido cerebrospinale contenente  $K^+$  60 mM*

---

**Soluzione A**

- NaCl	93 mM
- KCl	60 mM
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,4 mM
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,8 mM

**Soluzione B**

- $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0,8 mM
- $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,2 mM

Le due soluzioni vengono miscelate in rapporto 1:1.

La concentrazione finale di ogni ione, in mM, è 93 per il sodio, 60,0 per il potassio, 1,4 per il calcio, 0,8 per il magnesio, 1,0 per il fosforo e 155 per il cloro.

### **3.5 Analisi statistica**

I risultati sperimentali relativi alle risposte comportamentali del tail-flick sono stati riportati come media  $\pm$  errore standard (E.S.) ottenuta in ciascun gruppo sperimentale agli appropriati intervalli di determinazione.

I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Newman-Keuls.

I risultati sperimentali relativi alle risposte comportamentali del hot-plate test è stata espressa come percentuale del massimo possibile effetto (% MPE) I dati sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni.

I dati derivanti dal dosaggio radioimmunologico di nocicettina sono stati analizzati mediante il test t di Student (84), ponendo il livello di significatività statistica a  $P < 0,05$ .

Gli esperimenti di binding omologo per piazzamento sono stati analizzati tramite software Graphpad Prism per ottenere i valori di Bmax relativi, i valori di Kd sono stati ottenuti precedentemente nel nostro laboratorio con saggi di binding omologo per saturazione. Le curve di piazzamento sono state comparate con un two-tailed T-test.

## 4. RISULTATI

---

### 4.1 Somministrazione di nocicettina e derivati.

#### 4.1.1 *Effetti della somministrazione intratecale di nocicettina, [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]nocicettina e UFP-101 sulla soglia nocicettiva nel ratto.*

La somministrazione intratecale del neuropeptide nocicettina (10 nmol/ratto) ha determinato un innalzamento statisticamente significativo delle latenze di risposta al test del tail-flick.

Infatti, come si può osservare dalla Fig.-11-A, già a 5 minuti dalla somministrazione di nocicettina, i valori sono risultati significativamente più elevati rispetto ai controlli ricevuti il veicolo costituito da liquido cerebrospinale artificiale (CSF; 5 ul/ratto i.t.).

Tale differenza si è mantenuta a livelli significativi per tutto il periodo di rilevazione, mostrando comunque una tendenza a diminuire progressivamente ai tempi di determinazione corrispondenti a 30 e 60 minuti.

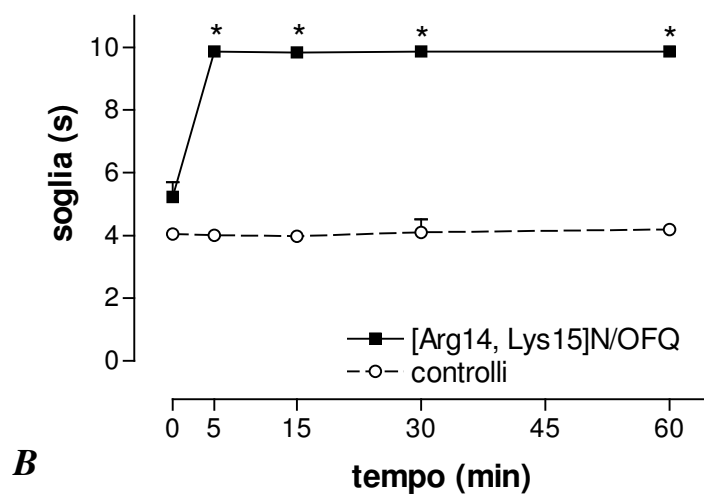
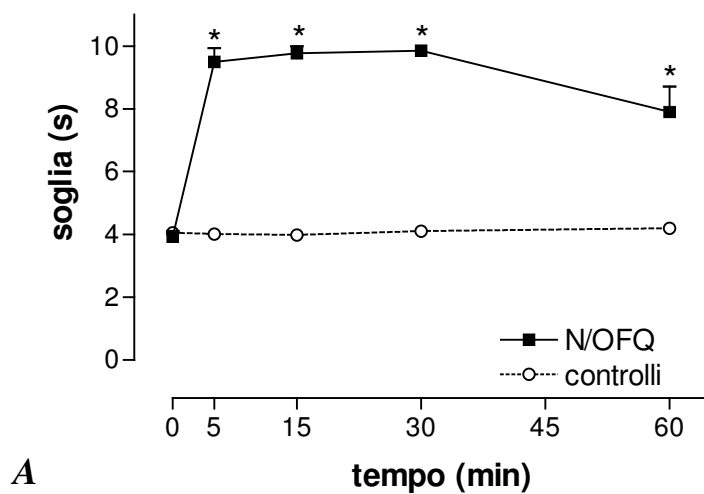
L'analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ è stato inizialmente somministrato alla dose di 1 nmole/ratto i.t., tenendo conto del fatto che nelle sperimentazioni in vitro, questo composto ha dimostrato una potenza da 10 a 30 volte superiore a quella della nocicettina (64).

A questa dose, [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ ha provocato un innalzamento massimale delle soglie di latenza per tutto il periodo di osservazione (Fig.-11-B). Si è quindi passati alla ricerca di un dosaggio capace di indurre effetti sottomassimali in previsione di studi tesi ad indagare la modulabilità farmacologica dell'effetto stesso.

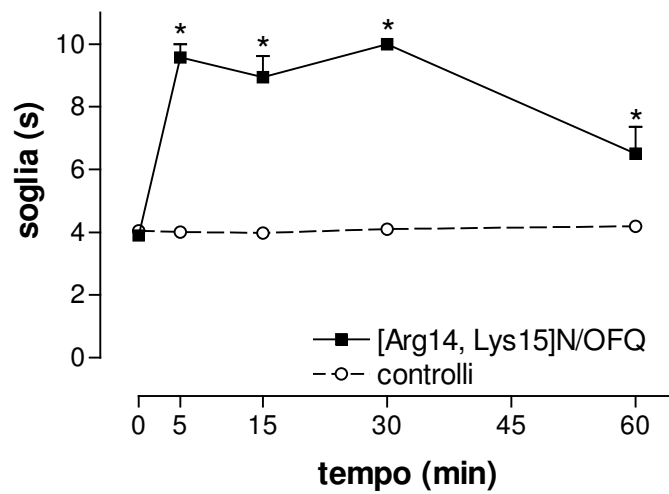
Tale dosaggio è stato individuato in 0,2 nmoli/ratto i.t., infatti, come mostrato in Fig.-12-C, la somministrazione di [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ a questa dose provoca un effetto antinocicettivo sottomassimale che, pur dimostrandosi significativo rispetto ai controlli ( $p < 0,05$  vs controlli a tutti i tempi di rilevazione), si situa al di sotto del tempo massimo di applicazione dello stimolo nocicettivo (cut-off time) e tende a diminuire all'ultimo tempo di determinazione (60 minuti).

L'analogo della nocicettina, denominato [Nphe<sup>1</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ(1-17)NH<sub>2</sub> o UFP-101 e sviluppato con l'intento di ottenere un ligando per il recettore NOP ad attività antagonista (65), non si è dimostrato in grado di alterare la soglia nocicettiva del ratto in un range di dosi da 1 a 20 nmoli/ratto i.t..

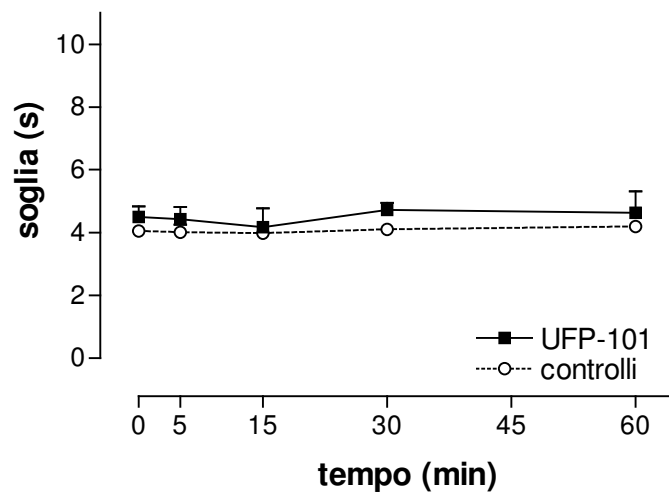
Infatti, come illustrato nella Fig.-12-D, la dose massima impiegata (20 nmoli/ratto i.t.) non ha provocato alterazioni significative della soglia rispetto ai controlli, per tutto il tempo di determinazione.



**Fig. 11** - Effetto antinocicettivo determinato mediante il test del tail-flick, in ratti cronicamente incannulati nello spazio subaracnoideo. \* =  $p < 0,05$  vs controlli, in seguito a somministrazione di: A) nociceptina (10 nmoli/ratto i.t.) B) [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ (abbr: [A-L]; 1 nmole/ratto i.t)



**C**



**D**

**Fig. 12** - Effetto antinocicettivo determinato mediante il test del tail-flick, in ratti cronicamente incannulati nello spazio subaracnoideo. \* =  $p < 0,05$  vs controlli, in seguito a somministrazione di: C) [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ (0,2 nmoli/ratto i.t.) D) UFP-101 (20 nmoli/ratto i.t.)

#### ***4.1.2 Effetti della co-somministrazione intratecale di nocicettina, [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]nocicettina con UFP-101 sulla soglia nocicettiva nel ratto.***

La capacità dell'analogo UFP-101 di antagonizzare l'effetto antinocicettivo esercitato dalla nocicettina a livello spinale è stata indagata procedendo a co-somministrare differenti dosi dell'UFP-101 stesso (10 e 20 nmoli/ratto i.t.) assieme alla dose di 10 nmoli/ratto di nocicettina.

Come illustrato nella Fig. 13-A, la dose di 10 nmoli/ratto di UFP-101 ha sensibilmente ridotto l'entità e la durata dell'effetto antinocicettivo del neuropeptide che, tuttavia, è risultato ancora in grado di elevare significativamente i valori della soglia nocicettiva a 5 minuti dalla somministrazione, rispetto ai controlli.

Invece, come illustrato in Fig. 13-B, l'efficacia antinocicettiva della medesima dose di nocicettina (10 nmoli/ratto i.t.), è risultata completamente bloccata dalla co-somministrazione i.t. di 20 nmoli/ratto di UFP-101.

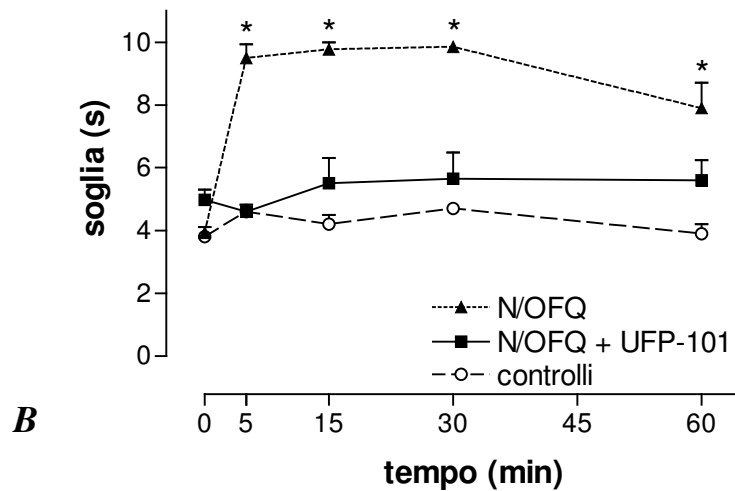
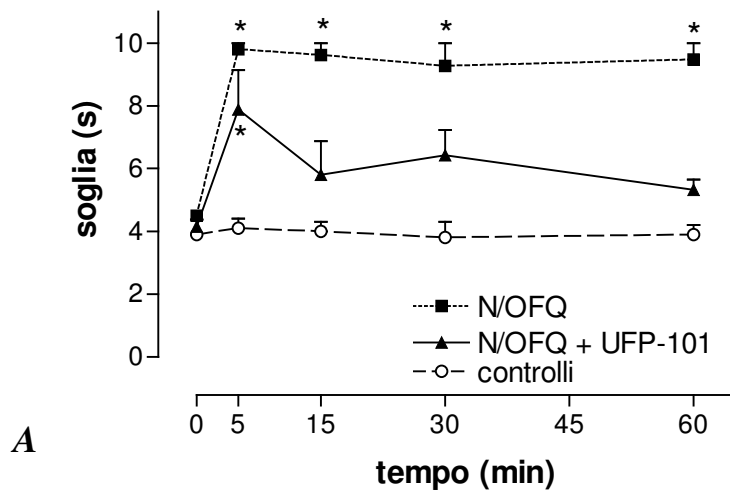
La capacità dell'UFP-101 di antagonizzare l'effetto antinocicettivo dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ è stata inizialmente indagata co-comministrando l'UFP-101 in un range di dosi tra 1 e 10 nmoli/ratto i.t. assieme alla dose di 1 nmole/ratto i.t. di [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ.

In queste condizioni, l'UFP-101 non si è mai dimostrato in grado di bloccare efficacemente l'azione dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ. Infatti, come mostrato in Fig.14-C, anche la dose più elevata di UFP-101 impiegata (10 nmoli/ratto i.t.) è risultata solamente in grado di ridurre l'effetto dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ all'ultimo tempo di rilevazione (60 minuti dalla somministrazione).

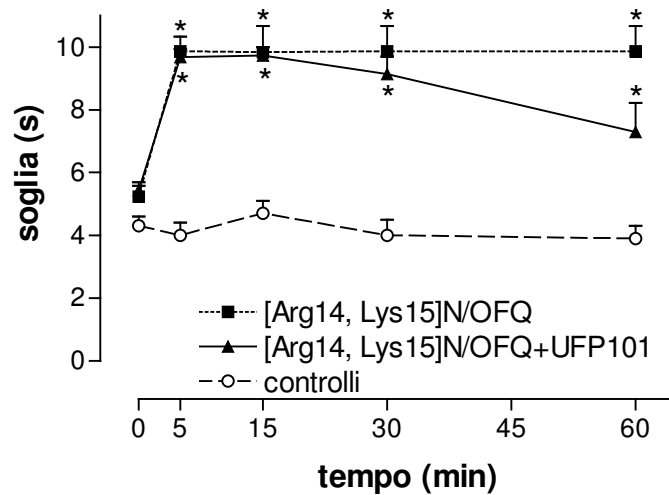
Tuttavia, l'impiego dello stesso range di dosi di UFP-101, utilizzata nei confronti della dose pari a 0,2 nmoli/ratto di

[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ che, come risulta dalla Fig. 14-C, produce un effetto sottomassimale seppur significativo, ha permesso di evidenziare la piena capacità dell'UFP-101 stesso di antagonizzare efficacemente fino a bloccare completamente l'azione antinocicettiva dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ alla dose pari a 4 nmoli/ratto i.t. (Fig. 14-D).

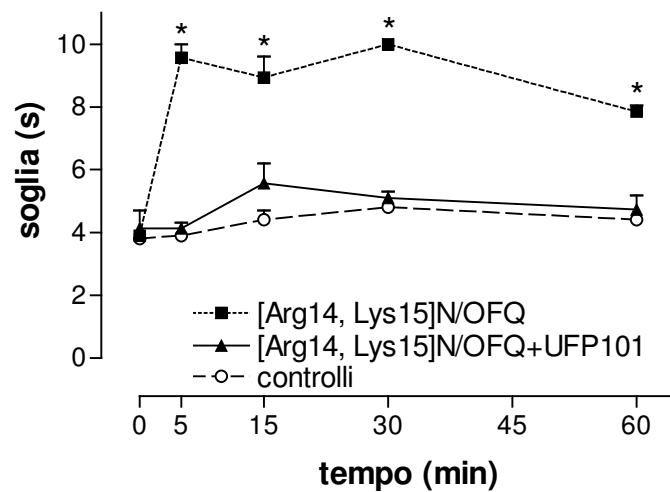




**Fig. 13** - Effetto sulla soglia nocicettiva determinato mediante Test del tail-flick, in ratti cronicamente incannulati nello spazio subaracnoideo (\* =  $p < 0,05$  vs controlli) della somministrazione di A) nocicettina N/OFQ (10 nmoli/ratto i.t.) o di N/OFQ (10 nmoli) più UFP-101 (10 nmoli/ratto) B) N/OFQ; (10 nmoli/ratto i.t.) o di N/OFQ (10 nmoli) più UFP-101 (20 nmoli/ratto



C



D

**Fig. 14** - Effetto sulla soglia nocicettiva determinato mediante Test del tail-flick, in ratti cronicamente incannulati nello spazio subaracnoideo (\* =  $p < 0,05$  vs controlli) della somministrazione di C)  $[Arg^{14}, Lys^{15}]N/OFQ$  (1 nmole/ratto i.t.) o di  $[Arg^{14}, Lys^{15}]N/OFQ$  (1 nmoli) più UFP-101 (10 nmoli/ratto) D) di  $[Arg^{14}, Lys^{15}]N/OFQ$  (0,2 nmole/ratto i.t.) o di  $[Arg^{14}, Lys^{15}]N/OFQ$  (0,2 nmoli) più UFP-101 (4 nmoli/ratto)

## **4.2 Somministrazione del dendrimero MAP-N/OFQ.**

### ***4.2.1 Effetti della somministrazione intratecale di MAP-N/OFQ.***

La somministrazione intratecale di MAP-N/OFQ si è dimostrata in grado di modificare la soglia nocicettiva determinata mediante il test del tail-flick, nel ratto.

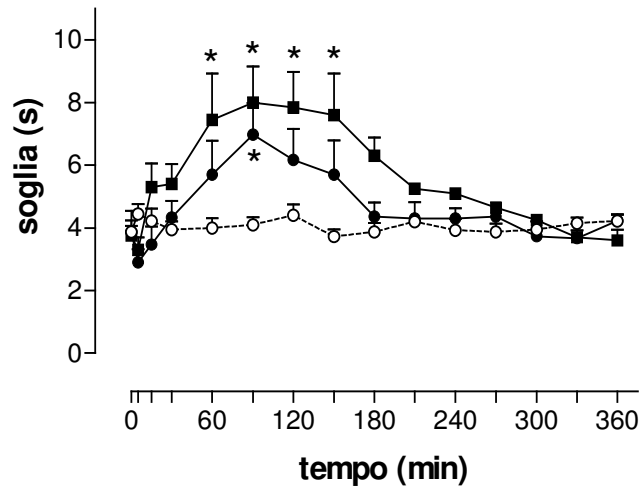
Infatti, come mostrato in Fig. 15-A, già alla dose di 0,1 nmoli/ratto i.t. il dendrimero ha determinato un moderato aumento delle soglie che si è rivelato statisticamente significativo rispetto ai controlli solo al tempo 90 min dopo la somministrazione.

Differentemente, la dose di MAP-N/OFQ pari a 0,5 nmoli/ratto ha provocato un innalzamento più prolungato della soglia nocicettiva, con valori significativamente superiori ai controlli ai tempi di rilevazione compresi tra 30 e 150 min dalla somministrazione (Fig. 15-A).

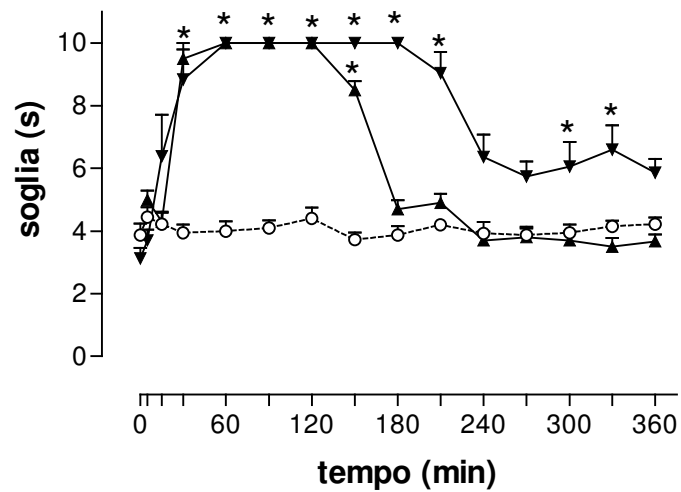
La somministrazione intratecale di dosi superiori di MAP-N/OFQ, pari a 2 o 10 nmoli/ratto, ha provocato marcati effetti a carico delle soglie nocicettive determinate mediante il test analgesimetrico adottato.

Infatti, come mostrato in Fig. 15-B, la dose di 2 nmoli/ratto di MAP-N/OFQ ha determinato un rapido incremento dei valori della soglia che è risultata pari ai valori massimi (cut-off = 10 secondi) ai tempi 60, 90 e 120 min dalla somministrazione.

Infine, la dose di 10 nmoli/ratto i.t. ha determinato un rapido e progressivo aumento dei valori che si sono mantenuti ai livelli massimi ai tempi di determinazione compresi tra 30 e 180 min dalla somministrazione. Dopo quest'ultimo tempo di rilevazione, le soglie sono progressivamente diminuite pur mantenendosi a livelli significativamente superiori rispetto ai controlli fino a circa 330 minuti dalla somministrazione.



**A**



**B**

**Fig. 15** - Effetto della somministrazione *i.t.* di differenti dosi di MAP-N/OFQ A) (0,1 nmoli/ratto -●-, 0,5 nmoli/ratto -■-) B) MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto -▲-, 10 nmoli/ratto -▼-) a carico della soglia nocicettiva, determinata mediante il test del tail-flick. \* =  $p < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5  $\mu$ l/ratto *i.t.*, -○-).

#### ***4.2.2 Effetti di somministrazioni intratecali ripetute di MAP-N/OFQ.***

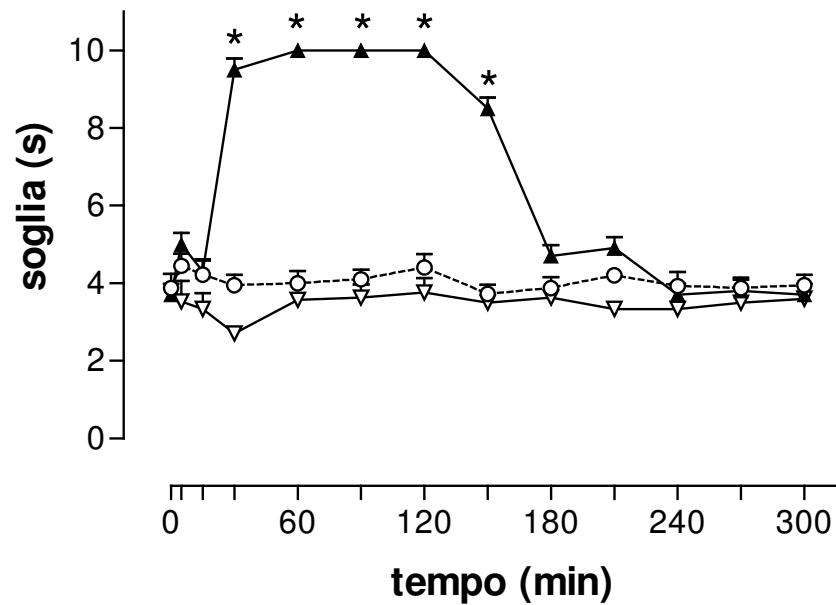
La lunga durata degli effetti antinocicettivi osservati dopo la somministrazione intratecale di differenti dosi di MAP-N/OFQ nonché la consapevolezza della possibilità di effetti prolungati, derivante dai dati di letteratura (66) che testimoniano una elevata stabilità metabolica della molecola in esame, ci hanno indotto ad indagare possibili modificazioni dell'efficacia del dendrimero a seguito di somministrazioni ripetute.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la pressoché totale inefficacia della seconda somministrazione di MAP-N/OFQ nell'innalzare le soglie nocicettive al test del tail-flick.(Fig 16)

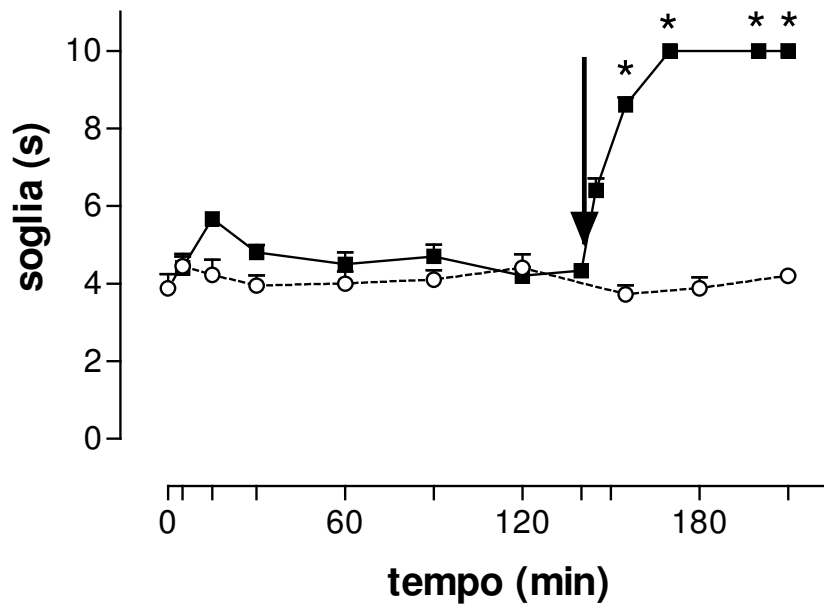
La particolare drammaticità del fenomeno osservato, vale a dire la completa inefficacia mostrata dalla seconda somministrazione di MAP-N/OFQ nel modificare le soglie nocicettive, ci ha indotto a ricercare l'eventuale presenza di componenti non farmacologiche eventualmente responsabili della non responsività degli animali alla somministrazione intratecale.

Per questo scopo è stata somministrata morfina cloridrato alla dose di 10 µg/ratto i.t. in animali che avevano ricevuto, 140 minuti prima, la seconda somministrazione di MAP-N/OFQ (2 nmoli/ratto i.t.) rivelatasi, fino a quel momento, totalmente inefficace.

Come mostrato in Fig. 17, l'oppiaceo si è dimostrato pienamente in grado di innalzare la soglia nocicettiva che già a 30 minuti si è stabilizzata a valori massimali (cut-off = 10 secondi).



**Fig. 16** - Effetto della somministrazione i.t. MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto) in differenti gruppi di ratti rispettivamente pretrattati, ventiquattro ore prima, con MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto -▲-) o con veicolo (5  $\mu$ l/ratto i.t., -∇-), a carico della soglia nocicettiva, determinata mediante il test del tail-flick.\* =  $P < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5  $\mu$ l/ratto i.t., -○-).



**Fig. 17** - Effetto della somministrazione i.t. di morfina cloridrato ( $10 \mu\text{g}/\text{ratto}$ ), effettuata 140 minuti (vedi freccia) dopo la somministrazione i.t. di MAP-N/OFQ ( $2,0 \text{ nmoli}/\text{ratto}$ ) in ratti rispettivamente pretrattati, ventiquattro ore prima, con MAP-N/OFQ ( $2,0 \text{ nmoli}/\text{ratto}$  -▲-), a carico della soglia nocicettiva, determinata mediante il test del tail-flick. \* =  $P < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo,  $5 \mu\text{l}/\text{ratto}$  i.t., -○-).

### ***4.2.3 Effetti della somministrazione intratecale di UFP-101 sull'azione antinocicettiva della MAP-N/OFQ.***

Per indagare l'effettivo coinvolgimento del recettore NOP per la nocicettina, si è proceduto ad indagare gli effetti della somministrazione intratecale di un antagonista per il NOP, quale l'UFP-101, in animali trattati, 40 minuti prima, con MAP-N/OFQ (2 nmoli/ratto i.t.).

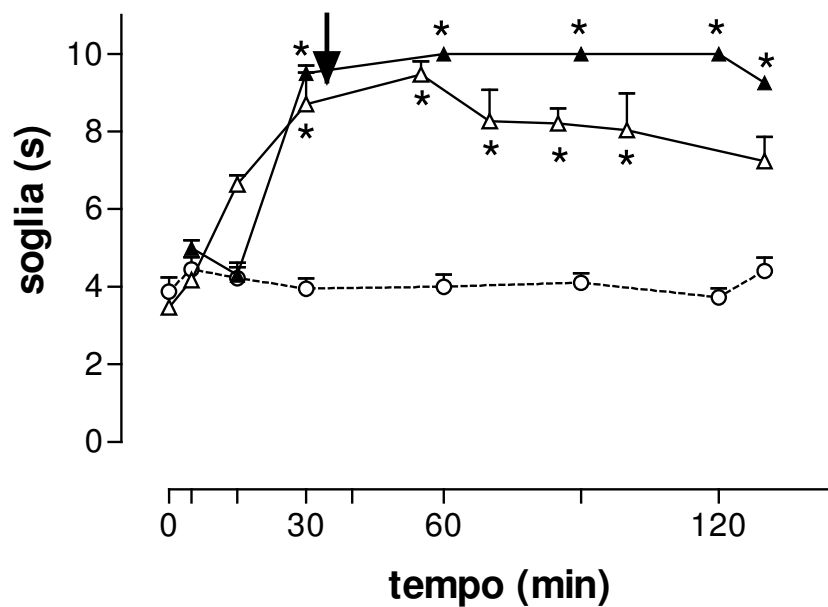
Come si può osservare nella Fig. 18, la somministrazione di UFP-101 ha determinato un abbassamento dei tempi di latenza rispetto agli animali che avevano ricevuto solo MAP-N/OFQ.

Tuttavia, l'abbassamento osservato si è rivelato parziale ed i valori della soglia si sono comunque mantenuti a livelli significativamente superiori rispetto ai controlli fino a 100 minuti dalla somministrazione iniziale di MAP-N/OFQ (60 minuti dalla somministrazione di UFP-101 ).

Al fine di ottenere ulteriori informazioni sul coinvolgimento del recettore NOP sulle azioni esercitate dalla MAP-N/OFQ, si è proceduto a somministrare nuovamente, a 24 ore di distanza, la medesima dose del dendrimero (2 nmoli/ratto i.t.) negli animali che avevano ricevuto MAP-N/OFQ più UFP-101 il giorno precedente.

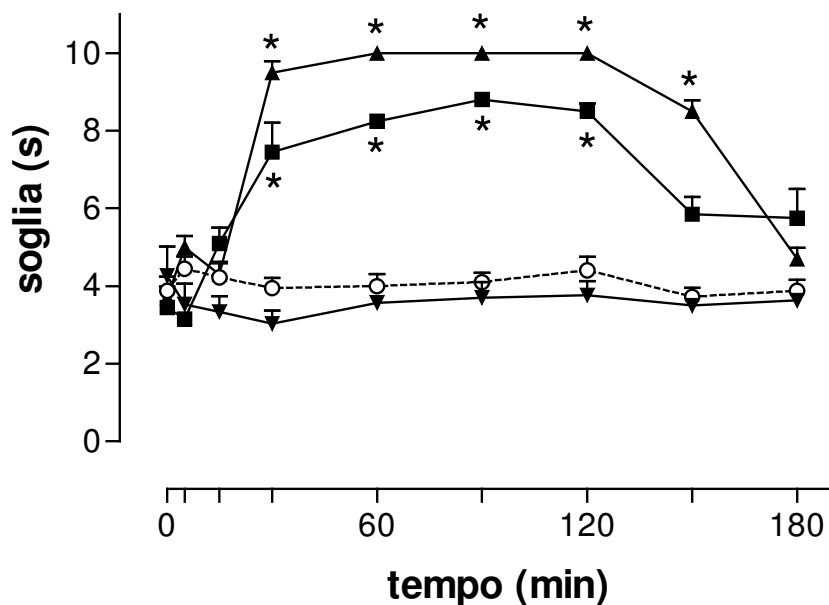
Come si può osservare nella Fig. 19, la MAP-N/OFQ si è dimostrata in grado di innalzare significativamente le soglie nocicettive. Tale innalzamento si è rivelato inferiore a quello determinato dalla MAP-N/OFQ stessa in animali naïve ma comunque ben superiore e statisticamente significativo in confronto ai controlli e, soprattutto, rispetto al gruppo di animali che avevano ricevuto 2 nmoli/ratto di MAP 24 ore dopo la somministrazione della medesima dose di sola MAP-N/OFQ.





**Fig. 18** - Effetto della somministrazione i.t. di UFP-101 (20 nmoli/ratto), effettuata 40 minuti (vedi freccia) dopo la somministrazione i.t. di MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto -Δ-), o di sola MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto -▲-), a carico della soglia nocicettiva, determinata mediante il test del tail-flick.

\* =  $P < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5 µl/ratto i.t., -○-).



**Fig. 19** - Effetto della somministrazione i.t. MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto) in differenti gruppi di ratti rispettivamente pretrattati, ventiquattro ore prima, con MAP-N/OFQ (2,0 nmoli/ratto i.t. -▼-) o con veicolo (5  $\mu$ l/ratto i.t., -▲-) o con MAP/NOFQ + UFP-101 (2,0 nmoli/ratto i.t. + 20 nmoli/ratto i.t., -■-), a carico della soglia nocicettiva, determinata mediante il test del tail-flick. \* =  $P < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5  $\mu$ l/ratto i.t., -○-).

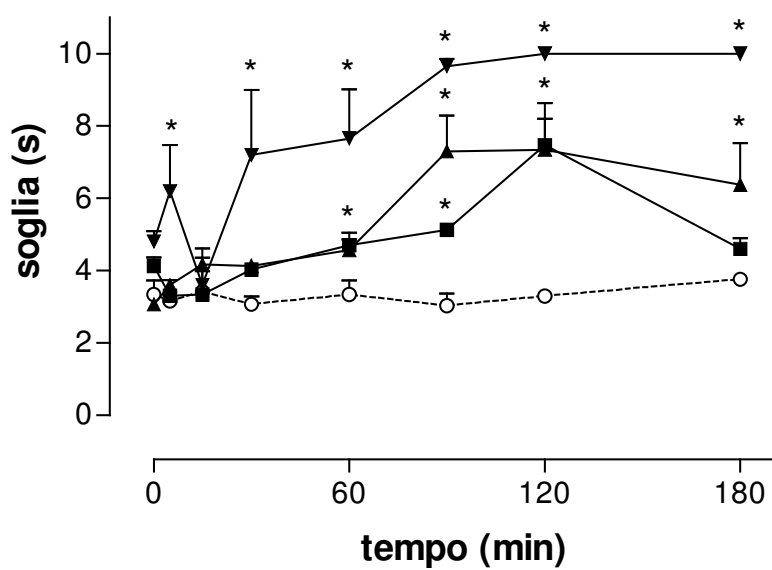
#### ***4.2.4 Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di MAP-N/OFQ.***

La somministrazione intracerebroventricolare di MAP-N/OFQ si è dimostrata in grado di modificare la soglia nocicettiva dei ratti. Infatti, come mostrato in Fig. 20, si è registrato un innalzamento dei valori dose-correlato e di lunga durata.

L'effetto determinato dalle due dosi inferiori ha raggiunto il massimo a 90 o 120 minuti, rispettivamente per la dose pari a 1 e 0,2 nmoli/ratto i.c.v. Mentre i valori rilevati per la dose di 0,2 nmoli/ratto sono poi progressivamente diminuiti fino risultare non più significativamente differenti ai controlli al tempo 180, quelli determinati dalla somministrazione di 1 nmole/ratto i.c.v. di MAP-N/OFQ si sono mantenuti a livelli significativamente elevati fino al termine della rilevazione (180 min).

La dose massima impiegata (2 nmoli/ratto i.c.v.) ha determinato un rapido e progressivo incremento dei valori della soglia che a 90 minuti circa dalla somministrazione hanno raggiunto il massimo (cut-off = 10 secondi) per poi rimanere a livelli massimali per tutto l'intervallo di osservazione.

Occorre rilevare che nelle nostre condizioni sperimentali, a differenza di alcuni risultati riportati in letteratura, la somministrazione delle differenti dosi del dendrimero MAP-N/OFQ non ha mai provocato un abbassamento della soglia nocicettiva al di sotto dei valori registrati nel gruppo di controllo. Questo fatto, che peraltro può trovare giustificazione già nelle precise condizioni sperimentali adottate, verrà più ampiamente discusso in Conclusioni alla luce dell'intero quadro di informazioni esistente sugli effetti cerebrali della N/OFQ a carico della trasmissione nocicettiva.



**Fig. 20** - Effetto della somministrazione i.c.v. di differenti dosi di MAP-N/OFQ (0.2 nmoli/ratto-■-, 1 nmoli/ratto-▲- e 2 nmoli /ratto-▼-) a carico della soglia nocicettiva, determinata mediante il test del tail-flick. \* =  $p < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5  $\mu$ l/ratto i.c.v., -○-).

#### ***4.2.5 Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di MAP-N/OFQ sull'azione antinocicettiva della morfina.***

Al fine di indagare se, e in che misura, la MAP-N/OFQ replica “l’antagonismo funzionale” nei confronti degli effetti del sistema oppioide già noto e descritto per la N/OFQ, è stata studiata la capacità di differenti dosi di MAP-N/OFQ di alterare l’effetto antinocicettivo della morfina.

Come mostrato in Fig. 21, la co-somministrazione di MAP-N/OFQ alle dosi 0,2 e 1 nmoli/ratto i.c.v. assieme a morfina (5 µg/ratto i.c.v.), ha determinato una drammatica modificazione dell’effetto antinocicettivo della morfina.

Infatti, mentre negli animali che avevano ricevuto solo morfina si è registrato un marcato aumento delle latenze di risposta che, già significativamente superiori ai controlli al 30° minuto, si sono mantenute elevate per tutto l’intervallo di rilevazione, in entrambi i gruppi che avevano ricevuto MAP-N/OFQ, l’oppiaceo non è stato in grado di innalzare significativamente la soglia nocicettiva per tutto il periodo di osservazione.

Al fine di indagare se l’azione anti-oppioide appena riportata per la MAP-N/OFQ si mantiene inalterata nel tempo o si verifichi una sorta di tolleranza per la suddetta azione anti-oppioide, lo studio di co-somministrazione di MAP-N/OFQ e di morfina è stato ripetuto per due giorni consecutivi nei medesimi gruppi di animali.

I risultati ottenuti (vedi Fig. 22) hanno indicato che nella seconda sessione sperimentale l’azione di blocco esercitata dalla MAP-N/OFQ (0,2 nmoli/ratto i.c.v.) nei confronti dell’effetto antinocicettivo della morfina (5 µg/ratto i.c.v.) risulta attenuato. Infatti, nel gruppo che aveva per la seconda volta la co-somministrazione di MAP-N/OFQ e morfina, i valori della soglia sono progressivamente aumentati fino a risultare significativamente superiori ai controlli e non significativamente

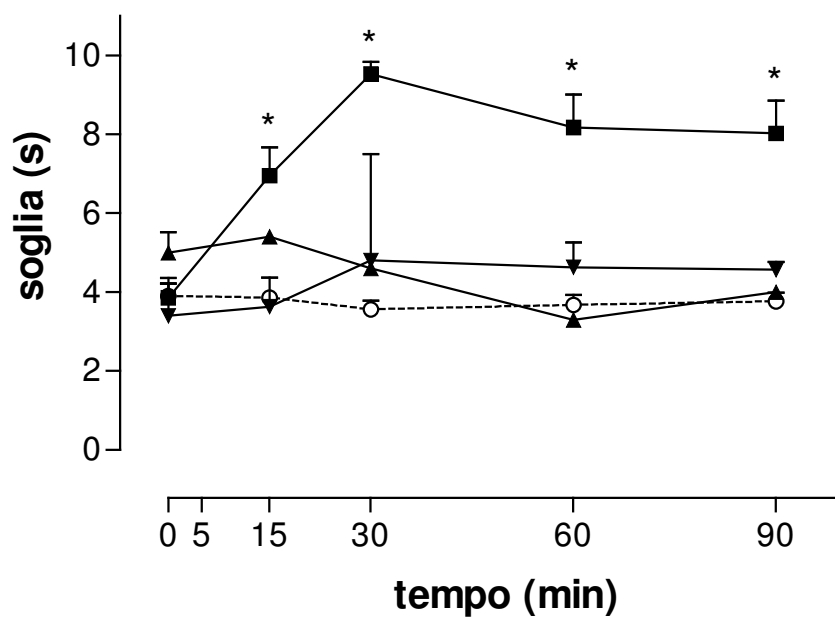
differenti dal gruppo ricevente sola morfina, ai tempi 60 e 90 minuti.

Dal momento che gli effetti della MAP-N/OFQ, somministrata per via i.c.v., sulla soglia nocicettiva si sono rivelati abbastanza prolungati nel tempo (vedi Fig. 20) e, ancor più, per il fatto che il dendrimero in studio ha dimostrato una marcata stabilità metabolica, abbiamo voluto indagare le eventuali modificazioni dell'effetto antinocicettivo della morfina in ratti pretrattati 24 ore prima con differenti dosi di MAP-N/OFQ.

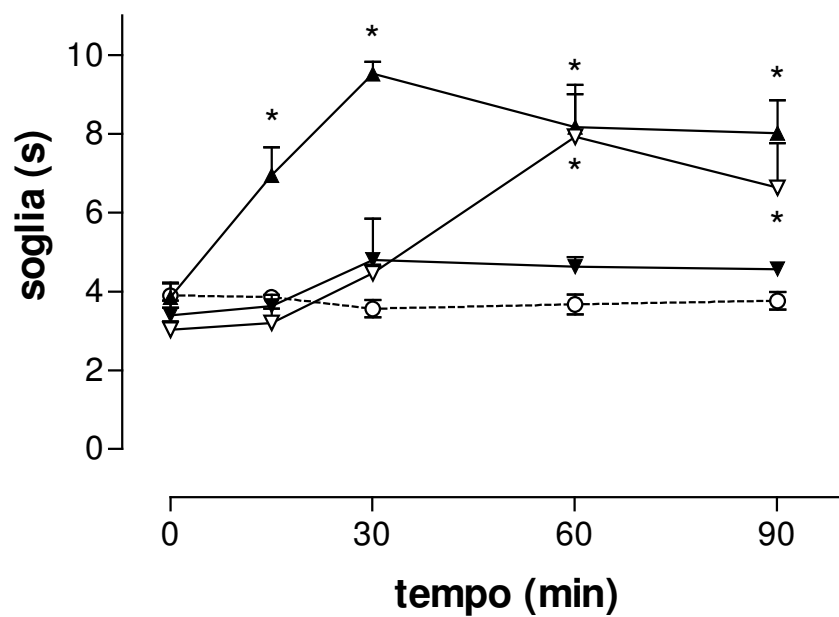
I risultati osservati hanno fornito indicazioni interessanti. Infatti, come mostrato in Fig. 23, la morfina (5 µg/ratto i.c.v.) ha prodotto un effetto antinocicettivo pressoché inversamente correlato alla dose di MAP-N/OFQ somministrata 24 ore prima ai differenti gruppi di animali.

In particolare, nel gruppo pretrattato con 0,2 nmoli di MAP-N/OFQ, si è registrato un marcato ritardo nell'instaurarsi dell'effetto della morfina tale per cui i valori della soglia non sono risultati statisticamente superiori ai controlli fino a 60 minuti dalla somministrazione dell'oppiaceo.

Per quanto riguarda i due gruppi di ratti pretrattati 24 ore prima con 1 o 2 nmoli/ratto i.c.v., la morfina ha prodotto un innalzamento significativo delle soglie solamente al tempo 60 minuti dalla sua somministrazione.

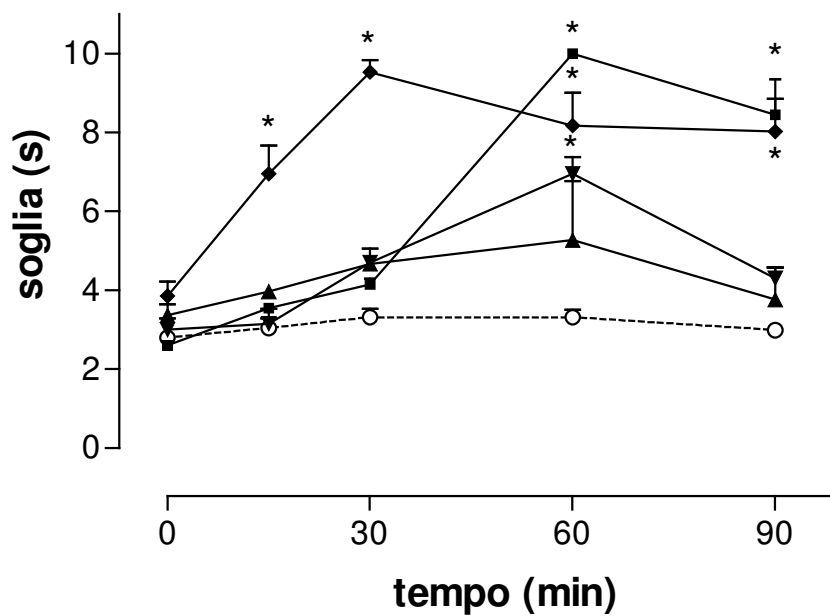


**Fig. 21** – Effetti a carico della soglia nocicettiva (test del tail-flick) determinati dalla somministrazione di sola morfina (5 µg/ratto i.c.v., -■-) o di morfina (5 µg/ratto i.c.v.) assieme a 0.2 (-▼-) o 1 (-▲-) nmoli/ratto i.c.v. di MAP-N/OFQ. \* =  $p < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5 µl/ratto, -○-).



**Fig. 22** – Effetti a carico della soglia nocicettiva (test del tail-flick) determinati dalla somministrazione di sola morfina ( $5\mu\text{g}/\text{ratto}$  i.c.v., -▲-) e di morfina ( $5\mu\text{g}/\text{ratto}$  i.c.v.) assieme a  $0.2$  nmoli/ $\text{ratto}$  i.c.v. di MAP-N/OFQ (-▽-) in animali sottoposti al medesimo co-trattamento 24 ore prima (-▼-). \* =  $p < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo  $5\mu\text{l}/\text{ratto}$  i.c.v., -○-).





**Fig. 23** – Effetti a carico della soglia nocicettiva (test del tail-flick) determinati dalla somministrazione di morfina (5µg/ratto i.c.v., -◆-) in animali pretrattati 24 ore prima con veicolo (5µl/ratto i.c.v.) o differenti dosi di MAP-N/OFQ (0.2 nmoli/ratto -■-, 1 nmole/ratto -▲-, 2 nmoli/ratto -▼-). \* =  $p < 0,05$  nei confronti dei controlli (veicolo, 5µl/ratto i.c.v., -○-).

### **4.3 Effetti della somministrazione intracerebroventricolare di nocicettina e di [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]nocicettina sull'azione antinocicettiva del paracetamolo.**

Come atteso il paracetamolo (400 mg/kg) ha aumentato significativamente i valori di %MPE al test hot-plate, al contrario la nocicettina di per se non ha modificato lo stesso valore a nessuna delle dosi somministrate.

La cosomministrazione di differenti dosi di nocicettina ha mostrato la capacità del peptide di inibire progressivamente l'analgesia prodotta dal farmaco paracetamolo, in particolare la prima dose utilizzata di nocicettina (1nmol) ha prodotto una diminuzione non significativa del valore di %MPE, mentre significativa è risultato l'effetto prodotto dalla dose di 5 nmol (Fig 24-A).

La dose più alta somministrata ha prodotto una completa e significativa abolizione dell'azione analgesica del paracetamolo.

E' stata quindi valutata la capacità dell'antagonista recettoriale della nocicettina, UFP-101, di modificare l'azione della stimolazione nocicettinergica sull'effetto analgesico del paracetamolo.

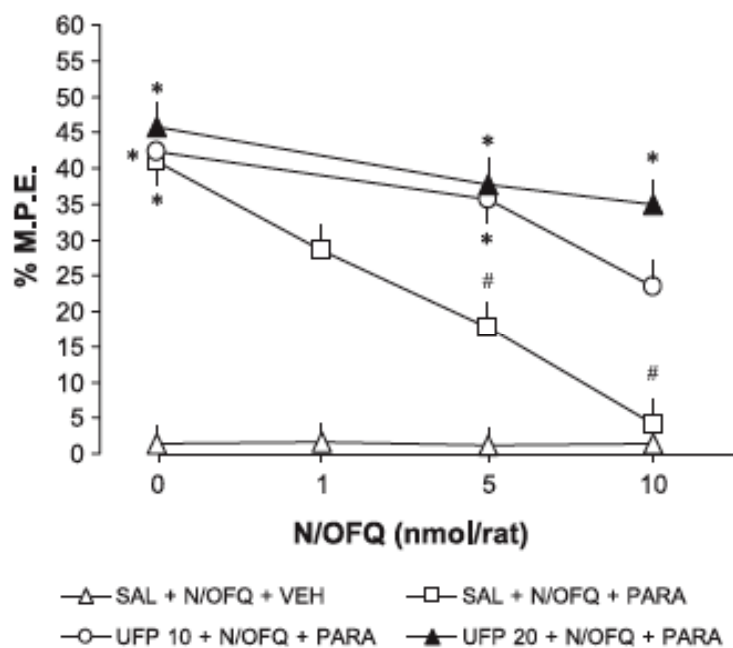
L' UFP-101 somministrato singolarmente, alle dosi di 10 e 20 nmol, non ha prodotto nessuna variazione dell' %MPE, mentre l'analgesia prodotta dal paracetamolo non ha subito alcuna variazione a seguito di pretrattamento con UFP-101.

Il pretrattamento con UFP-101 seguito da cosomministrazione di nocicettina e paracetamolo ha invece mostrato la capacità di antagonizzare l'effetto inibente della nocicettina sull'analgesia prodotta dal farmaco, risultando tale inibizione non significativa solo alla dose più bassa di UFP-101 (10 nmol) con il dosaggio maggiore di nocicettina (10 nmol).

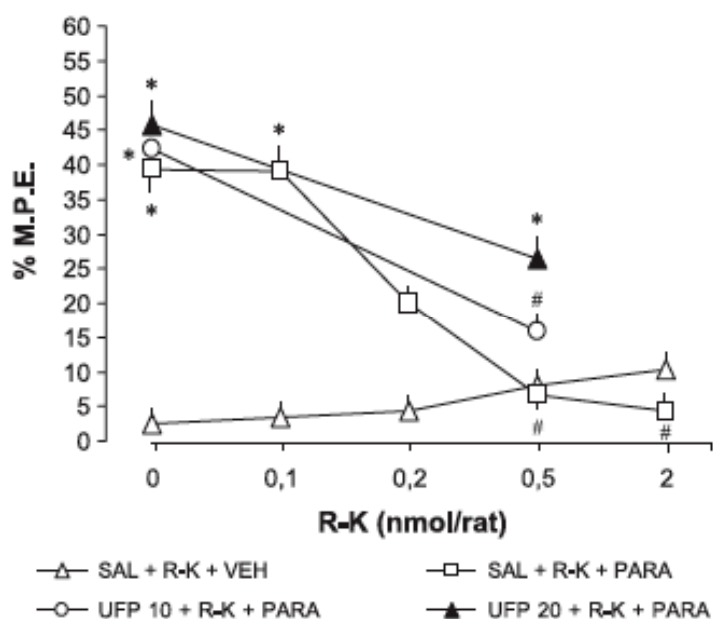
L'effetto prodotto dalla nocicettina è stato quindi confrontato con l'effetto prodotto nelle medesime condizioni sperimentali

dall'analogo del peptide , [Arg14,Lys15] nocicettina, somministrata alle dosi di 0,5 e 2 nmol (Fig 24-B). L'effetto di tale analogo è risultato essere sovrapponibile a quello della nocicettina, differendo unicamente nella potenza d'azione.

Riassumendo la nocicettina ha evidenziato la capacità di antagonizzare il potere antinocicettivo del paracetamolo fino a bloccarne completamente l'effetto al dosaggio più elevato, mostrando quindi proprietà antagonista dose-dipendente. Inoltre l'UFP, antagonista della nocicettina al recettore NOP, che di per se non altera l'analgia indotta da paracetamolo, è in grado di antagonizzare l'effetto della nocicettina sul paracetamolo in maniera dose-dipendente. Medesimo è risultato il comportamento dell'analogo della nocicettina, la Arg-Lys nocicettina.



A



B

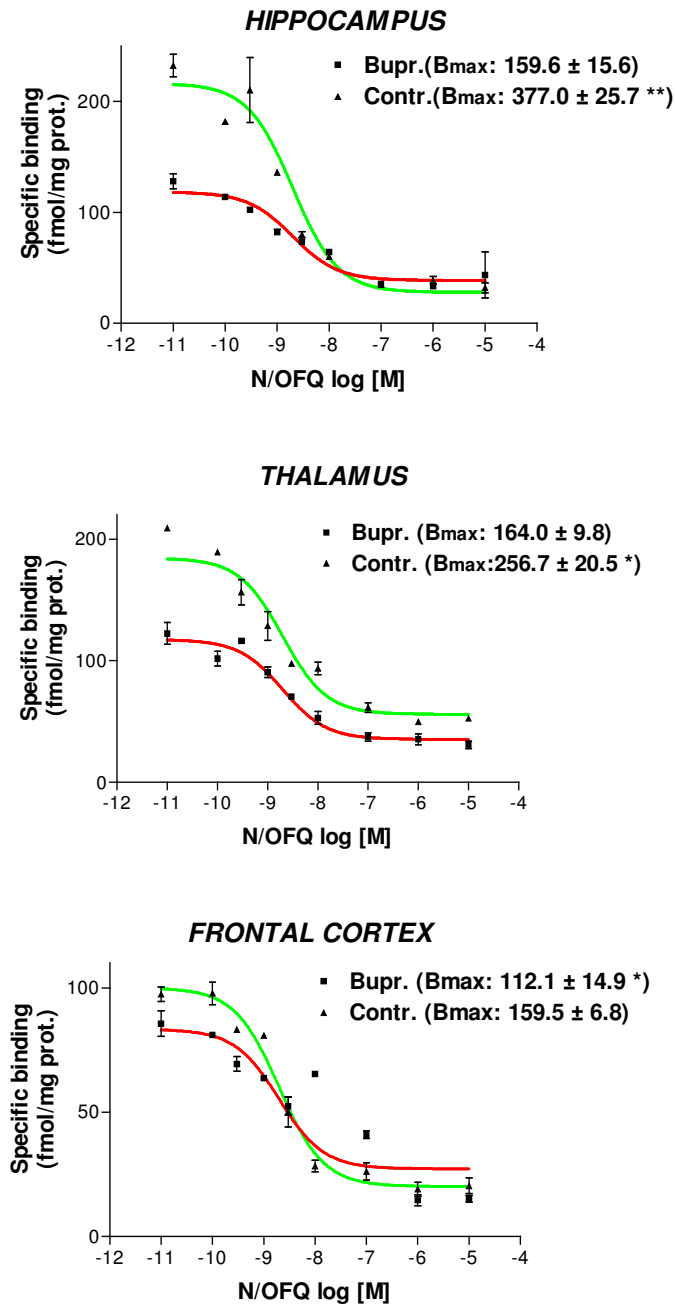
**Fig 24** *Effetto sull'analgesia da paracetamolo della somministrazione di nocicettina (N/OFQ) o [Arg14,Lys15] nocicettina (R-K) somministrate singolarmente o dopo pretrattamento con UFP-101*

#### **4.4. Effetti della somministrazione sottocutanea prolungata di buprenorfina, sulla densità recettoriale di NOP.**

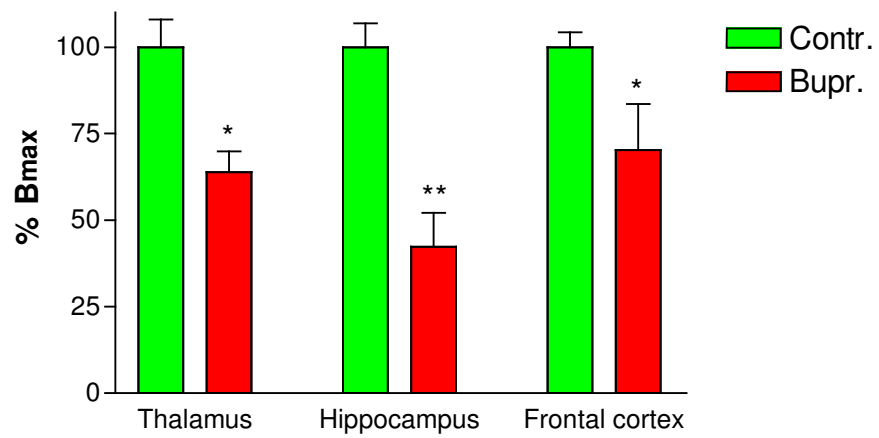
Sia nell'ippocampo che nel talamo e nella frontal cortex, la somministrazione prolungata di buprenorfina ha causato una variazione della densità recettoriale di NOP.

Come è possibile vedere in Fig 25, i seguenti valori di Bmax sono stati rilevati: Thalamus:  $164.0 \pm 9.8$  vs  $256.7 \pm 20.5$  fmol/mg di proteine nei ratti trattati e controlli. rispettivamente ( $p < 0.05$ ); hippocampus:  $159.6 \pm 15.6$  vs  $377.0 \pm 25.7$  ( $p < 0.01$ ); frontal cortex:  $112.1 \pm 14.9$  vs  $159.5 \pm 6.8$  ( $p < 0.05$ )

I valori percentuali di variazione di Bmax rispetto ai controlli (Fig 26) mostrano come la somministrazione prolungata di buprenorfina sottocutanea produca una diminuzione della densità recettoriale di NOP in tutte le aree esaminate, con un rimarchevole effetto nella sede ippocampale.



**Fig. 25** Curve di spiazzamento mostrano i valori di Bmax rilevati nello studio di binding nelle aree investigate. a) Hippocampus:  $159.6 \pm 15.6$  vs  $377.0 \pm 25.7$  fmol/mg di proteine nei ratti trattati e controlli rispettivamente ( $p < 0.05$ ); b) Thalamus:  $164.0 \pm 9.8$  vs  $256.7 \pm 20.5$ ; ( $p < 0.01$ ); c) Frontal Cortex:  $112.1 \pm 14.9$  vs  $159.5 \pm 6.8$  ( $p < 0.05$ )



**Fig. 26** *Variazione percentuale dei valori di Bmax per il NOP (Bmax per i rispettivi controlli = 100 %).*

## **4.5 Effetto di stimolazioni esterne sulla liberazione di nocicettina a livello spinale.**

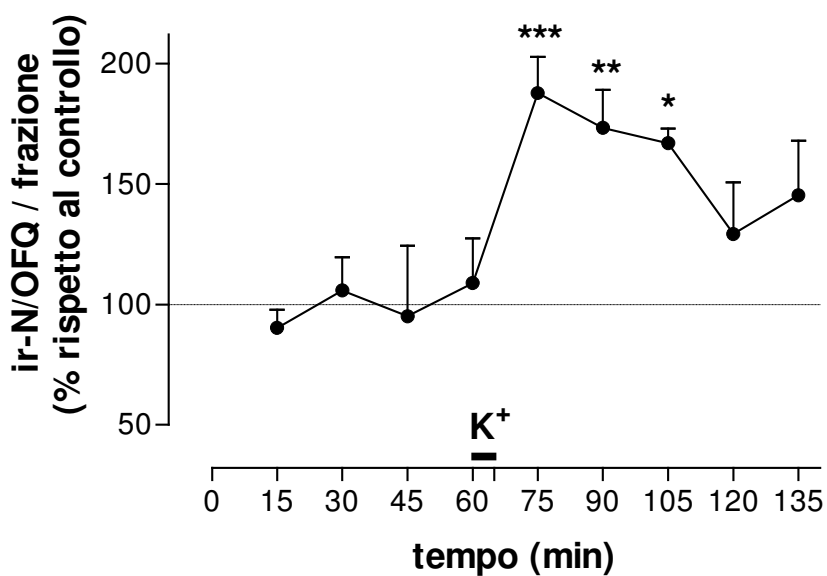
### ***4.5.1 Perfusionione con CSF ad elevata concentrazione di K<sup>+</sup>.***

La perfusione di CSF artificiale arricchito di ione potassio ad una concentrazione pari a 60 mM ha evidenziato la possibilità di stimolare la liberazione della nocicettina nel liquido cerebrospinale di ratto, suggerendo quindi una sua provenienza da elementi eccitabili.

Dagli esperimenti effettuati (vedi Fig. 27), si è osservato un incremento percentuale di nocicettina nel CSF già nella prima frazione di 15 minuti (i primi cinque dei quali effettuati con K<sup>+</sup> 60 mM). L'aumento è risultato pari al 187,77 % ± 15,05 %, rispetto alla media dei basali ottenuti dalle quattro frazioni raccolte prima dell'incremento di concentrazione dello ione potassio (P < 0,05).

E' comunque necessario dire che in circa la metà delle prove effettuate, la perfusione di un'elevata concentrazione di ione potassio ha causato il decesso dell'animale, assai verosimilmente a causa dell'incompatibilità di una depolarizzazione generalizzata del midollo spinale con la regolazione di funzioni vitali quali la respirazione e l'attività cardiaca.





**Fig. 27** – Effetto della perfusione con CSF artificiale contenente  $K^+$  60 mM, per 5 min, sulla liberazione di immunoreattività nocicettino-simile nel liquido cerebrospinale di ratto.

\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ ; \*\*\* =  $P < 0,001$ , rispetto alla media dei basali ottenuti dalle quattro frazioni raccolte prima dell'aumento della concentrazione di  $K^+$ .

#### ***4.5.2 Applicazione di stimoli nocicettivi***

Lo scopo di questo esperimento è stato quello di indagare se l'applicazione di differenti stimoli nocicettivi fosse in grado di modificare i livelli di N/OFQ presenti nel liquido cerebrospinale.

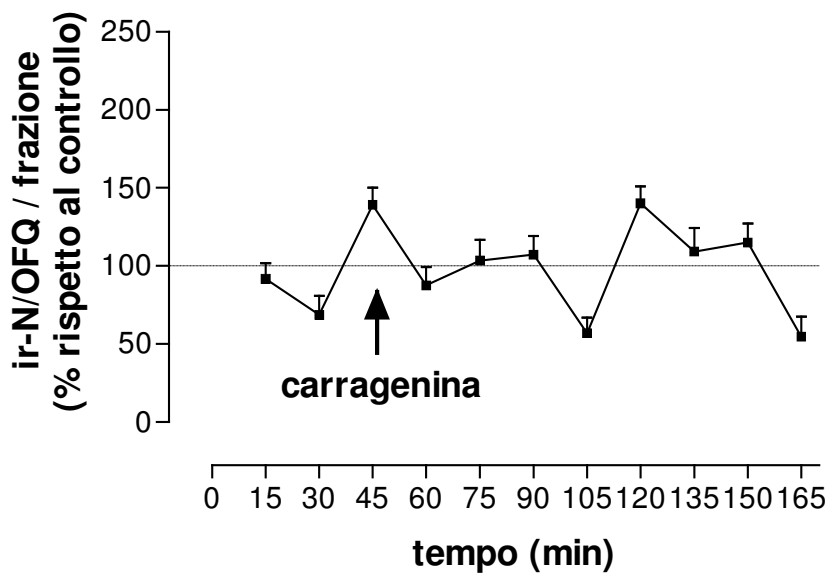
Per tale scopo sono state impiegate due sostanze comunemente utilizzate in test analgesimetrici, la carragenina e la formalina.

I risultati ottenuti, in termini di livelli di immunoreattività nocicettivo-simile presente nelle frazioni di perfusato, hanno fornito indicazioni differenti per le due situazioni sperimentali.

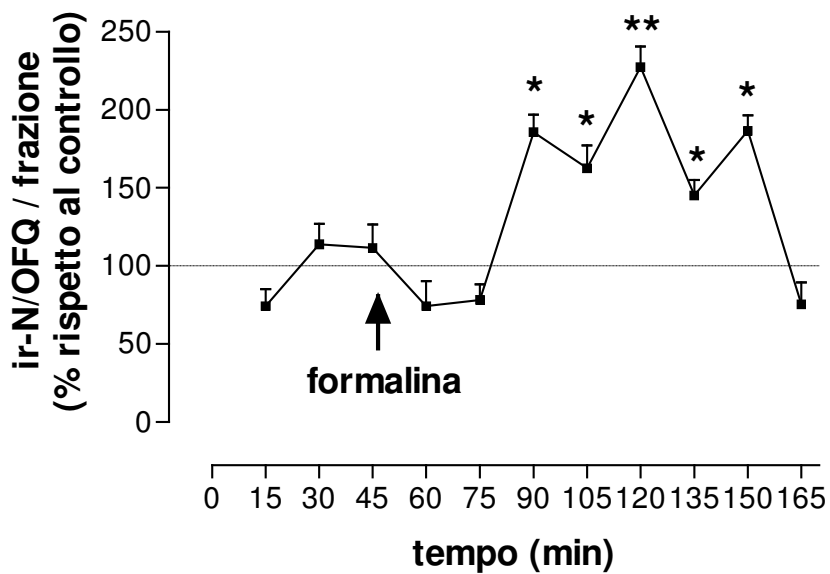
Infatti, la somministrazione sottocutanea di carragenina (100  $\mu$ l al 3 %) nella regione subplantare di entrambe le zampe posteriori del ratto non ha determinato alterazioni significative dei livelli di neuropeptide (Fig. 28) per tutte le otto frazioni successive all'applicazione dello stimolo.

Invece, la somministrazione di formalina (50  $\mu$ l al 5 %), dopo un iniziale periodo di 30 minuti (2 frazioni) in cui si è registrato un lieve abbassamento dei livelli, ha causato un incremento significativo della liberazione di N/OFQ a partire dal terzo intervallo di raccolta seguente la somministrazione della sostanza (Fig 29).

Nel complesso, come si può osservare dalla Fig. 29, tenendo conto della quantità di neuropeptide liberabile nell'intero periodo di osservazione (stimato sulla base dei livelli riscontrati prima dell'applicazione degli stimoli), la carragenina ha determinato solamente una lievissima diminuzione di circa 1,6 %, mentre la formalina ha causato un incremento pari al 42 % circa.



**Fig. 28** – *Effetto della somministrazione di 100  $\mu$ l di carragenina 3 % (vedi freccia) per via sottocutanea subplantare in entrambe le zampe posteriori.*



**Fig. 29** - Effetto della somministrazione di 50  $\mu$ l di formalina 5 % (vedi freccia) per via sottocutanea subplantare in entrambe le zampe posteriori.

\* =  $P < 0,05$ ; \*\* =  $P < 0,01$ , rispetto alla media dei basali ottenuti dalle tre frazioni raccolte prima della somministrazione di formalina..

## 5. CONCLUSIONI

---

Come già discusso nelle precedenti Sezioni, il neuropeptide nocicettina/orfanina FQ appare sicuramente coinvolto nella modulazione della trasmissione nocicettiva (85).

Tuttavia, il suo preciso ruolo nella funzione fisiologica appena ricordata non risulta ancora completamente chiarito a causa delle differenti azioni esercitate dalla somministrazione esogena del neuropeptide a differenti livelli del nevrasso.

Infatti, a livello cerebrale la N/OFQ sembra svolgere un ruolo iperalgesico (1, 2), che dapprima è stato ritenuto come un vero e proprio effetto pronocicettivo ed in seguito è stato riconsiderato e spiegato sulla base di un antagonismo funzionale esercitato dal sistema neuronale della nocicettina nei confronti del sistema oppioide endogeno (33). In questo senso, la nocicettina, piuttosto che abbassare la soglia algogena, contrasterebbe l'innalzamento di quest'ultima determinato dagli oppioidi endogeni mobilizzati da differenti situazioni o procedure sperimentali (come, ad esempio, condizioni di stress) con il risultato di mostrare un apparente abbassamento della soglia nocicettiva stessa.

Invece, la sua somministrazione a livello spinale provoca, secondo la maggioranza dei laboratori di ricerca, un effetto antinocicettivo espresso come innalzamento della soglia determinata mediante differenti procedure analgesimetriche (85). Anche in questo caso, tuttavia, non mancano risultati contrastanti; infatti, risultati in gran parte riconducibili a laboratori di ricerca giapponesi (86, 87, 88, 89) hanno anche riferito effetti iperalgesici conseguenti la somministrazione spinale del neuropeptide.

Com'è facile comprendere, questa situazione rende ancora difficile lo sviluppo di farmaci e strategie terapeutiche per il

controllo del dolore tramite la manipolazione farmacologica di questo sistema neuropeptidergico ed evidenzia palesemente la necessità di approfondire le indagini per ottenere ulteriori informazioni sul sistema stesso.

Sulla base di queste premesse, lo scopo degli studi svolti durante il periodo di dottorato è stato quello di indagare ad ampio spettro le proprietà del sistema peptidergico nocicettina/recettore NOP, al fine di aumentare le conoscenze sul ruolo biologico di questo sistema riconosciuto come possibile target farmacologico per farmaci di futuro sviluppo per il controllo del dolore e non solo.

Tale obiettivo è stato perseguito attraverso diverse esperienze sperimentali principalmente distinguibili in due approcci differenti: a) indagini mediante somministrazione esogena del neuropeptide nocicettina e suoi analoghi agonisti e/o antagonisti sulla trasmissione nocicettiva *in vivo*; b) indagini sull'effetto di manipolazioni farmacologiche sull'assetto del sistema endogeno nocicettina/NOP.

**La somministrazione esogena della nocicettina o derivati** si è avvalsa di metodologie di incannulazione permanente sia dello spazio intracerebroventricolare che subaracnoideo, il che ha permesso la somministrazione dei peptidi direttamente nella zona di interesse nonché di attuare esperienze ripetute nel tempo.

In primo luogo è stata indagata la capacità di un analogo del neuropeptide in oggetto, l'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ con proprietà agoniste e dell'analogo UFP-101 con proprietà antagoniste, di modificare la soglia nocicettiva al test del tail.flick, nei confronti della nocicettina stessa.

I risultati delle indagini farmacologiche condotte hanno evidenziato in primo luogo la capacità dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ di esercitare un potente effetto antinocicettivo a livello spinale

nonché l'assenza di azioni su questo parametro da parte dell'UFP-101.

D'altra parte, sempre a livello spinale, quest'ultimo composto si è rivelato pienamente in grado di bloccare le azioni svolte dal neuropeptide nocicettina e dal suo analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ a carico della trasmissione nocicettiva.

In particolare, il composto [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ si è rivelato dotato di elevata potenza antinocicettiva. Infatti, è risultato in grado di replicare gli effetti della nocicettina sulla soglia nocicettiva del ratto, a dosaggi circa 50 volte inferiori rispetto al neuropeptide endogeno.

Anche la potenza dell'UFP-101, come antagonista, si è rivelata di buon livello dal momento che il composto si è dimostrato in grado di bloccare l'effetto della nocicettina a dosi molarmente equiparabili rispetto al neuropeptide.

Un rapporto di dosi superiore è risultato necessario per bloccare l'effetto antinocicettivo dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ, probabilmente ad ulteriore conferma dell'assai elevata potenza dell'[Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ stessa nei confronti del recettore NOP.

Quindi, questi due ligandi si propongono quindi come validi strumenti farmacologici per realizzare un produttivo proseguimento dello studio sul sistema peptidergico in oggetto.

Recentemente, la letteratura scientifica ha messo in evidenza l'esistenza di nuovi ligandi alternativi, costituiti da dendrimeri, potenzialmente utili per l'indagine dei sistemi trasmettitoriali peptidergici. In particolare il dendrimero tetramerico della nocicettina (MAP-N/OFQ) mostra un'affinità di legame per il NOP non dissimile da quella del monomero e, parallelamente, un'assai elevata stabilità metabolica.

Il nostro laboratorio ha quindi sviluppato una serie di indagini volte a chiarire le azioni farmacologiche esercitate a carico della trasmissione nocicettiva dall'analogo dendrimerico della nocicettina appena citato, a differenti livelli del Sistema

Nervoso Centrale, in particolare la caratterizzazione ha richiesto lo studio sia a seguito di somministrazione intracerebroventricolare che intratecale, con delle differenze di approccio dovute alla natura del parent compound che appunto presenta le differenze d'azione nelle due sedi di cui ampiamente discusso nelle precedenti sezioni.

**I risultati ottenuti a seguito di somministrazione intratecale di MAP-N/OFQ** hanno indicato, in primo luogo, che essa determina un potente e prolungato incremento della soglia nocicettiva in seguito a somministrazione intratecale, nel ratto.

Questo risultato indica che la MAP-N/OFQ replica, a livello spinale, l'azione svolta dalla N/OFQ a carico della trasmissione nocicettiva. L'effetto della MAP-N/OFQ, in confronto con quello della N/OFQ, sembra caratterizzato da una più elevata potenza e una durata sicuramente superiore (85).

Per quanto riguarda la durata dell'effetto, la motivazione sembra da ricollegare all'elevata stabilità metabolica evidenziata (66) per il dendrimero tetramerico della N/OFQ mentre la maggiore potenza potrebbe essere collegata all'elevato "affollamento" di identiche unità "monomeriche" dotate di attività agonista, in prossimità del recettore.

Un fenomeno interessante tra i risultati ottenuti, è costituito dalla pressoché totale perdita di efficacia antinocicettiva, mostrata dalla MAP-N/OFQ già 24 ore dopo la prima somministrazione.

Benché sia stato descritto lo sviluppo del fenomeno di tolleranza all'effetto antinocicettivo spinale della N/OFQ (90) e quest'ultimo sembri manifestarsi con una rapidità anche superiore a quella dell'oppiaceo morfina, la rapidità del suo instaurarsi con la MAP-N/OFQ appare senz'altro particolare.

E' possibile ipotizzare che la maggior rapidità appena citata per la N/OFQ (rispetto alla morfina), connessa alla maggior



potenza della MAP-N/OFQ rispetto alla N/OFQ, possano contribuire a spiegare questo fenomeno (90).

Infatti, è possibile evidenziare (91) un assai rapido sviluppo di tolleranza acuta all'effetto antinocicettivo della morfina già dopo sei ore, allorquando si utilizzi una dose decisamente molto elevata dell'oppiaceo (100 mg/kg).

E' possibile che il principale meccanismo coinvolto nel fenomeno in discussione sia da ricercare nel recettore in sé, vale a dire nei fenomeni di internalizzazione conseguenti situazioni di eccessiva stimolazione che il dendrimero tetramerico della N/OFQ, in virtù della sua natura multimerica nonché della sua elevata stabilità, potrebbe esercitare in maniera drammatica.

Questa ipotesi concorderebbe con il permanere dell'efficacia antinocicettiva della morfina nei ratti che non rispondono più alla MAP-N/OFQ, osservazione peraltro perfettamente in accordo con la mancanza di tolleranza crociata tra N/OFQ e morfina a livello spinale (90).

Gli esperimenti compiuti per indagare la reversibilità dell'effetto antinocicettivo spinale della MAP-N/OFQ mediante somministrazione di un antagonista del NOP quale l'UFP-101, hanno fornito risultati di non facile interpretazione.

Infatti, l'UFP-101 ha solo parzialmente ridotto i valori della soglia nocicettiva già innalzata a valori pressoché massimali dalla precedente somministrazione MAP-N/OFQ e questo fatto potrebbe generare qualche dubbio sul ruolo del NOP negli effetti della MAP-N/OFQ.

Tuttavia, sono necessarie alcune considerazioni. Innanzitutto l'UFP-101 è attualmente solo uno dei migliori antagonisti disponibili per il recettore NOP, in un panorama che ancora attende lo sviluppo e la disponibilità di un antagonista (preferibilmente non peptidico) potente e di sicuro utilizzo come ad esempio è il naloxone per i recettori oppioidi classici.

Sarà quindi necessario proseguire le indagini con esperimenti che prevedano, tra l'altro, il pretrattamento con UFP-

101 seguito da MAP-N/OFFQ. Questo approccio sembra capace di fornire ulteriori e più chiare indicazioni anche in considerazione dei possibili rapidi fenomeni di internalizzazione del recettore NOP più sopra menzionati.

Quest'ultima considerazione sembra anche concordare con gli ultimi risultati esposti, secondo cui si osserva una maggior efficacia della MAP-N/OFFQ in ratti che avevano ricevuto, 24 ore prima, l'antagonista UFP-101 rispetto a quelli che avevano ricevuto l'agonista stesso.

**I risultati ottenuti in seguito a somministrazione intracerebroventricolare nel ratto hanno indicato che la MAP-N/OFFQ determina un incremento della soglia nocicettiva.**

Sulla base di quanto più ampiamente illustrato in Introduzione, questo dato potrebbe sembrare in contrasto con differenti dati di letteratura (1, 2) che riferiscono, per la N/OFFQ, un effetto "pro-nocicettivo a livello cerebrale.

Tuttavia, occorre ricordare che una recente rassegna (85) ha messo in evidenza l'ampia disparità di risultati ottenuti da differenti laboratori, per quanto riguarda l'effetto della N/OFFQ, in sede cerebrale, a carico della soglia nocicettiva.

In particolare, alcuni autori hanno osservato (91) che nel ratto non si osserva il decremento della soglia mostrato invece dal topo (92) ed inoltre, sempre nel ratto, la N/OFFQ causa un aumento dei valori della soglia nocicettiva che risulta naloxone-sensibile (91).

Quindi, i nostri dati ottenuti dopo somministrazione i.c.v. del dendrimero tetramericco della N/OFFQ sarebbero in accordo con la letteratura appena citata.

Inoltre, è necessario tenere presente che l'apparente effetto pronocicettivo della N/OFFQ è stato in seguito reinterpretato come un'azione anti-analgésica esercitata come antagonismo funzionale della stessa N/OFFQ nei confronti dell'analgésia da

stress sostenuta dalla liberazione di oppioidi endogeni che è sua volta determinata dalla procedura sperimentale di manipolazione degli animale e somministrazione di sostanze.

Dal momento che nelle nostre condizioni sperimentali (vedi Materiali e Metodi) gli animali sono stati ripetutamente (due ore) manipolati e testati prima della somministrazione delle sostanze, è possibile che non si siano determinate quelle condizioni di stress, con parallela liberazione di peptidi oppioidi endogeni, che rappresentano la condizione necessaria per l'evidenziazione dell'effetto "anti-oppioide" della N/OFQ, espresso come abbassamento della soglia nocicettiva.

La somministrazione i.c.v. di naloxone, in ratti pretrattati per la stessa via con MAP-N/OFQ, ha determinato un abbassamento dei valori soglia. Questo risultato è in accordo con dati di letteratura che descrivono la capacità del naloxone di ridurre l'effetto antinocicettivo espresso dalla N/OFQ intracerebroventricolare, nel ratto (91).

Occorre rilevare, tuttavia, che nelle nostre condizioni sperimentali le latenze registrate dopo naloxone sono rimaste a livelli statisticamente differenti dai controlli, suggerendo perciò un antagonismo solo parziale da parte del naloxone stesso.

Questo fatto può dipendere sia dalle dosi relativamente impiegate per le due sostanze, sia dallo specifico protocollo sperimentale che, nel nostro caso prevedeva la somministrazione di naloxone dopo il pieno instaurarsi dell'effetto della MAP-N/OFQ mentre, per i dati di letteratura citati, prevedeva una somministrazione contemporanea delle sostanze.

La MAP-N/OFQ ha mostrato di replicare in pieno la capacità, già ben nota e descritta per la N/OFQ (33, 47, 85), di svolgere un "antagonismo funzionale" nei confronti degli oppiacei. Infatti, sono risultate sufficienti 0,2 nmoli/ratto i.c.v. del derivato dendrimerico in studio per bloccare il manifestarsi dell'effetto antinocicettivo di 5 µg/ratto i.c.v. di morfina

Così come descritto dalla letteratura (93) per la N/OFQ, questa capacità della MAP-N/OFQ di bloccare l'effetto antinocicettivo della morfina sembra andare incontro allo sviluppo del fenomeno di tolleranza. Infatti, alla ripetizione del medesimo protocollo sperimentale a 24 ore di distanza, negli stessi ratti, la MAP-N/OFQ ha mostrato, rispetto al giorno precedente, un'efficacia minore nel contrastare l'effetto della morfina che, dopo un evidente ritardo iniziale, è risultata comunque in grado di elevare le soglie a valori significativamente superiori rispetto ai controlli, agli ultimi intervalli di rilevazione.

Infine, i risultati ottenuti hanno evidenziato una lunga durata dell'azione della MAP-N/OFQ *in vivo*. Infatti, la somministrazione i.c.v. di morfina in ratti pretrattati 24 ore prima per la medesima via con differenti dosi dell'analogo dendrimerico, ha prodotto un effetto antinocicettivo che è risultato di entità pressoché inversamente proporzionale alla dose di MAP-N/OFQ precedentemente somministrata.

Questo dato si concilia con osservazioni precedenti (94) che hanno descritto una prolungata ed inattesa (per un peptide) durata dell'effetto anti-oppioide della N/OFQ ed è, peraltro, ben in accordo con le caratteristiche di elevata stabilità metabolica descritte per la MAP-N/OFQ (66).

In conclusione, gli esperimenti riportati in questa tesi hanno indicato come il derivato dendrimerico della nocicettina, denominato MAP-N/OFQ, sia in grado di replicare, pur nella complessità degli effetti cerebrali descritti (69) per la nocicettina a carico della soglia nocicettiva, le azioni del neuropeptide stesso.

Questa osservazione, connessa con le ulteriori evidenze qui fornite di una elevata potenza della MAP-N/OFQ nonché di una lunga durata dei suoi effetti, suggeriscono la sua potenziale utilità quale strumento farmacologico per realizzare un adeguato approfondimento delle indagini sul sistema neuronale N/OFQ-NOP.

**E' stata quindi indagata la possibilità che la nocicettina e i suoi analoghi succitati siano capaci di antagonizzare in maniera dose dipendente l'effetto antinocicettivo del paracetamolo al test del hot-plate.**

Diversi studi in letteratura riportano la capacità della nocicettina, somministrata per via intracerebroventricolare, di prevenire l'analgesia prodotta dalla morfina, mostrando le capacità del peptide di modulare l'attività oppioide (33, 93, 95)

Risultano invece scarse le informazioni riguardo l'effetto della somministrazione della nocicettina sull'analgesia prodotta da analgesici di natura non oppioide come il paracetamolo.

Al fine di investigare tale aspetto è stato scelto il test del hot-plate per diverse motivazioni quali la capacità della nocicettina di alterare la soglia nocicettiva a stimoli di natura termica e elettrica, la rilevabilità dell'effetto analgesico del paracetamolo e il fatto che questo test produce due risposte comportamentali, misurabili come tempo di reazione, quali licking e jumping, considerate entrambe risposte integrate di origine soprasspinale (96).

Sia la nocicettina che il suo analogo [Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>15</sup>]N/OFQ, si sono dimostrati in questo studio capaci di antagonizzare l'effetto analgesico del paracetamolo, in particolare una prima interessante osservazione è che l'analogo della nocicettina ha mostrato efficacia a dosaggi 20 volte inferiori rispetto a quelli del composto di riferimento, e questo rispecchia come ordine di grandezza, i rapporti di potenza farmacologia che erano stati descritti nelle precedenti esperienze sperimentali discusse in questa tesi.

L'effetto iperalgesico della nocicettina somministrata per via intracerebroventricolare è motivato con le proprietà anti-oppioidi di questo sistema peptidergico, una possibile spiegazione dell'antagonismo funzionale esercitato dalla nocicettina sull'analgesia prodotta dal paracetamolo può essere invece ricercato nella loro opposta capacità di interagire con il

sistema serotonergico. Infatti la somministrazione di paracetamolo sembrerebbe produrre un aumentato flusso di [3H]-5-HT indotto da K<sup>+</sup>, sia a livello soprospinale che spinale (97). Altri studi recenti descrivono un ruolo modulatorio svolto dalla nocicettina nei confronti del release di [3H]-5-HT a livello sinaptosomiale nella corteccia frontale di ratto.

In ogni caso l'effetto della nocicettina e del suo analogo appare essere mediato dall'interazione con il suo recettore NOP, essendo l'UFP-101 in grado, anche se solo parzialmente di prevenire l'effetto dei peptidi sull'analgesia da paracetamolo. Difatti non mancano evidenze sulla capacità del'UFP-101 di antagonizzare l'effetto della nocicettina sul release di [3H]-5-HT. (98).

Concludendo questo studio estende le conoscenze sul ruolo della nocicettina nei fenomeni di modulazione dell'analgiesia, precedentemente collegate solo all'influenza del sistema peptidergico in oggetto con il sistema oppioide.

**Il trattamento cronico con buprenorfina sottocutanea ha prodotto una riduzione significativa della densità recettoriale di NOP sia nell'ippocampo che nel talamo e nella frontal cortex.**

Nell'introduzione è stato esposto come recenti acquisizioni mostrano la capacità della buprenorfina di agire da agonista al recettore NOP.

Tale agonismo porterebbe come conseguenza all'attivazione del sistema nocicettinergico con proprietà antioppioidi, di conseguenza è ipotizzabile che la stessa efficacia analgesica della buprenorfina ne risulti inficiata.

Questa ipotesi troverebbe conferma proprio nella particolare farmacodinamica del farmaco che oltre a possedere un dosaggio tetto, oltre il quale l'efficacia non sembra aumentare, mostra in alcune evidenze rilevate nel topo, un andamento della

curva dose-risposta a campana, ossia aumentando ulteriormente il dosaggio l'effetto diminuirebbe.

Queste evidenze sono state comunque raccolte in acuto, differentemente in un trattamento cronico con tale farmaco, l'indotta diminuzione della popolazione recettoriale per il recettore NOP può portare all'ipotesi che ne possa risultare silenziata l'attività antiopioide del sistema della nocicettina, limitando gli effetti negativi che la sua azione ha sulla efficacia antinocicettiva della buprenorfina.

**La metodica di per fusione dello spazio subaracnoideo sviluppata ha permesso rilevare e quantificare i livelli di neuropeptide nocicettina nel liquido cerebrospinale di ratto.**

I differenti livelli di peptide osservati nelle diverse condizioni sperimentali adottate meritano alcune considerazioni. Infatti, la protezione del neuropeptide dalla degradazione fisiologicamente operata da enzimi proteolitici ha permesso di ottenere livelli adeguatamente elevati da essere correttamente quantificati mediante procedura radioimmunologica, rendendo possibile la valutazione delle variazioni dei livelli di peptide inseguito a trattamenti di tipo farmacologico.

In questo senso, gli aumenti di concentrazione di peptide sperimentamente osservati, in queste condizioni di perfusione con concentrazioni depolarizzanti di ione potassio, suggeriscono che almeno parte del materiale liberato e rilevato deriva da una sorgente neuronale (quale struttura eccitabile).

Occorre ricordare che, alla concentrazione di  $K^+$  utilizzata (60 mM), si è verificato il decesso degli animali in circa la metà delle prove effettuate, molto probabilmente a causa dell'incompatibilità di una depolarizzazione generalizzata del midollo spinale con la regolazione di funzioni vitali quali la respirazione e l'attività cardiaca. In effetti, la concentrazione utilizzata è al limite superiore del range impiegato (40-60 mM)

per scopi simili *in vivo* (99) che prevedano l'interessamento di vaste aree nervose, mentre concentrazioni anche più elevate dello ione (100 mM) possono essere impiegate a scopo depolarizzante *in vitro* o quando la perfusione interessi zone molto limitate di tessuto nervoso.

I livelli di immunoreattività nocicettino-simile presenti nel liquido cerebrospinale di ratto si sono anche rivelati sensibili all'applicazione di stimoli nocicettivi.

Comunque, in questo caso, si sono evidenziate marcate differenze tra i due approcci sperimentali utilizzati.

Infatti, un marcato e significativo aumento dei livelli è stato causato dalla somministrazione di formalina ma non da quella di carragenina.

Diverse considerazioni possono spiegare questi risultati. Si può ritenere che questo differente comportamento suggerisca che la liberazione di nocicettina sia associata a stimoli francamente nocicettivi piuttosto che a meno intense stimolazioni periferiche associate a condizioni di infiammazione.

Infatti, nel test della formalina si verifica una risposta comportamentale evidente, caratterizzata da atteggiamenti di importanza e valore crescenti quali: la salvaguardia (sollevamento) della zampa iniettata, il suo scuotimento/leccamento, fino alla sua morsicatura.

Queste risposte sono invece praticamente assenti dopo carragenina e una condizione di iperalgesia può essere evidenziata solo mediante l'applicazione di stimoli nocicettivi come nel caso del paw-pressure test.

E' tuttavia da tenere anche presente che, mentre la risposta comportamentale di tipo nocicettivo evocata dalla somministrazione di formalina si esprime in un arco temporale compreso nell'intervallo sperimentale da noi utilizzato (circa 2 ore), il massimo dell'azione infiammatoria causata dalla carragenina si verifica dopo circa 4-6 ore dalla sua somministrazione.



Infine, è da notare che l'aumento di nocicettina non è immediato, ma si verifica dopo un certo intervallo dalla somministrazione di formalina.

Dal momento che è ben noto (100) che la formalina provoca due distinte fasi di risposta nocicettiva, vale a dire una immediata di tipo puramente nocicettivo ed una più tardiva da collegare ai fenomeni di sensibilizzazione spinale (provocati a loro volta dal verificarsi della prima fase), è interessante ipotizzare che l'osservata liberazione di nocicettina a livello spinale sia da associare più ai fenomeni di sensibilizzazione centrale (spinale) che non alla semplice stimolazione (situazione) nocicettiva.

## BIBLIOGRAFIA

---

- 1) MEUNIER J-C, MOLLEREAU C., TOLL L., SUAUDEAU C., MOISAND C., ALVINERIE P., BUTOUR J-L, GUILLEMOT J-C, FERRARA P., MONSARRAT B., MAZARGULL H., VASSART G., PARMENTIER M., COSTENTIN J., Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL-1 receptor, *Nature*, 377, 532-535, 1995.
- 2) REINSCHEID R.K., NOTHACKER H.P., BOURSON A., ARDATI A., HENNINGSEN R.A., BUNZOW J.R., GANDY .K., LANGEN H., MONSMA F.J.Jr., CIVELLI O., Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor, *Science*, 270, 792-794, 1995.
- 3) CHUANG T.T., LACOVELLI L., SALLESE M., DE BLASI A., G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and its implications, *TIPS*, 17, 416-421, 1996.
- 4) MOLLEREAU C., PARMENTIER M., MAILLEUX P., BUTOUR J-L., MOISAND C., CHALON P., CAPUT D., VASSART G., MEUNIER J-C., ORL-1, a novel member of the opioid receptor family Cloning, functional expression and localization, *FEBS Letters*, 341, 33-38, 1994.
- 5) CHEN Y., FAN Y., LIU J., MESTEK A., TIAN M., KOZAK C.A., YU L., Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family, *FEBS Letters*, 347, 279-283, 1994.

- 6) WANG J.B., JOHNSON P.S., IMAI Y., PERSICO A.M., OZENBERG B.A., EPPLER C.M., UHL G.R., cDNA cloning of an opiate receptor gene family member and its splice variant, *FEBS Letters.*, 348, 75-79, 1994.
- 7) COX B.M., CHAVKIN C., CHRISTIE M.J., CIVELLI O., EVANS C., HAMON M.D., HOELLT V., KIEFFER B., KITCHEN I., Mc KNIGHT A.T., MEUNIER J.C., PORTOGHESE P.S., Opioid receptors. In : Girdlestone D. (ed), *The IUPHAR compendium of receptors characterization and classification.* IUPHAR Media, London, 321-333. 2000.
- 8) FUKUDA K., KATO S., MORI K., NISHI M., TAKESHIMA H., IWABE N., MIYATA T., HOUTANI T., SUGIMOTO T., cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family, *FEBS Letters*, 343, 42-46, 1994.
- 9) BUNZOW J.R., SAEZ C., MORTRUD M., BOUVIER C., WILLIAMS J.T., LOW M., GRANDY D.K., Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a  $\mu$ ,  $\delta$  or  $\kappa$  opioid receptor type, *FEBS Letters*, 347, 284-288, 1994.
- 10) WICK M.J., MINNERATH S.R., LIN X., ELDE R., LAW P.J., LOH H.H., Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptors, *Mol. Brain Res.*, 27, 37-44, 1994.
- 11) LACHOWICZ J.E., SHEN Y., MONSMA Jr., SIBLEY D.R., Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family, *J. of Neurochem.*, 64, 34-40, 1995.

- 12) NOTHACKER H.P., REINSCHEID R.K., MANSOUR A., HENNINGSEN R.A., ARDATI A., MONSMA F .J .Jr., WATSON S.J., CIVELLI O., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 8677-8682, 1996.
- 13) DOOLEY C.T., HOUGHTEN R.A., Orphanin FQ: receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain, Life Sci., 59, 23-29, 1996.
- 14) DUNNILL R.J., KAKIZAWA K., MCKNIGHT A.T., HENDERSON G., Characterization of the actions of naloxone benzoylhydrazone at  $\mu$ -opioid,  $\kappa$ -opioid and ORL-1 receptors in isolated tissues from rat and guinea-pig, Br. J. Pharmal., 119, 275 P, 1996.
- 15) CALO' G., RIZZI A., BOGONI G., NEUGEBAUER V., SALVADORI S., GUERRINI R., BIANCHI C., REGOLI D., The mouse vas deferens: a pharmacological preparation sensitive to nociceptin, Eur. J. Pharmacol., 311, R3-R5, 1996.
- 16) BUTOUR J.L., MOISAND C., MAZARGUIL H., MEUNIER J.C., Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL-1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids, Eur. J. pharmacol., 321, 97-103, 1997.
- 17) CHAWKIN C., GOLDSTEIN A, Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure-activity relationships, Proc.-Natl.-Acad.-Sci.-U-S-A, 78, 6543-7, 1981.
- 18) WATSON S.J., MANSOUR A., MENG F., DEVINE D., CIVELLI O., AKIL H., Orphanin FQ peptide and receptor: structure-function, anatomical and behavioral analysis, 27th Meeting of the INRC, S3-S4, 1996.

- 19) SCHULZ S., SCHREFF M., NUSS D., GRAMSCH C., HOLLT V., Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but not co-localization in pain-modulatory brain regions, *Neuroreport*, 7, 3021-3025, 1996.
- 20) RIEDL M., SHUSTER S., VULCHANOVA L., WANG J., LOH H.H., ELDE R., Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord, *Neuroreport*, 7, 1369-1372, 1996.
- 21) MATTHES H., SEWARD E.P., KIEFFER B., NORTH R.A., Functional selectivity of orphanin FQ for its receptor coexpressed with potassium channel subunits in *Xenopus laevis* oocytes, *Mol. Pharmacol.*, 50, 447-450, 1996.
- 22) CONNOR M., YEO A., HENDERSON G., The effect of nociceptin on  $Ca^{2+}$  channel current and intracellular  $Ca^{2+}$  in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 205-207, 1996.
- 23) VAUGHAN C.W., CHRISTIE M.J., Increase by the ORL-1 receptor (opioid receptor-like 1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 117, 1609-1611, 1996.
- 24) VAUGHAN C.W., INGRAM S.L., CHRISTIE M.J., Actions of the ORL-1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro, *J. Neurosci.*, 17, 996-1003, 1997.
- 25) CONNOR M., YEO A., HENDERSON G., The effect of nociceptin on  $Ca^{2+}$  channel current and intracellular  $Ca^{2+}$  in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 205-207, 1996.

- 26) KNOFLACH F., REINSCHIED R.K., CIVELLI O., KEMP J.A., Modulation of voltage-gated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons, *J. Neurosci.*, 16, 6657-6664, 1996.
- 27) NICOL B., LAMBERT D.G., ROWBOTHAM D.J., SMART D., MCKNIGHT A.T., Nociceptin induced inhibition of K<sup>+</sup> evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices, *Br. J. Pharmacol.*, 119, 1081-1083, 1996.
- 28) NEAL M. J., CUNNINGHAM J. R., PATERSON S. J., MCKNIGHT, Inhibition by nociceptin of the light-evoked, release of Ach from retinal cholinergic neurones, *Br. J. Pharmacol.*, 120, 1399-1400, 1997.
- 29) NICHOLSON J. R., PATERSON S.J., MCKNIGHT A.T., Characterisation of the response in the rat vas deferens to the ORL-1 agonist nociceptin, *Br. J. Pharmacol.*, 119, 36 P, 1996.
- 30) BERZETEI-GURSKIE IP., SCWARTZ. TOLL L., Determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens, *Eur. J. Pharmacol.*, 302, R1-R2, 1996.
- 31) MEUNIER J. C., Nociceptin/orphanin and the opioid receptor-like ORL1 receptor, *European Journal of Pharmacol.*, 340, 1-15, 1997.
- 32) PATEL H. J., GIEMBYCZ M. A., SPICUZZA L., BARNES P. J., BELVISI M. G., Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid, nociceptin, *Br. J. Pharmacol.*, 120, 765-736, 1997.

- 33) MOGIL J.S., GRISEL J.E., REINSCHEID R.K., CIVELLI O., BELKNAP J.K., GRANDY D.K., Orphanin FQ is a functional anti- opioid peptide, *Neuroscience*, 75, 333-337, 1996.
- 34) ROSSI G.C., LEVENTHAL L., PASTERNAK G.W., Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice, *Eur. J. Pharmacol.*, 311, R7-R8, 1996.
- 35) TIAN J.H., XU W., FANG Y., MOGIL J.S., GRISEL J.E., GRANDY D.K., HAN J.S., Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia: antagonism in brain and potentiation in spinal cord of the rat, *Br. J. Pharmacol.*, 120, 676-680, 1997.
- 36) FABER E.S., CHAMBERS J.P., EVANS R.H., HENDERSON G., Depression of glutamatergic transmission by nociceptin in the neonatal rat hemisectioned spinal cord preparation in vitro, *Br. J. Pharmacol.*, 119, 189-190, 1996.
- 37) STANFA L.C., CHAPMAN V., KERR N., DICKENSON A.H., Inhibitory action of nociceptin on spinal dorsal horn neurones of the rat, in vivo, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 1875-1877, 1996.
- 38) CANDELETTI S., GUERRINI R., CALÒ G., ROMUALDI P., FERRI S., Supraspinal and spinal effects of [Phe<sup>1</sup>ψ(CH<sub>2</sub>-NH)GLY<sub>2</sub>]-nociceptin(1-13)-NH<sub>2</sub> on nociception in the rat, *Life Sci.*, 66, 257-264, 1999.
- 39) GIULIANI S., MAGGI C.A., Inhibition of tachykinin release from peripheral endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 1567-1569, 1996.

- 40) FLORIN S., SUAUDEAU C., MEUNIER J-CI., COSTENTIN J., Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice, *Eur J Pharmacol*, 317, 9 -13, 1996.
- 41) DEVINE D.P., REINSCHEID R.K., MONSMA F.J.Jr., CIVELLI, O., AKIL, H., The novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion, *Brain Res.*, 727, 225-229, 1996.
- 42) MURPHY N.P., LY H.Y., MAIDMENT N.T., Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats, *Neuroscience*, 75, 1-4, 1996.
- 43) KOOB G.F., Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of rewards pathways, *TIPS*, 13, 177-184, 1992.
- 44) DEVINE D.P., TAYLOR L., REINSCHEID R.K., MONSMA F.J., CIVELLI O., AKIL H., Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ, *Neurochem Res*, 21, 1387-1396, 1996.
- 45) MURPHY N.P., LEE Y., MAIDMENT N.T., Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference, *Brain Res*, 832, 168-170, 1999.
- 46) YUAN L., HAN Z., CHANG J.K., HANS J.S., Accelerated release and production of orphanine FQ in brain of chronic morphine tolerant rats, *Brain Res*, 826, 330-334, 1999.



- 47) KING M., CHANG A., PASTERNAK G.W., Functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin, *Biochem Pharmacol*, 55, 1537-1540, 1998.
- 48) NARAYANAN S., MAIDMENT N.T., Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine, *Pharmacol Biochem Behav*, 63, 271-277, 1999.
- 49) CABEZA DE VACA S., CARR K.D., Food restriction enhances the central rewarding effect of abused drugs, *J Neurosci*, 18, 7502-7510, 1998.
- 50) STRATFORD T.R., HOLAHAN M.R., KELLY A.E., Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake, *NeuroReport*, 8, 423-426, 1997.
- 51) LEVENTHAL L., MATHIS J.P., ROSSI G.C., PASTERNAK G.W., BODNAR R.J., Orphanin opioid receptor antisense probes block orphanin FQ-induced hyperphagia, *Eur J Pharmacol*, 349, R1-R3, 1998.
- 52) POMONIS J.D., BILLINGTON C.J., LEVINE A.S., Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL<sub>1</sub>, stimulates feeding in rats, *NeuroReport*, 8, 369-371, 1996
- 53) POLIDORI C., DE CARLO G., MASSI M., The hyperphagic effect of nociceptin/orphanin FQ in rats, *Peptides* 21, 1051-1062, 2000.
- 54) NICHOLSON J.R., AKIL H., WATSON S.J. Jr., Orphanin FQ-induced hyperphagia is mediated by corticosterone and central glucocorticoid receptors, *Neuroscience* 115, 2, 637-643, 2002.

- 55) HENDERSON G., McKNIGHT A.T., The orphan opioid receptor and its endogenous ligand-nociceptin/orphanin FQ, Trends Pharmacol. Sci., 18, 293-300, 1997.
- 56) MEUNIER J.C., Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL-1 receptor, Eur. J. Pharmacol., 340, 1-15, 1997.
- 57) SALVADORI S., GUERRINI R., CALO' G., REGOLI D., Structure activity studies on nociceptin/orphanin FQ: from full agonist, to partial agonist, to pure antagonist, Il Farmaco; 54, 810-825, 1999
- 58) GUERRINI R., CALO' G., RIZZI A., BIGONI R., BIANCHI C., SALVADORI S., REGOLI D., A new selective antagonist of the nociceptin receptor, Br. J. Pharmacol., 123, 163-165. 1998.
- 59) BUTOUR J.L., MOISAND C., MOLLEREAU C., MEUNIER J-C. [Phe<sup>1</sup>Ψ (CH<sub>2</sub>-NH) Gly<sup>2</sup>] nociceptin-(1-13)-NH<sub>2</sub> is an agonist of the nociceptin(ORL-1) receptor. Eur. J. Pharmacol., 15; 349: R5-6.
- 60) SCHLICKER E, WERTHEEIN S, KATMANN M, BAUER U. Nociceptin inhibits noradrenaline release in the mouse brain cortex via presynaptic ORL-1 receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol., 388, 418-422 1998.
- 61) CARPENTER K.J., DICKENSON A.H., Evidence that [Phe<sup>1</sup> Ψ(CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>] nociceptin-(1-13)-NH<sub>2</sub>, a peripheral ORL-1 receptor antagonist, acts as an agonist in the rat spinal cord. Br. J. Pharmacol. 125, 949-951, 1998

- 62) XU IS, WIESENFELD-HALLIN Z, XU XJ. [Phe<sup>1</sup>psi(CH<sub>2</sub>-NH)Gly<sup>2</sup>]-nociceptin-(1-13)NH<sub>2</sub>, a proposed antagonist of the nociceptin receptor, is a potent and stable agonist in the rat spinal cord., *Neurosci. Lett.*, 249, 127-130, 1998.
- 63) CALO' G., GUERRINI R., BIGONI R., RIZZI A., MARZOLA G., OKAWA H., BIANCHI C., LAMBERT D.G., SALVADORI S., REGOLI D., Characterization of [Nphe<sup>1</sup>]nociceptin(1-13)NH<sub>2</sub>, a new selective nociceptin receptor antagonist, *Br. J. Pharmacol.*, 129, 1183-1193, 2000.
- 64) RIZZI D., RIZZI A., BIGONI R., CAMARDA V., MARZOLA G., GUERRINI R., DE RISI C., REGOLI D., CALO' G., [Arg<sup>14</sup>-Lys<sup>15</sup>]Nociceptin, a Highly Potent Agonist of the Nociceptin/Orphanin FQ Receptor: in Vitro and in Vivo Studies , *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300, 57-63, 2002
- 65) McDONALD J., CALO' G., GUERRINI R., LAMBERT D.G., UFP-101, a high affinity antagonist for the nociceptin/orphanin FQ receptor: radioligand and GTPγ<sup>35</sup>S binding studies, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 367, 183-187, 2003.
- 66) BRACCI L., FALCIANI C., LELLI B., LOZZI L., RUNCY Y., PINI A., DE MONTIS M.G., TAGLIAMONTE A., NERI P., Syntetic peptides in the Peptides Form of Dendrimers become Resistant to Protease Activity, *J. Biol. Chem.*, 278, 46590-46595, 2003
- 67) SADLER K., TAM J.P., Peptide dendrimers: applications and synthesis, *Molecular Biotechnology*, 90, 195-229, 2002.

- 68) CLONINGER M.J, Biological applications of dendrimers, *Current Opinion in Chemical Biology*, 6, 742-748, 2002.
- 69) CHIOU LC, LIAO YY, FAN PC, KUO PH, WANG CH, RIEMER C, PRINSSEN EP. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets*.8(1):117-35. 2007
- 70) MOGIL J.S., GRISEL J.E., REINSCHEID R.K., CIVELLI O., BELKNAP J.K., GRANDY D.K., Orphanin FQ is a functional anti- opioid peptide, *Neuroscience*, 75, 333-337, 1996.
- 71) TIAN, J. H., ZHANG, W., FANG, Y., XU, GRANDY D.K. & HAN, J.S., Endogenous orphanin FQ:evidence for a role in the modulation of the electroacupuncture analgesia and the development of tolerance to analgesia produced by morphine and elecrtocupuncture, *Br. J. Pharmacol.*, 124, 21-26, 1998
- 72) UEDA, H., YAMAGUCHI, T., TOKUYAMA, S., INOUE, M., NISHI, M. & TAKESHIMA, Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene, *Neurosci. Lett.* 237, 136-138, 1997
- 73) COWAN A. HUANG P., KEHEN G.B., 31-47. New York ,1995
- 74) COWAN A. HUANG P, KEHNER GB, COWAN A, LIU-CHEN LY.. Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 688-695, 2001
- 75) LUTFY K., EITAN S., BRYANT C.D., YANG C.Y. et al. (2003) *J. Neurosci.* 23: 10331-10337

76) RIZZI D., RIZZI A., BIGONI R., CAMARDA V., MARZOLA G., GUERRINI R., DE RISI C., REGOLI D., CALO' G., [Arg14-Lys15]Nociceptin, a Highly Potent Agonist of the Nociceptin/Orphanin FQ Receptor: in Vitro and in Vivo Studies , The Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics, 300, 57-63, 2002.

77) Mc DONALD J., CALO' J., GUERRINI R., LAMBERT D.G., UFP-101, a high affinity antagonist for the nociceptin/orphanin FQ receptor: radioligand and GTPγ35S binding studies , Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 367, 183-187, 2003.

78) LOPACHIN R. M., RUDY T. A., YAKSH T. L., An improved method for chronic catheterisation of the spinal subarachnoid space, *Physiol. Behav.*, 27, 559-561, 1981.

79) VLASKOVSKA M., KASAKOV L., SUDER P., SILBERRING J., TERENIUS L., Biotransformation of nociceptin/orphanin FQ by enzyme activity from morphine-naive and morphine-treated cell cultures. *Brain Res.* 13;818(2):212-20. 1999.

80) GLOWINSKI J., IVERSEN L.L., Regional studies of catecholamines in the rat brain, *Neurochem.*, 13, 655-56, 1966.

81) PLOJ K., ROMAN E., NYLANDER I., Effects of maternal separation on brain nociceptin/orphanin FQ peptide levels in male Wistar rats, *Pharm. Biochem. Behav.*, 73, 123-129, 2002.

82) SAKURADA C., SAKURADA S., ORITO T., TAN-NO K., SAKURADA T., Degradation of nociceptin (orphanin FQ) by mouse spinal cord synaptic membranes is triggered by

endopeptidase-24.11: an in vitro and in vivo study, *Biochemical Pharmacology*, 64, 1293-1303, 2002.

83) SUDER P., KOTLINSKA J., SMOLUCH M.T., SALLBERG M., SILBERRING J., Metabolic fate of nociceptin/orphanin FQ in the rat spinal cord and biological activity of its released fragment, *Peptides*, 20, 239-247, 1999.

84) TALLARIDA, R.J., MURRAY, R.B., *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, Springer-Verlag Ed., New York, 1981.

85) MOGIL J.S., PASTERNAK G.W., *The Molecular and Behavioral Pharmacology of the Orphanin FQ/Nociceptin Peptide and Receptor Family*, *Pharmacol. Rev.*, 53, 381-415, 2001.

86) INOUE M., MATSUNAGA S., RASHID MH, YOSHIDA A., MIZUNO K., SAKURADA T., TAKESHIMA H., UEDA H., Pronociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ, *J Pharmacol Exp Ther.* 299, 213-219, 2001.

87) INOUE M., SHIMOHIRA I., YOSHIDA A., ZIMMER A., TAKESHIMA H., SAKURADA T., UEDA H., Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord, *J Pharmacol Exp Ther.* 291, 308-313, 1999.

88) SAKURADA T., KATSUYAMA S., SAKURADA S., INOUE M., TAN-NO K., KISARA K., SAKURADA C., UEDA H., SASAKI J., Nociceptin-induced scratching, biting and licking in mice: involvement of spinal NK1 receptors, *Br J Pharmacol*, 127, 1712-1718, 1999.

- 89) INOUE M., KOBAYASHI M., KOZAKI S., ZIMMER A., UEDA H., Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10949-10953, 1998.
- 90) HAO J-X., WIESENFELD-HALLIN Z., XU X-J., Lack of cross-tolerance between the antinociceptive effect of intrathecal orphanin FQ and morphine in the rat, *Neurosci. Lett.*, 223, 49-52, 1997.
- 91) LU G., SU R-B., LI J., QIN B-Y., Modulation by  $\alpha$ -difluoromethyl-ornithine and aminoguanidine of pain threshold, morphine analgesia and tolerance, *Eur. J. Pharmacol.*, 478, 139-144, 2003.
- 91) ROSSI G.C., PERLMUTTER M., LEVENTHAL L., TALATTI A., PASTERNAK G. W., Orphanin FQ/nociceptin analgesia in the rat, *Brain Research*, 792, 327-330, 1998.
- 92) ROSSI G.C., LEVENTHAL L., BOLAN E., PASTERNAK G.W., Pharmacological Characterization of Orphanin FQ/Nociceptin and its Fragments, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282, 858-865, 1997.
- 93) LUFTY K., SHARZA S.A., MAIDMENT N.T., Tolerance develops to the inhibitory effect of orphanin FQ on morphine-induced antinociception in the rat, *Neuroreport*, 10, 103-106, 1999.
- 94) CANDELETTI S., FERRI S., Effects of an antisense oligonucleotide to pronociceptin and long-term prevention of morphine action by nociceptin, *Peptides*, 21, 1119-1124, 2000.

- 95) HARRISON L.M., GRANDY D.K. Opiate modulating properties of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides*. 21(1):151-72, 2000
- 96) LE BARS D., GOZARIU M., CADDEN S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*. 53(4):597-652, 2001.
- 97) COURADE J.P., CHASSAING C., BARDIN L., ALLOUI A., ESCHALIER A. 5-HT receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of acetaminophen in rats. *Eur J Pharmacol*.30;432(1):1-7. 2001
- 98) CALO G, RIZZI A, RIZZI D, BIGONI R, GUERRINI R, MARZOLA G, MARTI M, MCDONALD J, MORARI M, LAMBERT DG, SALVADORI S, REGOLI D. [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH<sub>2</sub>, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol*.;136(2):303-11. 2002.
- 99) CESSÉLIN F., LE BARS D., BOURGOIN S., ARTAUD F., GOZLAN H., CLOT A. M., BESSON J. M., HAMON M., Spontaneous and evoked release of methionine-enkephalin-like material from the rat spinal cord in vivo, *Brain Research*, 339, 305-313, 1985.
- 100) ABBOTT FV, FRANKLIN KB, WESTBROOK RF, The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats, *Pain*, 60, 91-102, 1995.