

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza BIO 14

TITOLO TESI

Coinvolgimento del recettore NOP nei meccanismi
molecolari attivati da esposizione cronica a
cannabinoidi, oppiacei ed alcol

Presentata da: dott.ssa ROSALIA CANNARSA

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof.

GIORGIO CANTELLI FORTI

Relatore

Chiar.ma Prof.ssa

PATRIZIAROMUALDI

Esame finale anno 2008

INDICE

| | |
|--|-----------|
| RIASSUNTO | 1 |
| 1. INTRODUZIONE | 4 |
| <i>1.1 Il sistema nocicettina/NOP</i> | 5 |
| 1.1.1 Il recettore NOP | 5 |
| 1.1.2 Il neuropeptide nocicettina | 6 |
| 1.1.3 Effetti farmacologici della nocicettina | 10 |
| 1.1.4 Interazione del sistema nocicettina/NOP con altri sistemi neuronali | 15 |
| 1.1.5 Sistema nocicettina/NOP e analgesia | 17 |
| 1.1.6 Recettore NOP e sistema mesocorticolimbico | 26 |
| <i>1.2 Sistema nocicettina/NOP e Δ^9-tetraidrocannabinolo</i> | 28 |
| 1.2.1 Il sistema cannabinoide | 28 |
| 1.2.2 I recettori per i cannabinoidi | 30 |
| 1.2.3 Ligandi per i recettori cannabinoidi | 33 |
| 1.2.4 Effetti farmacologici dei cannabinoidi | 39 |
| 1.2.5 Correlazione fra sistema cannabinoide e sistema oppioide | 45 |
| <i>1.3 Sistema nocicettina/NOP e oppiacei</i> | 48 |
| 1.3.1 Sistema oppioide | 48 |
| 1.3.2 Analgesici oppiacei: morfina e fentanil | 50 |
| 1.3.3 Tolleranza agli oppiacei | 57 |
| 1.3.4 Correlazione tra sistema nocicettina/NOP e sistema oppioide | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4 Sistema nocicettina/NOP e alcol | 63 |
| 1.4.1 Alcol | 63 |
| 1.4.2 Proprietà farmacologiche dell'alcol | 63 |
| 1.4.3 Basi neurologiche del consumo di alcol | 65 |
| 1.4.4 Correlazione tra sistema nocicettina/NOP e alcol | 73 |
| | |
| 2. SCOPO DELLA RICERCA | 75 |
| | |
| 3. MATERIALI E METODI | 81 |
| 3.1 Linea cellulare SH-SY5Y | 81 |
| 3.2 Animali | 82 |
| 3.3 Trattamenti | 82 |
| 3.4 Prelievo dei tessuti | 83 |
| 3.5 Estrazione di RNA totale | 84 |
| 3.6 Quantificazione di RNA messaggero mediante RT-PCR | 85 |
| 3.7 Quantificazione di RNA messaggero mediante real time PCR | 85 |
| 3.8 Binding recettoriale | 86 |
| 3.7 Analisi statistica | 87 |
| | |
| 4. RISULTATI | 88 |
| 4.1 Effetti del Δ^9 -THC sulla espressione genica di NOP nelle cellule SH-SY5Y | 88 |
| 4.2 Effetti del Δ^9 -THC sulla densità recettoriale di NOP nelle cellule SH-SY5Y | 90 |
| 4.3 Effetti della morfina sull'espressione genica di NOP e MOP nelle cellule SH-SY5Y | 93 |
| 4.4 Effetti del fentanyl sull'espressione genica di NOP e MOP nelle cellule SH-SY5Y | 95 |
| 4.5 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nell'amigdala di ratto | 97 |
| 4.6 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nella corteccia prefrontale di ratto | 99 |
| 4.7 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nel BNST di ratto | 101 |

| | |
|--|------------|
| 4.8 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nell'ipotalamo di ratto | 103 |
| 4.9 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nel lateral septum di ratto | 105 |
| 5. DISCUSSIONE | 107 |
| 6. BIBLIOGRAFIA | 117 |

RIASSUNTO

Il sistema neuronale nocicettina/recettore NOP è coinvolto in numerose funzioni biologiche, come la trasmissione degli impulsi nocicettivi, alcuni processi cognitivi, la memoria, la funzione motoria e la gratificazione da farmaci d'abuso. A questo proposito è stato indagato il possibile coinvolgimento del sistema nocicettina/NOP negli effetti indotti da diverse sostanze d'abuso, siano esse usate a scopo terapeutico o voluttuario. La caratterizzazione farmacologica del sistema neuronale nocicettina/recettore NOP ha permesso di avanzare l'ipotesi che il neuropeptide nocicettina possa svolgere una sorta di antagonismo funzionale nei confronti del sistema oppioide endogeno nonostante le marcate analogie strutturali.

Il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) è una sostanza psicotropa, attiva i recettori cannabinoidi CB1 nel sistema nervoso centrale e produce effetti simili a quelli degli oppioidi. In particolare i cannabinoidi sono in grado di potenziare le proprietà antinocicettive degli oppioidi e sulla base della duplice interazione del sistema oppioide sia con il sistema cannabinoide che con il sistema nocicettina/NOP è stato indagato un possibile cross-talk tra il sistema nocicettina/NOP e il sistema cannabinoide. Gli studi sono stati condotti sulla linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y che esprime costitutivamente sia il recettore NOP che il recettore CB₁. Sono state valutate le possibili variazioni biosintetiche e funzionali del recettore NOP mediante studi di espressione genica e di binding recettoriale. Nelle condizioni sperimentali adottate in seguito al trattamento con Δ^9 -THC si verifica una inibizione dose-dipendente sia della biosintesi che della densità recettoriale di NOP e questi effetti sono aboliti dal pretrattamento con l'antagonista CB1 AM251. I dati ottenuti da questo studio sperimentale, indicano per la prima volta l'esistenza di interazioni fra il sistema cannabinoide e il sistema nocicettina/NOP suggerendo un cross talk fra i recettori CB1 e NOP e conferiscono al recettore NOP un ruolo cruciale negli effetti indotti dal Δ^9 -THC.

Per quel che riguarda i farmaci oppiacei, essi rappresentano oggi il più potente strumento per la terapia del dolore cronico ed esplicano la loro efficacia terapeutica mimando le azioni dei peptidi oppioidi endogeni ma il loro uso è reso difficoltoso dallo sviluppo della tolleranza e della dipendenza. Il prototipo degli analgesici oppiacei è la morfina agonista di origine naturale del recettore oppioidi MOP, il cui effetto analgesico va incontro a tolleranza in seguito ad esposizione cronica. Il fentanil, derivato sintetico, è un agonista MOP 100 volte più potente della morfina e rispetto a questa ha un minore potenziale d'abuso e una ridotta frequenza di insorgenza della sindrome d'astinenza. L'aspetto più interessante è che, a differenza della morfina, il fentanil è in grado di internalizzare il recettore MOP e recenti studi ipotizzano che l'internalizzazione possa rendere più veloce il riciclo del recettore rendendolo nuovamente disponibile, questo potrebbe spiegare almeno in parte la ridotta tolleranza al fentanil rispetto alla morfina. Sulla base di queste premesse sono stati indagati gli effetti del fentanil e della morfina sull'espressione genica dei recettori MOP e NOP nella linea cellulare SH-SY5Y che esprime costitutivamente sia il recettore MOP che il recettore NOP. Dall'analisi dell'espressione genica è emerso che, nelle condizioni sperimentali adottate, in seguito al trattamento con morfina non si verificano variazioni nella biosintesi dei recettori NOP e MOP, al contrario, in seguito al trattamento con fentanil si assiste ad un aumento dell'espressione genica di MOP ed ad una diminuzione della biosintesi del recettore NOP. La capacità del fentanil di alterare la biosintesi di questi due recettori può gettare nuove basi per la comprensione dei meccanismi molecolari che sottendono lo sviluppo della tolleranza e portare ad un uso più razionale degli oppiacei in terapia.

L'alcol è tra le sostanze d'abuso maggiormente consumate e l'alcolismo è un disordine comportamentale caratterizzato dal consumo eccessivo di etanolo, dallo sviluppo di tolleranza e dipendenza e dalla diminuzione delle normali funzioni sociali e occupazionali. Gli studi condotti sino ad oggi indicano che produce i suoi effetti alterando direttamente diverse

proteine neuronali e in particolare i recettori di diversi neurotrasmettitori. Dai dati presenti in letteratura, si può ipotizzare che l'interazione del sistema nocicettina/NOP con il sistema dopaminergico e il sistema oppioide, coinvolti nell'alcolismo, può alterare le proprietà motivazionali dell'alcol. Negli ultimi anni si sono ottenute numerose informazioni sui meccanismi alla base della dipendenza da alcol e cresce sempre di più l'interesse per i meccanismi coinvolti nella sindrome da astinenza, poiché potrebbero rappresentare un nuovo target terapeutico per la cura dell'alcolismo. Sulla base di quanto esposto, sono state valutate le variazioni della biosintesi del sistema nocicettina/NOP a due time point di astinenza in un modello animale di alcolismo. L'analisi dei risultati ottenuti, mostrano che nella corteccia prefrontale e nel setto laterale non vi sono variazioni dell'espressione genica nè del recettore NOP nè del peptide nocicettina, nell'amigdala dopo tre settimane di astinenza da alcol i livelli di RNA messaggero della nocicettina risultano notevolmente aumentati, nell'ipotalamo l'espressione genica del recettore NOP risulta notevolmente aumentata dopo una settimana di astinenza da alcol e nel BNST (bed nucleus of stria terminalis) anche dopo astinenza prolungata. Da questi dati emerge che, in specifiche aree cerebrali, il sistema nocicettina/NOP è coinvolto nei fenomeni di adattamento neuronale che si verificano in seguito a periodi brevi e prolungati di astinenza da alcol e conferisce a questo sistema un ruolo importante nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della dipendenza da alcol.

In conclusione questa tesi sperimentale evidenzia il coinvolgimento del sistema nocicettina/NOP negli effetti indotti da diverse sostanze d'abuso, siano esse usate a scopo terapeutico o voluttuario, conferendogli un ruolo importante nei fenomeni di adattamento neuronale che si verificano in seguito all'assunzione cronica di queste sostanze. I dati esposti si aggiungono a quelli presenti in letteratura e suggeriscono che questo sistema possa essere un potenziale target terapeutico nelle terapie analgesiche e nel trattamento delle dipendenze da sostanze d'abuso.

1. INTRODUZIONE

Nel campo della neurobiologia l'avvento delle tecniche di biologia molecolare hanno contribuito notevolmente alle attuali conoscenze del sistema neuropeptidergico endogeno nocicettina/NOP, strutturalmente correlato al sistema oppioide.

Il primo recettore oppioide ad essere clonato fu il recettore δ nel 1992 (1,2) seguito nel 1993 dai recettori κ e μ (3,4). Questi tre recettori mostravano tra di loro un'omologia strutturale pari a circa il 60% e dallo screening delle librerie di cDNA nel 1994 fu scoperto anche il recettore NOP (5-9). L'anno successivo, alla fine del 1995, due diversi gruppi di ricerca scoprirono il peptide nocicettina, ligando endogeno del recettore NOP (10,11).

Il sistema neuropeptidergico nocicettina/NOP risulta essere coinvolto in numerose funzioni biologiche e i successivi paragrafi introduttivi sono dedicati all'esposizione delle conoscenze fino ad oggi acquisite, relative al recettore NOP e al suo ligando endogeno nocicettina.

1.1 Il sistema nocicettina/NOP

1.1.1 Il recettore NOP

Differenti gruppi di ricerca, impiegando tecniche di biologia molecolare, hanno messo in evidenza, nel breve volgere di un biennio (1994-1995), 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 (12,13). Questo recettore, i cui geni sono stati identificati nel topo, nell'uomo (7) e nel ratto (14), presenta marcate analogie di sequenza aminoacidica con i differenti tipi di recettori oppioidi (15) tuttavia non è in grado di interagire efficacemente con ligandi per tali recettori. In particolare l'allineamento delle sequenze aminoacidiche del recettore NOP con quella dei recettori oppioidi μ , δ e κ , ha evidenziato un'identità superiore all'ottanta per cento nel 2°, 3° e 7° dominio transmembranario e leggermente inferiore nelle anse citoplasmatiche; nella porzione N-terminale e nella 2° e 3° ansa extracellulare il livello di omologia risulta molto inferiore, (fig. 1). Benché esistano differenze di sequenza tra le varie forme di recettore per la nocicettina isolato in differenti specie, permane un'omologia superiore al novanta per cento.

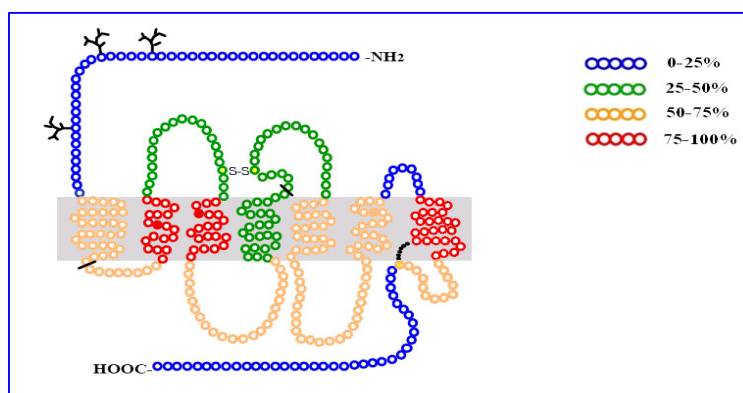


Fig. 1 Rappresentazione grafica dell'omologia di sequenza del recettore NOP con quella dei recettori oppioidi μ , δ e κ .

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, vas deferens, fegato e milza, ma non nel muscolo scheletrico, esofago, rene, testicoli e surrenali (9).

Nel S.N.C. i livelli più elevati di RNA messaggero codificante per il recettore NOP sono stati evidenziati tramite studi di ibridizzazione in situ nell'ipotalamo, nell'amigdala, nella corteccia piriforme, nel rafe dorsale e nel nucleus coeruleus. Esso è presente anche nella corteccia, nel lateral septum, nel talamo, nell'ippocampo, nella sostanza grigia periacqueduttale e nel midollo spinale (5,6,16).

Il recettore NOP è accoppiato a proteine G di tipo inibitorio nei confronti dell'enzima adenilatociclastasi e la sua attivazione determina inibizione della sintesi di cAMP (10), chiusura dei canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti (17) e apertura dei canali del potassio (18).

1.1.2 Il neuropeptide nocicettina

La nocicettina, ligando endogeno del recettore NOP, fu isolata per la prima volta nel 1995 da due diversi gruppi di ricerca. (10,11).

Dal punto di vista strutturale la nocicettina è un eptadecapeptide, fu denominato:

-nocicettina sulla base di una possibile azione nocicettiva a seguito di somministrazioni intracerebroventricolare nel topo

- orfanina FQ in riferimento al "recettore orfano", cioè al recettore NOP chiamato "orfano" prima dell'identificazione della nocicettina stessa quale ligando endogeno, e agli aminoacidi N- e C-terminali costituiti dalla fenilalanina e dalla glutammina (rispettivamente F e Q nel codice a singola lettera per gli aminoacidi).

Al di là delle analogie di struttura con alcuni peptidi oppioidi (10,11) (fig. 2), una caratteristica importante della nocicettina è l'assenza dell'aminoacido tirosina in posizione uno (presente in tutti i peptidi oppioidi) sostituito dalla fenilalanina. Questa differenza determina una scarsa affinità per i recettori μ , δ e κ (10,11) e sembra conferirle il ruolo di antagonista funzionale nei confronti del sistema oppioidi

| | |
|---------------------|--|
| 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 |
| γ -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.

A seguito dell'isolamento del gene che codifica per la nocicettina (10) è stato possibile dedurre la sequenza del polipeptide precursore da cui la nocicettina stessa deriva (fig. 3).

Poco prima della nocicettina stessa è inoltre presente una sequenza peptidica di 35 aminoacidi corrispondente alla nocistatina (fig. 4), un peptide non ancora completamente caratterizzato dal punto di vista farmacologico, ma che pare svolgere un'azione da antagonista funzionale della nocicettina.

A valle della nocicettina si ritrovano altre due sequenze:

-una sequenza di 17 amminoacidi avente anch'essa la fenilalanina e la glutammina rispettivamente in posizione ammino e carbossi terminale, è stata denominata orfanina

FQ2, manca di affinità per il recettore NOP e pare avere un ruolo nella nocicezione

(11);

-una sequenza 8 aminoacidi nota come CT.

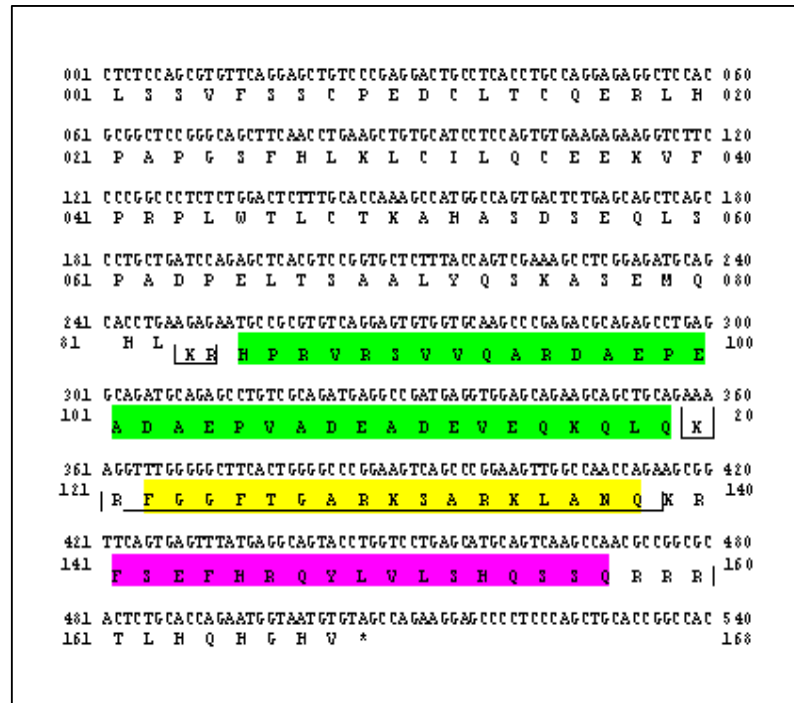


Fig. 3 Sequenza nucleotidica del cDNA di ratto codificante per la pronocicettina e sequenza aminoacidica del precursore stesso. La sequenza del peptide Nocicettina è sottolineata in modo continuo; due altre possibili sequenze sono sottolineate in modo tratteggiato. I riquadri indicano gli aminoacidi basici, possibili siti di taglio enzimatico.

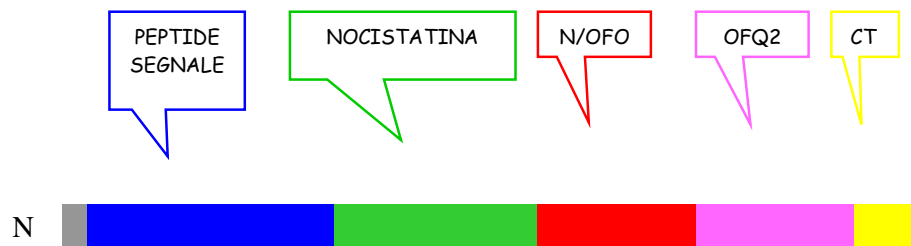


Fig. 4 Sequenza schematica del precursore della nocicettina prepronocicettina/orfaninaFQ (ppN/OFQ). I colori evidenziano i diversi peptidi potenzialmente prodotti per splicing alternativo, durante il processo di maturazione del precursore.

Gli studi compiuti per indagare le relazioni struttura-attività nella sequenza aminoacidica della nocicettina hanno indicato che la nocicettina 1-14 mantiene la piena capacità di legarsi al recettore, mentre l'affinità cala drasticamente con i frammenti nocicettina 1-12 e 1-8 (19,20); risultati simili sono stati ottenuti in vitro per quanto riguarda l'attività biologica di tali frammenti (21).

Inaspettatamente, anche i peptidi di nocicettina 7-18 e 13-18 mostrano un'elevata affinità per il recettore NOP (13,22).

Questo complesso di osservazioni indica che la parte strutturale significativa della nocicettina è rappresentata dalla sua porzione interna altamente basica; sia in termini di riconoscimento che di attivazione del suo recettore.

Tutto ciò suggerisce che, malgrado l'omologia strutturale dei recettori oppioidi con il recettore NOP e dei peptidi oppioidi con la nocicettina, quest'ultima non si leghi al suo recettore nello stesso modo in cui la dinorfina A lega i recettori oppioidi. In particolare, l'evidenza dell'affinità della nocicettina (13,14,22) per il recettore NOP indica che la teoria del "message-address" finora utilizzata per i peptidi oppioidi, possa non essere applicabile alla nocicettina (23).

A livello del S.N.C. la distribuzione di questo eptadecapeptide sembra più limitata rispetto a quella del suo recettore. La nocicettina è presente tra l'altro nell'area preottica, nel setto, nell'amigdala e nell'eminenza mediana. Invece bassi livelli del peptide sembrano presenti in numerose aree in cui il recettore, al contrario, risulta altamente espresso, come ad esempio nella corteccia, nel nucleo soprachiasmaottico, nel nucleo sopraottico, nei nuclei paraventricolare e ventromediale dell'ipotalamo e nel rafe dorsale (23). Infine, livelli elevati della nocicettina sono stati riscontrati negli

strati superficiali delle corna dorsali del midollo spinale, nel complesso trigeminale ed in altre aree coinvolte nella trasmissione del dolore, tra cui la sostanza grigia periacqueduttale (24,25).

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 alle proteine G_i/G_o . In cellule transfettate, la nocicettina inibisce marcatamente l'enzima adenilatociclastasi (19,20) stimolato con forskolina e determina l'apertura del canale del K^+ del tipo "inward rectifier" (18).

Analogamente in linee cellulari derivanti da neuroblastoma umano la stimolazione di NOP da parte della nocicettina determina una riduzione dell'accumulo di cAMP stimolato dalla forskolina (10,11).

L'azione sui canali al K^+ è stata osservata anche nel ratto, nei neuroni del rafe dorsale e della sostanza grigia periacqueduttale (26,27).

Il neuropeptide è inoltre in grado di inibire l'entrata di Ca^{2+} attraverso i canali voltaggio-dipendenti nella linea cellulare SH-SY5Y (28) ed in colture di neuroni piramidali ippocampali (29). L'inibizione di canali del Ca^{2+} voltaggio-sensibili a livello ippocampale, coinvolge le proteine G_i dal momento che è prevenuto da un pretrattamento con tossina della pertosse e coinvolge più tipi di canali per il Ca^{2+} (di tipo N, L e P/Q).

Sempre a livello del S.N.C. è stato osservato che la nocicettina altera sia la liberazione di glutammato che quella di GABA dai terminali nervosi (30, 31).

Per quanto riguarda la periferia, la nocicettina è in grado di bloccare la liberazione di

acetilcolina causata dalla stimolazione luminosa nella retina di coniglio (32).

Relativamente al sistema nervoso simpatico, questo neuropeptide è in grado di bloccare efficacemente la trasmissione neuromuscolare nel vas deferens di ratto (33) e topo (21,34).

In relazione al sistema parasimpatico, alcuni risultati indicano (35) 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 (10,11), hanno anche evidenziato come la sua somministrazione intracerebroventricolare nel topo, produca un abbassamento della soglia sia nel test della piastra calda (10), sia in quello del "tail-flick" (11).

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

Alcuni autori hanno suggerito un coinvolgimento di meccanismi di autoanalgesia indotta da stress nell'azione della nocicettina (36). Altri studi hanno anche proposto l'esistenza di una risposta bifasica comprendente un'iperalgia, seguita da un periodo di analgesia (37).

L'azione esercitata dal neuropeptide 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 (38), mentre altre indagini hanno rivelato un effetto inibitorio del neuropeptide sulle risposte sinaptiche da fibre di tipo C (39,40).

E' stato osservato che la nocicettina è in grado di diminuire la liberazione di tachichinine a livello del terminale periferico di neuroni afferenti primari con una azione non modificata dal naloxone (41).

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 intracerebroventricolare di basse dosi del peptide (42).

Per quanto riguarda l'attività motivazionale, la nocicettina non sembra produrre effetti gratificanti o aversivi (43), benché nel nucleo 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 (44).

Infatti e' noto da tempo che il nucleus accumbens è implicato in numerose funzioni che includono il rinforzo, la gratificazione da farmaco e il comportamento locomotore (45).

I ratti hanno dimostrato di sviluppare tolleranza agli effetti locomotori indotti da nocicettina (46).

Recenti risultati hanno suggerito che la nocicettina sopprime l'attività delle vie di gratificazione dopaminergiche del sistema mesocortico-limbico non producendo

tuttavia come già accennato, né aversione né preferenza nei test di scelta condizionata (place preference); tuttavia, in studi più recenti sempre riguardanti test di scelta condizionata, la nocicettina si è dimostrata capace di modificare in senso inibitorio condizioni di preferenza indotte da altre sostanze, quali alcool e morfina (47).

E' stato recentemente osservato che l'uso cronico di alte dosi di morfina accelera la liberazione e la biosintesi di nocicettina (48) 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 (48,49).

Alcuni risultati indicano che la nocicettina diminuisce l'attività dei neuroni dopaminergici mesocortico-limbici attraverso un'azione nell'area ventrale tegmentale (VTA). Questo effetto non solo è transitorio, ma dimostra anche rapida tolleranza e quindi è 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 (50).

Un comportamento di rinforzo influenzato dal nucleus accumbens e dall'ipotalamo riguarda quello della nutrizione. E' stato dimostrato un chiaro aumento nell'effetto centrale gratificante di sostanze d'abuso negli animali sottoposti a restrizione di cibo (51). Più recentemente è stato dimostrato che somministrazioni di nocicettina nel nucleo ipotalamico ventromediale o nel nucleus accumbens aumentano l'assunzione di cibo nei ratti (52).

Il ruolo della nocicettina nella stimolazione del comportamento di alimentazione è sostenuto, inoltre, da un recente studio che dimostra una riduzione dell'iperfagia, indotta da nocicettina, in seguito ad una somministrazione centrale di una sonda antisenso nei confronti di NOP (53).

Negli studi citati si è ravvisata più volte la necessità di disporre di nuove molecole, possibilmente di natura non peptidica, che attivino selettivamente (agonisti) o che blocchino (antagonisti) il recettore NOP.

Per quel che riguarda gli agonisti sono stati identificati numerosi peptidi che derivano da modificazioni a livello di specifici aminoacidi della nocicettina.

Tra gli agonisti di natura non peptidica possiamo citare il composto ZP120 (54) e la molecola denominata Ro 64-6198 della Roche (55).

Al fine di dimostrare in maniera definitiva che gli effetti della nocicettina sono prodotti dalla sua interazione con il recettore NOP, risulta più utile disporre di antagonisti puri e selettivi per il recettore NOP.

A tale scopo possono essere impiegate alcune molecole capaci di antagonizzare il recettore NOP. Tali composti sono ad esempio:

1. il Naloxone benzoilidrazone (NalBzOH) è un ligando dei recettori oppioidi non selettivo, è in grado di bloccare in maniera competitiva alcuni effetti della nocicettina (20,56). Tuttavia questo farmaco non è ideale poiché possiede affinità anche per i recettori oppioidi κ e μ ;
2. il composto J-113397 è un potente antagonista non peptidico selettivo nei confronti del recettore NOP, il primo ad essere identificato (57). In topi sottoposti al test del tail-flick è stato osservato che la somministrazione sottocutanea di J-113397 inibisce

l'iperalgia indotta dalla nocicettina somministrata per via intracerebroventricolare (58) e studi in vitro, condotti sulle cellule Chinese Hamster Ovary, hanno evidenziato che possiede un'alta affinità per il recettore NOP (59);

3. il composto UFP-101 è un antagonista di natura peptidica (60) e si è dimostrato capace di antagonizzare l'effetto antinocicettivo spinale della N/OFQ nei topi (61);

4. il composto JTC-801 è un antagonista del recettore NOP in vitro e si è osservato in studi in vivo che si oppone agli effetti della nocicettina (62,63,64).

1.1.4 Interazione del sistema nocicettina/recettore NOP con altri sistemi neuronali

Molti studi hanno dimostrato che la nocicettina inibisce la liberazione di noradrenalina in fettine di corteccia cerebrale nel ratto, nel topo e nella cavia (56, 65, 66) ed in fettine di ippocampo e ipotalamo di topo (67).

Ciò è in accordo anche con la distribuzione del recettore NOP, che viene espresso in varie regioni cerebrali ricche di fibre noradrenergiche quali l'ippocampo, il tratto del nucleo solitario e il nucleo reticolare laterale (68).

In particolare la presenza del recettore NOP in alcune formazioni ippocampali è stata messa in relazione con un possibile coinvolgimento del recettore NOP in processi cognitivi e di memoria.

Studi condotti in vitro su fettine di corteccia cerebrale nel topo, hanno dimostrato che la nocicettina inibisce la liberazione di dopamina (66).

Studi in vivo hanno dimostrato che la nocicettina, somministrata per via intracerebroventricolare (44) oppure mediante sonde di microdialisi direttamente nell'area ventrale tegmentale (69), riduce il rilascio di dopamina nel nucleus

accumbens di ratti anestetizzati. Altri studi in vivo hanno al contrario dimostrato che la nocicettina, somministrata per via intracerebroventricolare, di per sé non è in grado di modificare la liberazione di dopamina nel nucleus accumbens e nel nucleo caudato, ma previene l'aumento della liberazione di dopamina, provocato dalla morfina somministrata per via sistemica, sia nel nucleus accumbens che, in misura minore, nel nucleo caudato (70,71).

L'inibizione delle fibre mesocortico-limbiche dopaminergiche da parte della nocicettina ben si accorda con altre osservazioni sperimentali che la vedono coinvolta nei meccanismi di gratificazione, cognitivi e della motilità, che trovano sede principale proprio nel sistema mesocortico-limbico (68).

Infine degli studi in vivo hanno dimostrato che la nocicettina, somministrata mediante una sonda da microdialisi direttamente nello striato di ratti non anestetizzati, è in grado di aumentare la liberazione di dopamina in maniera naloxone sensibile (72).

Questo ruolo facilitatorio della nocicettina sui neuroni dopaminergici nigro-striatali è in perfetto accordo con studi di distribuzione funzionale del recettore NOP, che lo vedono espresso nelle proiezioni nigro-striatali implicate nella coordinazione del movimento.

La nocicettina inoltre inibisce la liberazione di serotonina (5-HT) sia da sinaptosomi che da fettine (73) nella corteccia di ratto, tutto ciò è stato messo in relazione con l'azione ansiolitica di cui il recettore NOP e la nocicettina sembrano essere responsabili (74).

La nocicettina a dosi elevate è in grado di non è in grado di aumentare i livelli di GABA nell'area ventrale tegmentale (31). Tutto ciò è correlabile con la capacità della

nocicettina di diminuire la liberazione di dopamina nel nucleus accumbens quando somministrata tramite sonde da microdialisi nell'area ventrale tegmentale (69). Infatti i neuroni gabaergici e glutammatergici presenti nell'area ventrale tegmentale sono in grado di modulare in senso inibitorio le fibre dopaminergiche che dall'area ventrale tegmentale proiettano al nucleus accumbens (66).

In conclusione è possibile affermare che il recettore NOP è presente in strutture cerebrali che non sono associate con singole funzioni fisiologiche o con singoli sistemi neurotrasmettitoriali, bensì in aree coinvolte in vari processi, come il dolore e la percezione sensoriale, la memoria, lo stress, la motilità, la regolazione endocrina, la gratificazione.

Questa distribuzione ampia può riflettersi nel coinvolgimento del recettore NOP con un grande numero di risposte fisiologiche, o, più probabilmente il recettore NOP contribuisce come anche altri sistemi all'omeostasi generale modulando contemporaneamente diversi circuiti neuronali.

1.1.5 Sistema nocicettina/NOP e analgesia

Nell'ambito della nocicezione il sistema nocicettina/NOP riveste un ruolo sempre più importante. L'interesse è nato da varie osservazioni: la somiglianza dal punto di vista strutturale del sistema nocicettina/NOP con il sistema oppioide, la condivisione della stessa via di trasduzione del segnale, nonché la co-localizzazione di questi due sistemi in specifiche aree coinvolte nella nocicezione.

Il dolore è costituito da più componenti che possono essere distinte e definite come: fisiologico-discriminativa, emozionale-affettiva e cognitivo-valutativa. Sicuramente, la componente fisiologico-discriminativa è quella più importante e la conoscenza dei suoi

substrati neuronali, costantemente in evoluzione, può consentire la messa in atto delle migliori strategie farmacologiche ai fini terapeutici.

Gli stimoli di elevata intensità (di natura chimica, termica, meccanica) vengono raccolti in periferia dai nocicettori, strutture neuronali specializzate, che rappresentano l'estremità distale di specifiche fibre nervose (fig. 5), classificabili come di tipo C e A δ (neuroni afferenti primari o neurone di I ordine). La loro particolare struttura anatomica (cellule a T) consente la trasmissione dell'impulso ad un secondo neurone (neurone di II ordine, tratto spino-talamico) che convoglia l'informazione a specifiche aree del talamo, da cui altre fibre nervose proiettano verso aree somato-sensoriali della corteccia cerebrale e a differenti strutture cerebrali (neurone di III ordine, tratto talamo-corticale).

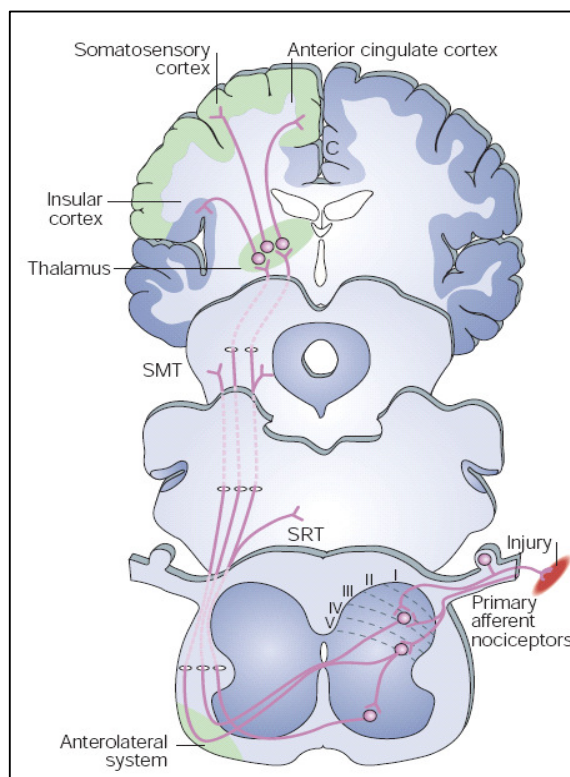


Fig. 5 Rappresentazione schematica della via ascendente di trasmissione degli impulsi nocicettivi.

La funzionalità di queste vie ascendenti di trasmissione degli impulsi nocicettivi appena descritti può essere modulata dall'attività di un secondo importante circuito neuronale: il sistema di controllo discendente (fig. 6). Quest'ultimo, soggetto anche all'influenza di strutture cerebrali superiori, ha tra le sue stazioni più importanti la sostanza grigia periacqueduttale (PAG, a livello mesencefalico) ed i nuclei bulbo-pontini del rafe; da questi partono fibre a mediazione monoamminergica (5-HT, NA) che decorrono caudalmente lungo i funicoli dorso-laterali del midollo spinale e vanno ad influenzare, direttamente o tramite brevi interneuroni, la funzionalità dei neuroni di I ordine mediante recettori presinaptici con diminuzione della liberazione di neurotrasmettitori eccitatori o di quelli di II ordine, mediante recettori post-sinaptici che riducono l'eccitabilità. L'attività del sistema discendente è quindi in grado di determinare una riduzione dell'input nocicettivo proveniente dalla periferia.

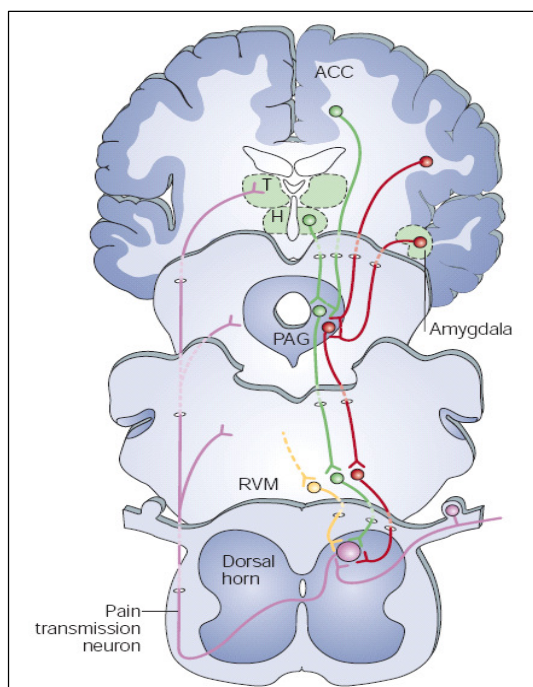


Fig. 6 Rappresentazione schematica della via del sistema di controllo discendente degli impulsi nocicettivi.

L'attività farmacologica dei farmaci oppiacei è in buona parte da ricondurre alla distribuzione strategica, lungo le vie appena menzionate, di neuroni ad attività oppioide. La somministrazione esogena di farmaci morfino-simili, infatti si traduce in una riduzione della trasmissione lungo la via ascendente nonché in un potenziamento della funzione inibitoria della via di controllo discendente. All'effetto analgesico complessivo concorrono sicuramente anche le azioni esercitate dagli oppiacei su altre strutture soprassinali (ad esempio, in sede talamica e corticale).

In condizioni fisiologiche il sistema ascendente appena descritto garantisce l'adeguato riconoscimento di stimoli o situazioni potenzialmente nocivi, tuttavia negli stati di dolore cronico mancano di questo significato finalistico/protettivo ed assumono invece i caratteri di un vera condizione patologica i cui meccanismi cellulari e molecolari possono essere ricercati nei fenomeni di sensibilizzazione periferica e centrale.

Infatti, in una situazione di insulto periferico protratto o danno alle vie nervose, si assiste alla liberazione di numerose sostanze (ad esempio chinine, prostanoidi, ATP, purine) capaci di interagire con specifici recettori posti sui terminali sensitivi. Ciò conduce ad una massiccia stimolazione e ad una modificazione della funzionalità dei terminali stessi con abbassamento della loro soglia di eccitabilità (sensibilizzazione periferica, iperalgesia). Questa situazione anomala, in cui si assiste ad un'elevata frequenza di scarica proveniente dalla periferia, genera a sua volta alterazioni delle normali funzioni dei neuroni di II ordine del midollo spinale, cui concorrono numerosi neurotrasmettitori e recettori e, tra questi ultimi, i recettori ionotropi per il glutammato sembrano svolgere un ruolo di rilievo. Si genera così una situazione di sensibilizzazione centrale che prevede il fenomeno di *wind-up*, capace di aumentare

marcatamente la sensibilità dei neuroni spinali all'input periferico, ne consegue che i recettori si attivano anche con potenziali d'azione normalmente troppo bassi per trasmettere l'impulso. Il risultato è che i neuroni spinali, che normalmente sarebbero attivati solo da stimoli nocivi, possono ora essere attivati da stimoli normalmente non nocivi, veicolati ad esempio da fibre di tipo A β differenti da quelle di tipo A δ e C (normalmente attivate da stimoli nocivi). Si instaura così una condizione di allodinia che si aggiunge all'iperalgia e concorre a sostenere la condizione di dolore cronico e patologico sostanzialmente differente dal dolore acuto e fisiologico.

Benchè sia riconosciuta l'efficacia degli oppiacei nel dolore cronico, in queste condizioni di perdurante infiammazione e/o di neuropatia può verificarsi una diminuzione del loro effetto. Questo può dipendere da vari fattori che comprendono, tra l'altro:

- una perdita di recettori μ presinaptici per degenerazione delle fibre afferenti primarie di tipo C;
- una difficoltà degli oppiacei nel controllare l'aumento di attività dei neuroni spinali di II ordine per il subentro di nuovi meccanismi quali il wind-up;
- la patologica e anomala trasmissione nocicettiva da parte di fibre del tipo A β scarsamente sensibili agli oppiacei poichè povere dei recettori oppioidi.

Per questi motivi in situazioni patologiche, in cui sia prevedibile il perdurare delle condizioni dolorose, è da ritenersi più produttivo mettere in atto una tempestiva, precoce ed efficace terapia analgesica, secondo protocolli di somministrazione di oppiacei programmata e non effettuata solo momentaneamente in caso di necessità. Questa scelta potrebbe limitare il verificarsi delle condizioni di deragliamento della

trasmissione nocicettiva cui si assiste nelle condizioni di dolore cronico, dovuto almeno in parte ai meccanismi sopra descritti (75).

La parte rostroventromediale del tronco dell'encefalo è il sito anatomico in cui si esplica l'azione antioppiode della nocicettina, qui si trovano due tipi di cellule: le cellule on e le cellule off (76,77). Le cellule on inibiscono l'azione delle cellule off e sono inibite dall'azione della morfina che si lega ai recettori μ . Le cellule off si proiettano nelle corna dorsali posteriori a livello del sistema discendente e riducono l'informazione nocicettiva ascendente diretta verso i neuroni di III ordine (tratto spinotalamico). Quando la morfina inibisce le cellule on questo effetto provoca la disinibizione delle cellule off provocando un effetto antinocicettivo. La nocicettina inibisce sia le cellule on che le cellule off con un'inibizione diretta sulle cellule off producendo un aumento del traffico nocicettivo. Ovviamente questa inibizione delle cellule off determina il blocco di ogni azione degli oppioidi sulle cellule on producendo un'azione antioppiode.

Dal punto di vista neurochimico si è osservato che i vari tipi di dolore inducono la produzione di diverse sostanze. Ad esempio, è stato osservato che in caso di stati dolorifici associati all'infiammazione si verifica un aumento della sostanza P e di CGRP (peptide correlato al gene della calcitonina) nelle corna dorsali, in caso di dolore neuropatico si osserva una diminuzione di queste stesse sostanze e nel dolore oncologico non si ha alcuna variazione (78,79). Allo stesso modo la galanina e il peptide Y aumentano marcatamente nei neuroni sensoriali nel dolore neuropatico, mentre non si verificano cambiamenti nel dolore oncologico (78,79,80).

Tuttavia la differenza principale osservata a livello del midollo spinale in caso di dolore oncologico da tumore osseo è rappresentata dall'up-regulation della GFAP (glial fibrillary acidic protein). Questo implica che in caso di dolore infiammatorio, neuropatico o oncologico si osservano distinti cambiamenti neurochimici a livello della spina dorsale e dei gangli della radice dorsale.

Da ciò deriva l'importanza terapeutica della conoscenza dei diversi assetti neurochimici, per indirizzare l'azione dei farmaci verso le cellule e le sostanze che mostrano modificazioni significative nelle diverse condizioni di dolore.

Nonostante siano stati fatti numerosi passi avanti nella diagnosi e nel trattamento dei tumori, le basi neurobiologiche del dolore associato a questa patologia devono ancora essere chiarite.

Nei tumori sono presenti, oltre alle cellule tumorali, altri tipi di cellule tra cui quelle del sistema immunitario come i macrofagi, i neutrofilo e le cellule T. Queste secernono varie sostanze tra cui le prostaglandine (81,82), le endoteline (83,84,85), TNF α (84), le interleuchine 1 e 6 (84,86,87) e il vascular endothelial growth factor (VEFG) (88), sostanze che possono eccitare direttamente i neuroni afferenti primari (fig. 7) poiché presentano i recettori per molti di questi fattori.

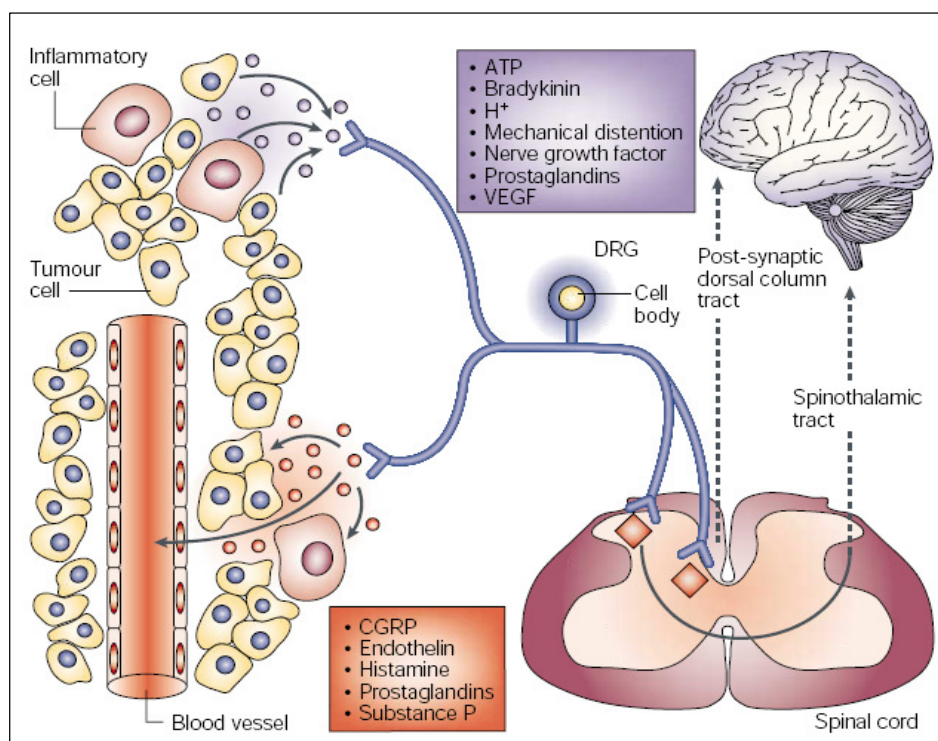


Fig. 7 Cellule presenti in un tumore e sostanze rilasciate dai differenti tipi cellulari.

Nonostante ognuno di questi fattori possa contribuire all'induzione del dolore in particolari forme di tumore, i farmaci utilizzati per il controllo del dolore oncologico hanno come bersaglio principalmente le prostaglandine e le endoteline. Vengono infatti utilizzati gli inibitori degli enzimi che catalizzano la sintesi di tali mediatori, le ciclossigenasi 1 e 2 (COX1 e delle COX2), in particolare la COX1 è costitutivamente espressa nella maggior parte dei tessuti, mentre la COX2 è inducibile e viene espressa solo in condizioni di infiammazione. Il problema associato all'utilizzo degli inibitori delle ciclossigenasi non selettivi nel dolore oncologico è lo sviluppo di ulcera gastrica e di emorragie, dovute al blocco della COX1 costitutiva che in condizioni fisiologiche mantiene l'integrità della mucosa gastrica. Al contrario gli inibitori selettivi delle COX2 non causano complicazioni del tratto gastrointestinale e poiché la COX2 è anche associata all'angiogenesi e alla crescita tumorale (89,90), si può supporre che gli

inibitori delle COX2, oltre a ridurre il dolore oncologico, possono rallentare la crescita del tumore.

Gli antagonisti delle endoteline rappresentano un altro agente farmacologico utile nella terapia analgesica. Le endoteline sono una famiglia di peptidi vasoattivi che sono espressi in larga scala a vari tipi di tumore, tra cui il tumore alla prostata.

Studi clinici hanno dimostrato una correlazione tra la gravità del dolore e i livelli plasmatici di questo mediatore in pazienti affetti da tumore alla prostata (91,92). Le endoteline potrebbero contribuire all'aumento del dolore stimolando direttamente i nocicettori. Inoltre applicazioni dirette di endoteline ai nervi periferici inducono l'attivazione delle fibre afferenti primarie aumentando lo stato doloroso. Come le prostaglandine, anche le endoteline prodotte dalle cellule tumorali si pensa possano essere coinvolte nella regolazione dell'angiogenesi e della crescita tumorale.

Questi dati indicano che gli antagonisti delle endoteline potrebbero essere utili per inibire il dolore oncologico, la crescita tumorale e la formazione di metastasi.

1.1.6 Recettore NOP e sistema mesocorticolimbico

Il sistema mesocorticolimbico consiste in un insieme di neuroni che traggono origine dall'area ventrale tegmentale dell'encefalo e proiettano soprattutto nel nucleus accumbens, nella corteccia frontale, nel tubercolo olfattivo, nell'amigdala e nell'area del setto (fig. 8).

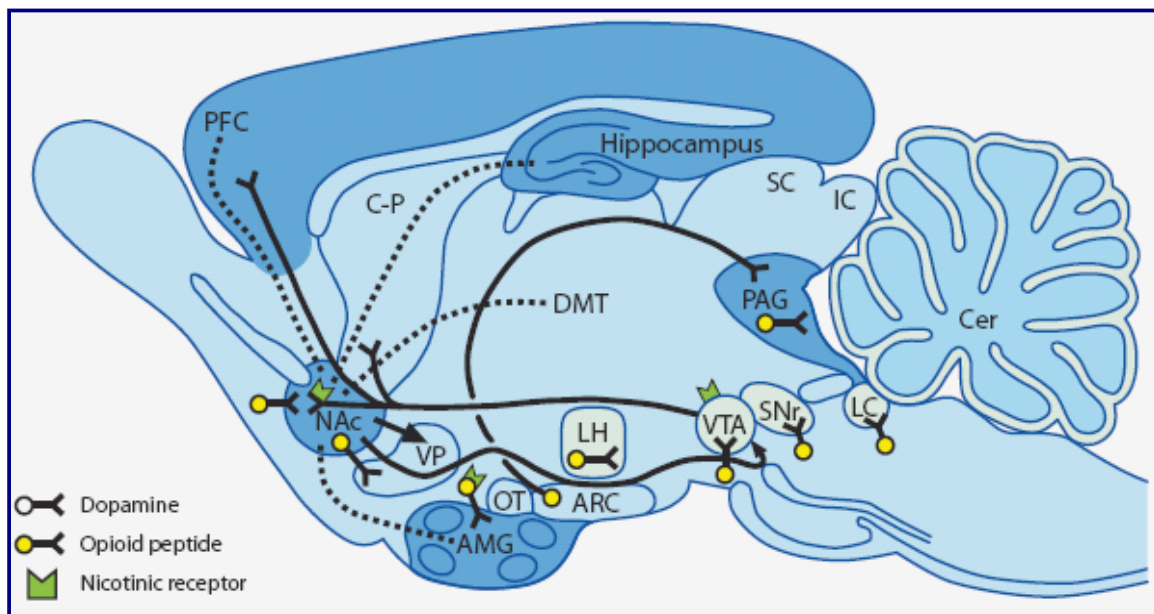


Fig 8 Principali circuiti di gratificazione da farmaci d'abuso.

Questo complesso di fibre neuronali ad elevata, ma non solo, componente dopaminergica rappresenta il maggiore sistema di conduzione afferente ed efferente di queste aree cerebrali, oltre che di altre importanti aree, quali l'ipotalamo.

Il sistema mesocorticolimbico appare implicato nei meccanismi di gratificazione di numerose sostanze d'abuso, quali oppiacei, cocaina, amfetamine, nicotina e derivati della cannabis sativa. Un ruolo di primaria importanza nei processi di gratificazione e iperlocomozione è svolto dal nucleus accumbens. Questo nucleo, data la sua posizione

anatomica, funzionerebbe come modulatore o meglio come filtro di segnali provenienti dal sistema limbico, i quali verrebbero poi tradotti in azioni motorie dal sistema extrapiramidale.

La stimolazione del sistema mesocorticolimbico è probabilmente dovuta all'aumentata concentrazione di dopamina nello spazio sinaptico in seguito ad un'aumentata liberazione del neurotrasmettitore ed ad una inibizione parziale della sua ricaptazione mediata dal trasportatore.

Alcuni neuroni di tale sistema sono di natura oppioide, in particolare esistono fibre contenenti enkefaline che proiettano all'area ventrale tegmentale, alla substantia nigra e nel nucleus accumbens.

Inoltre l'interesse nei confronti di tale sistema trae origine dalle evidenze sperimentali, precedentemente citate, che vedono il sistema recettore NOP/nocicettina presente in alte concentrazioni nelle aree del sistema mesocortico-limbico e questa distribuzione si riflette nel coinvolgimento di tale recettore nei meccanismi indotti da sostanze d'abuso.

Risulta evidente da quanto esposto che il sistema nocicettina/NOP è distribuito ampiamente nel S.N.C. e questo può riflettersi nel coinvolgimento del recettore NOP con un grande numero di risposte fisiologiche o, più probabilmente, il recettore NOP contribuisce, come anche altri sistemi neurotrasmettitoriali, all'omeostasi generale modulando contemporaneamente diversi circuiti neuronali.

1.2 Sistema nocicettina/NOP e Δ^9 -tetraidrocannabinolo

1.2.1 Il sistema cannabinoide

Il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) è considerato dal punto di vista farmacologico il derivato cannabinoide più attivo della pianta *Cannabis Sativa* o Canapa Indiana (fig. 9) e dei suoi derivati: marijuana (infiorescenze) e hashish (resina).

Gli effetti psicotropi della *Cannabis Sativa* sono ben conosciuti da oltre 5000 anni. È una pianta apprezzata e coltivata da millenni per le utili fibre, le proprietà curative e, soprattutto, per i suoi effetti inebrianti che inducono uno stato definito “high” in cui la persona appare rilassata e mediamente euforica, ma con alterazioni percettive che possono includere distorsioni temporali, uditive e visive e un rallentamento delle funzioni cognitive. Sono inoltre presenti un incremento del battito cardiaco, vasodilatazione e stimolazione dell’appetito.

La *Cannabis* è stata utilizzata per oltre cinquemila anni nel trattamento di isteria, delirio, insonnia, nausea, anoressia, glaucoma e dolore. Agli inizi del ventesimo secolo, in Europa e negli Stati Uniti, era prescritta per la cura di asma, pertosse, disordini gastrointestinali, dolore, anoressia, diarrea e malaria. Col passare del tempo l’utilizzo della *Cannabis* a scopo terapeutico è calato, è stata prima sostituita da farmaci sintetici specifici e poi, nel 1970, è stata classificata come droga senza valore terapeutico. Successivamente, negli anni ottanta, il Δ^9 -THC è stato introdotto in clinica (insieme al nabilone suo analogo sintetico), per il trattamento di nausea e vomito indotti da chemioterapia e nel 1992 nei pazienti malati di AIDS.

La marijuana contiene oltre 460 componenti, 66 hanno una caratteristica struttura terpenofenolica e formano la classe dei cannabinoidi, i più abbondanti rappresentanti

sono il cannabinolo (CBN), il cannabidiolo (CBD), il cannabigenolo (CBG) ed alcuni isomeri del tetraidrocannabinolo (THC).

L'isomero responsabile della maggior parte degli effetti psicoattivi della marijuana è il Δ^9 -THC (fig. 9), isolato nel 1964 da Gaoni e Mechoulam (93). Esso è altamente lipofilo, infatti supera facilmente la barriera emato-encefalica, subisce un grande effetto di primo passaggio ed ha una bassa biodisponibilità per via orale

La maggioranza degli altri cannabinoidi non dà effetti psichici significativi, questi composti possono variamente interagire con il Δ^9 -THC aumentandone o decrementandone la potenza. Ricordiamo il cannabidiolo, identificato nel 1934, che possiede proprietà antiossidanti e antinfiammatorie (94), la co-somministrazione di cannabidiolo può alterare gli effetti farmacologici del Δ^9 -THC, ne potenzia alcuni effetti terapeutici e attenua molti dei suoi effetti avversi (95,96,97).

È noto che l'utilizzo di cannabinoidi può indurre o facilitare l'espressione clinica di diverse patologie mentali, in soggetti vulnerabili o predisposti, con quadri clinici di tipo prevalentemente psicotico.

Solo negli anni '90 si arriva all'identificazione ed al clonaggio dei recettori per i cannabinoidi (98), a cui segue la scoperta di composti cannabinoidi endogeni e la sintesi di composti agonisti ed antagonisti selettivi.

La scoperta di recettori per il Δ^9 -THC e di molecole endogene in grado di attivarli tali, simulando così in gran parte i tipici effetti psicotropici, dimostra l'esistenza del sistema cannabinoide endogeno il cui ruolo fisiologico è ancora materia di dibattito.

Gli studi futuri potranno portare a comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base dell'abuso di preparati della canapa indiana e a sviluppare, sulla base delle ben

note proprietà terapeutiche di tale pianta, nuovi farmaci ad alto potenziale terapeutico per la cura di malattie del sistema nervoso, immunitario e cardiovascolare.

Recenti evidenze scientifiche hanno dimostrato che questo sistema svolge complessi effetti di modulazione neuronale implicati nei processi delle memorie avversive (ricordi dolorosi), nella neuroprotezione contro l'eccitotossicità e nella regolazione dell'equilibrio energetico- metabolico dell'organismo.

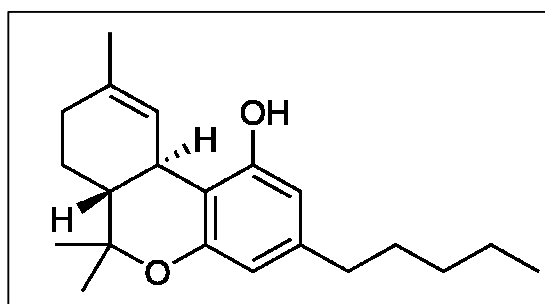


Fig. 9 Cannabis sativa e struttura chimica del Δ^9 -THC.

1.2.2 I recettori per i cannabinoidi

I cannabinoidi naturali sono altamente lipofili e per molto tempo fu creduto che il loro meccanismo d'azione risiedesse semplicemente nella capacità di stabilire interazioni aspecifiche con i lipidi di membrana, alterandone così la fluidità. Tuttavia l'osservazione che i cannabinoidi possedevano una certa stereoselettività, come evidenziato dalla forte perdita di potenza degli enantiomeri del THC in svariati test comportamentali, rendeva plausibile l'ipotesi di un'interazione con un recettore

specifico. Sino ad oggi sono stati isolati e clonati due recettori per i cannabinoidi: i recettori CB1, che mostrano una distribuzione prevalentemente nel sistema nervoso centrale ed i recettori CB2 prettamente periferici, identificati prima nelle cellule del sistema immunitario e recentemente anche nel SNC, a livello del cervelletto, della corteccia cerebrale e del tronco encefalico (99).

I CB1 sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali. Aree particolarmente ricche di recettori CB1 sono i gangli della base (substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare e caudato-putamen laterale), il cervelletto, l'ippocampo e la corteccia. Sebbene in minore densità, i recettori CB1 sono rilevabili anche in aree limbiche quali il nucleus accumbens e l'amigdala, nell'ipotalamo, nel mesencefalo, nel midollo allungato e nel midollo spinale (100), (fig. 10).

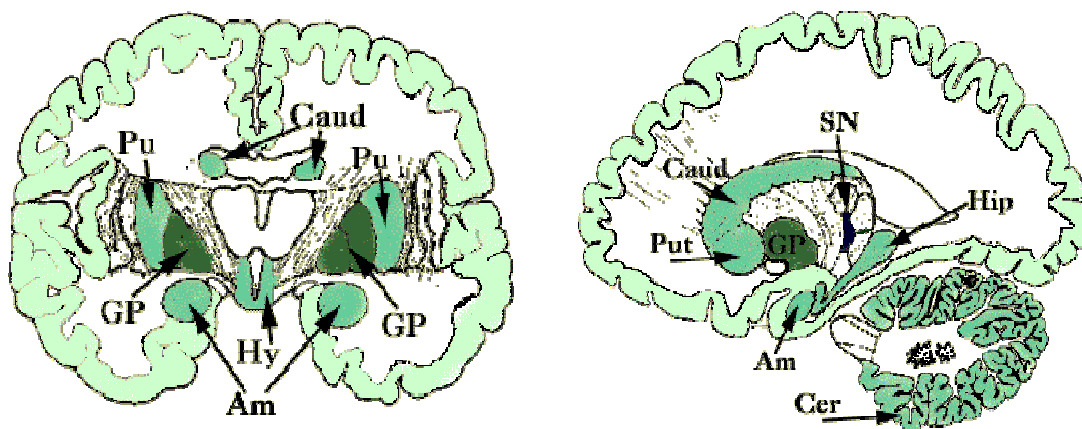


Fig. 10 Localizzazione del recettore CB1 a livello cerebrale.

Nell'insieme la localizzazione dei recettori CB1 è facilmente correlabile con gli effetti psicotropi dei cannabinoidi.

Sebbene i recettori CB1 siano prevalentemente localizzati a livello del sistema nervoso centrale, basse densità recettoriali sono state identificate anche in tessuti periferici quali la milza, il cuore, i testicoli, il timo, il midollo osseo e le tonsille.

Il recettori CB1 appartengono alla superfamiglia di recettori transmembrana a sette domini, sono accoppiati a proteine G di tipo inibitorio (Gi/o) e traducono il segnale agendo su diversi effettori intracellulari. In particolare i cannabinoidi inibiscono l'adenilato ciclasi, i canali del calcio di tipo N e P/Q (101,101) e attivano i canali del potassio del tipo "inward rectifier", inoltre stimolano la via delle MAP Kinasi.

Nel sistema nervoso centrale i CB1 sono prevalentemente presinaptici, suggerendo un ruolo generalmente inibitorio nella modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori come il glutammato, il GABA, l'acetilcolina, la noradrenalina (103) (fig. 11).

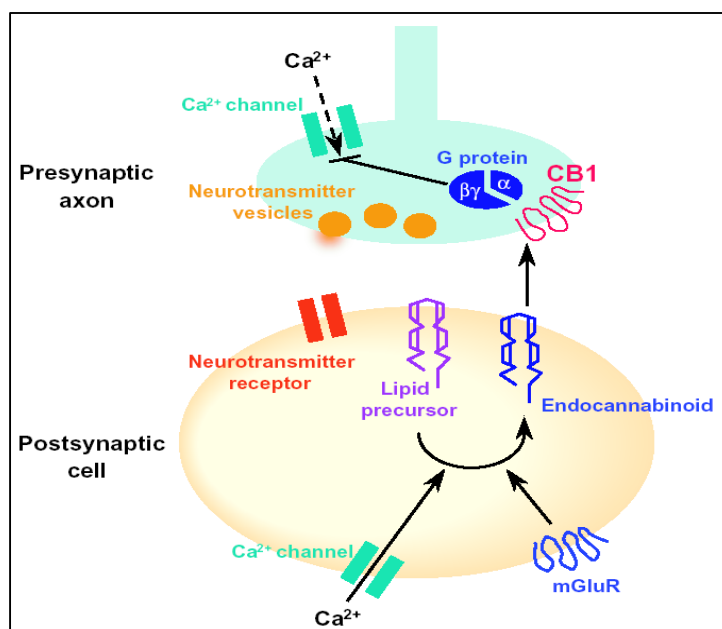


Fig. 11 Meccanismo d'azione degli endocannabinoidi nel S.N.C.

In particolare, si è visto che il meccanismo d'azione degli endocannabinoidi a livello sinaptico è del tutto peculiare, in quanto essi, dopo essersi rilasciati da una terminazione postsinaptica, vanno ad agire in senso retrogrado su una terminazione presinaptica, attivando in questa sede il recettore CB1 e determinando, come ultimo risultato, il blocco transitorio del rilascio ad esempio di GABA o glutammato.

Il recettore CB2 possiede un'omologia del 48% con il recettore CB1 ed è principalmente localizzato nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti. Anche il CB2 traduce il segnale mediante G proteine, ma conosce effettori solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1.

In particolare il recettore periferico non è in grado di modulare i canali ionici, mentre come il recettore centrale, è negativamente accoppiato all'adenilato ciclasi ed è in grado di attivare le MAP kinasi (104).

1.2.3 Ligandi per i recettori cannabinoidi

Alla scoperta del recettore CB1, nel 1990, ha fatto immediato seguito, nel 1992, l'isolamento da estratti di cervello suino, di una sostanza lipidica, l'N-arachidoniletanolamina chiamata *anandamide* (dal sanscrito *ananda* per serenità interiore) che lega i recettori cannabinoidi CB1 e induce gli effetti farmacologici del THC (105). L'*anandamide* è il primo di una serie di cinque agonisti endogeni dei recettori cannabinoidi presenti nel cervello ed in altri tessuti, quali le etanolamidi dell'acido omo-gamma-linoleico e docosatetraenolico, rispettivamente, il 2-*arachidonilglicerolo* e il *noladinetere* (106,107,108).

L'*anandamide* (AEA) è ampiamente distribuita sia a livello cerebrale che periferico.

All'interno del cervello, i livelli di AEA, equivalenti a quelli di dopamina e della serotonina, ben si correlano con la distribuzione del recettore CB1. Diversi saggi sia di tipo recettoriale che di tipo biochimico hanno evidenziato che l'AEA lega sia il recettore CB1 che il CB2, anche se quest'ultimo con un'affinità più bassa. Studi recenti, infine, dimostrano che l'AEA è anche in grado di agire come agonista puro per i recettori vanilloidi VR₁ come ipotizzato in seguito all'osservazione che, topi knock-out per il gene del recettore CB₁, presentino effetti cannabinoido-simili (109).

Il recettore VR₁ è una proteina che genera nella membrana un canale non selettivo per cationi. In condizioni di riposo tale canale è chiuso, quando attivato (stato aperto) permette l'ingresso di cationi, soprattutto calcio. Questi recettori sono espressi da una selezione di neuroni bipolari dei gangli delle corna dorsali midollari e mediano la risposta agli stimoli nocicettivi indotti dal calore, dai protoni, nonché dall'anandamide e da altri metaboliti degli acidi grassi, prodotti negli stati di infiammazione.

L'AEA conosce una doppia via biosintetica (110): una mediata da una N-aciltransferasi e una fosfodiesterasi e l'altra consistente nella condensazione dell'acido arachidonico con l'etanolamina. La maggior parte di AEA presente nei tessuti deriva dalla via biosintetica che inizia dall'idrolisi di un precursore fosfolipidico, l'N-arachidonil fosfatidil etanolamina (PE), catalizzata da una fosfolipasi D (PLD) in seguito ad un rialzo dei livelli di ioni calcio intracellulari e/o all'attivazione di particolari recettori (esempio D₂). Il PE, a sua volta, viene prodotto dalla N-trans-acilazione della fosfatidiletanolamina (fig. 12).

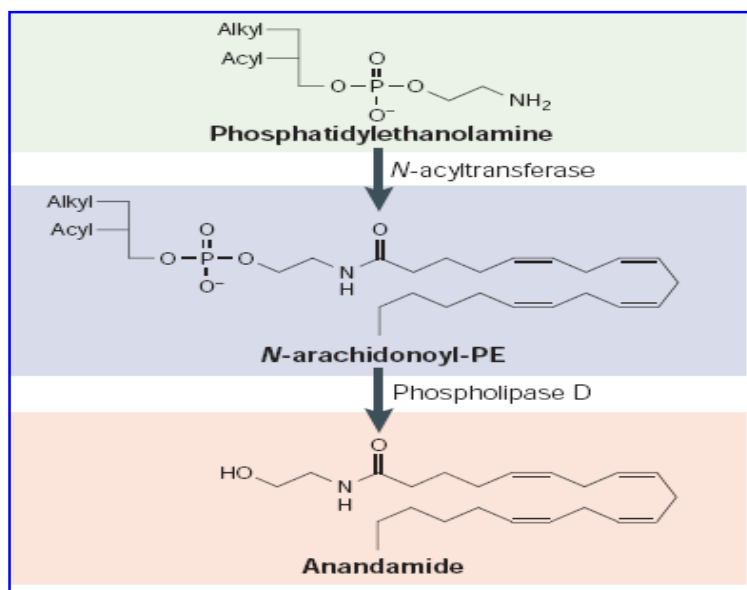


Fig. 12 Meccanismo di sintesi dell'anandamide nei neuroni.

Nella seconda via, la reazione biosintetica è catalizzata da una specifica amide idrolasi, la FAAH, che è un'enzima di membrana, abbondante in tutto il cervello, con una buona correlazione con la distribuzione del recettore CB1. Quando i livelli di acido arachidonico ed etanolamina sono molto elevati, la FAAH è in grado di lavorare all'inverso e dare origine all'AEA. Questo evento è poco probabile all'interno della cellula e quindi di basso significato fisiologico, e limita molto la portata di questa seconda via biosintetica. L'AEA viene idrolizzata nei tessuti e nelle cellule attraverso l'azione della FAAH che la degrada ad acido arachidonico ed etanolamina.

Anche per il 2-arachidonil glicerolo (2-AG), secondo agonista cannabinoide endogeno scoperto, esistono due possibili cammini sintetici.

In una prima via metabolica, predominante a livello neuronale, l'idrolisi dei fosfolipidi di membrana ad opera della fosfolipasi C (PLC) produce 1,2-diacilglicerolo (1,2-

DAG) che viene successivamente convertito a 2-AG attraverso una diacilglicerolo lipasi (DGL); alternativamente, la fosfolipasi A₁ (PLA₁) può generare un lisofosfolipide (liso-PI) che può essere idrolizzato a 2-AG da una liso-PLC (fig.13). A livello neuronale la biosintesi di 2-AG sembra essere attivata da elevati livelli intracellulari di calcio. Sebbene l'idrolisi del 2-AG possa essere catalizzata anche dalla FAAH, lo stesso enzima che degrada l'AEA, recenti lavori sembrano dimostrare il coinvolgimento di una monogliceride lipasi (MGL), una serina idrolasi citosolica che converte i monogliceridi in acido grasso e glicerolo.

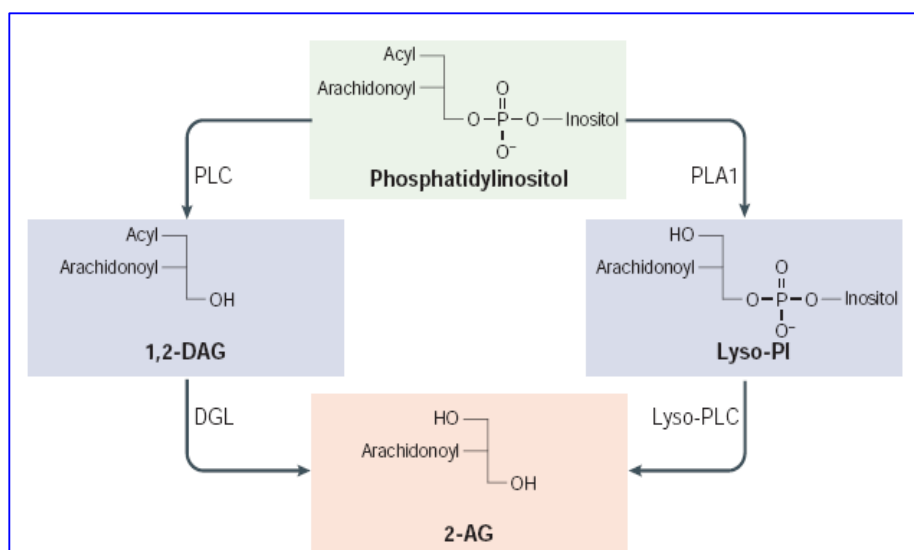


Fig. 13 Sintesi del 2-acilglicerolo nei neuroni.

Sia l'AEA che il 2-AG vengono prodotti e rilasciati dai neuroni attraverso un meccanismo che non prevede l'accumulo e la secrezione mediata da vescicole sinaptiche. Essi verrebbero prodotti direttamente nel plasmalemma da cui diffonderebbero passivamente e/o attraverso la facilitazione di alcune specifiche proteine leganti i lipidi, nel mezzo extracellulare.

L'esistenza di diversi cammini biosintetici per l'AEA e il 2-AG suggerisce un'azione indipendente dei due endocannabinoidi. La fine dell'effetto di questi due mediatori lipidici avverrebbe attraverso il classico meccanismo di reuptake mediato da un trasportatore.

L'attuale conoscenza della struttura primaria delle proteine recettoriali ha permesso nell'ultimo decennio lo sviluppo di numerosi composti agonisti per i due recettori cannabici a partire da modifiche strutturali nella molecola di THC.

Gli agonisti cannabici vengono suddivisi in quattro gruppi in accordo con la loro struttura chimica. Il primo gruppo è costituito dai derivati benzopiranic, tra cui ritroviamo i costituenti naturali della cannabis, quali il Δ^9 -THC, il Δ^8 -THC, il cannabinolo ed il costituente non psicoattivo cannabidiolo, nonché alcuni agonisti selettivi per il recettore CB₂ quali il JWH133 e l'HU308. Il secondo gruppo comprende i composti biciclici il cui principale esponente è il CP-55940. Al terzo gruppo appartengono gli aminoalchilindoli, rappresentati dal WIN-55212-2 e dal JWH015 selettivo per il recettore CB₂. Il quarto gruppo, infine, comprende i ligandi endogeni identificati nel 1992 da estratti di cervello porcino che comprendono amidi ed esteri degli acidi grassi.

La ricerca nel campo dei cannabinoidi è progredita ulteriormente grazie alla sintesi di composti antagonisti selettivi per i due tipi di recettori cannabinoidi CB₁ e CB₂. Il primo composto disponibile è stato l'SR141716A (fig. 14), sintetizzato da Rinaldi-Carmona e collaboratori nel 1994 (111), è un antagonista ad alta affinità per il recettore centrale CB₁ ($K_i = 1,98 \pm 0,13$ nM) e possiede bassissima affinità per il recettore CB₂.

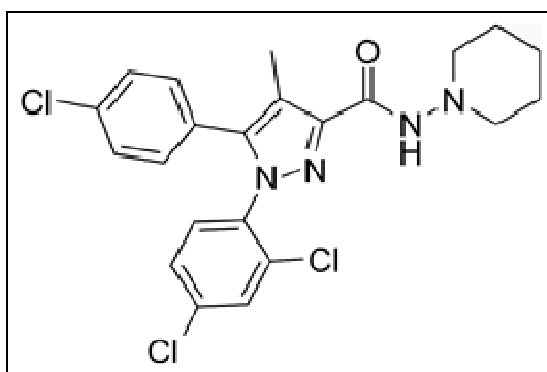
L'antagonismo dell'effetto antinocicettivo dei cannabinoidi a livello centrale dovuto alla somministrazione dell'SR141716A è vario, ad esempio, blocca l'ipotermia indotta dal Δ^9 -THC ma non quella indotta dall'anandamide. Questo comportamento suggerisce una maggiore efficacia di SR141716A a livello sopraspinale piuttosto che a livello spinale, oppure una diversità di interazione dei cannabinoidi con i recettori CB1, o addirittura la presenza di sottotipi recettoriali CB1 (103).

Nei test comportamentali, il composto SR141716A antagonizza pienamente i classici effetti indotti dai cannabinoidi, ma alcuni studi riportano una sua capacità di indurre effetti opposti a quelli degli agonisti cannabinoidi, suggerendo un comportamento da agonista inverso (112).

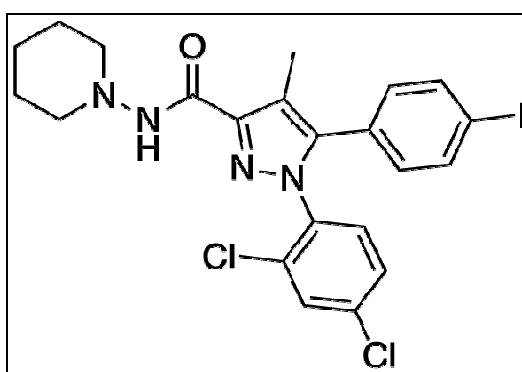
Altro antagonista CB1 è il composto AM251 (112) (fig. 14), è un analogo strutturale del rimonabant, in posizione quattro dell'anello pirazolico ha il sostituito iodiofenile al posto del clorofenile. Esso possiede un'affinità per tale recettore circa tre volte inferiore al rimonabant ($K_i = 7,5$ nM). Anche l'AM251 sembra avere effetti opposti a quelli degli agonisti cannabinoidi: induce nel ratto riduzione del consumo di cibo, inibizione dell'attività della proteina G basale nelle membrane di cervelletto, aumento del rilascio di glutammato nel cervelletto, aumento del rilascio di GABA nell'ippocampo, incremento delle correnti di Ca^{2+} e diminuzione di quelle di K^+ nella linea cellulare HEK 293 (112).

Recentemente, Carmona-Rinaldi e coll. hanno sintetizzato un altro potente e selettivo antagonista CB1, l'SR147778, che reca il bromo in para sull'anello fenolico in posizione 5. Esso possiede $K_i = 3,5$ nM per il recettore CB1 umano e $K_i = 0,56$ nM per

il recettore CB1 di ratto; mentre mostra bassissima affinità per il recettore CB2, sia umano che di ratto ($K_i = 400$ nM). Anche questo composto è attivo per via orale (111). L'SR144528, invece, è un antagonista selettivo del recettore CB2 (con $K_i = 0,60 \pm 0,13$ nM e un'affinità circa 700 volte minore per il recettore CB1). Recentemente ha mostrato attività da agonista inverso verso tale recettore ed anche esso è attivo per via orale (110).



SR141716A



AM251

Fig.14 Struttura degli antagonisti CB1 SR141716A e AM251.

1.2.4 Effetti farmacologici dei cannabinoidi

La maggior parte degli effetti dei cannabinoidi è a livello del sistema nervoso centrale, anche se non vanno dimenticati gli effetti a livello dei sistemi immunitario e cardiovascolare e quelli sulla proliferazione cellulare.

La somministrazione sistemica sia di Δ^9 -THC che dei composti sintetici produce una intensa e persistente analgesia in una varietà di modelli animali di dolore acuto ed infiammatorio attraverso meccanismi che coinvolgono recettori CB1 e/o recettori CB2-like a livello sovraspinale, spinale o periferico.

Il Δ^9 -THC mostra nei modelli di dolore acuto, un'efficacia antinocicettiva, sia per via orale, che per via sistemica, intracerebroventricolare o spinale. Nei modelli di dolore cronico i cannabinoidi mostrano una maggiore efficacia antinocicettiva quando gli stimoli vengono applicati su tessuti resi infiammati o iperalgici. Su tali tessuti l'effetto desiderato può essere ottenuto con dosaggi inferiori a quelli di tessuti sani. I cannabinoidi modulano l'attività dei neuroni nocicettivi interagendo con i recettori CB1 (113) e ciò è dimostrato dalle seguenti evidenze (114): la potenza antinocicettiva non è inferiore a quella della morfina; esiste una relazione graduale tra la dose di cannabinoide ed il livello di antinocicezione; la potenza antinocicettiva degli agonisti per i recettori dei cannabinoidi è correlata con la struttura; la potenza antinocicettiva dei cannabinoidi somministrati per via spinale si correla negativamente con la loro liposolubilità; gli enantiomeri dei cannabinoidi dotati di un centro chirale mostrano un'elevata stereoselettività; i cannabinoidi inducono antinocicezione quando iniettati direttamente nelle zone del cervello dove sono concentrati i recettori CB1; l'antagonista selettivo per il recettore CB1, SR141716A, previene gli effetti antinocicettivi degli agonisti per i recettori dei cannabinoidi; le sequenze antisense rivolte ai recettori CB1 riducono gli effetti antinocicettivi dei cannabinoidi; la risposta antinocicettiva al Δ^9 -THC risulta assente o marcatamente attenuata nei topi knock-out per il gene che codifica per il recettore CB1; l'antinocicezione indotta dai cannabinoidi può essere annullata dalla tossina della pertosse e da altri agenti che compromettono la funzionalità del recettore CB1. L'antinocicezione indotta dall'attivazione dei CB1 può essere dovuta in parte all'inibizione diretta del rilascio di GABA nel grigio peracquiduttale e nel midollo (115). Questa ipotesi è basata sul riscontro che i

cannabinoidi agiscono sui recettori CB1 localizzati in tali aree per inibire il rilascio di GABA. In parte l'antinocicezione può essere correlata all'inibizione del rilascio di glutammato, infatti, l'iperalgia, indotta dall' SR141716A (CB1 antagonista), può essere attenuata dalla contemporanea somministrazione di antagonisti del recettore NMDA (116).

Nonostante l'abbondanza di studi sperimentali, gli studi a livello umano sono ancora pochi e contraddittori, ma sembrano indicare che il Δ^9 -THC produce un'analgia comparabile a quella indotta dalla codeina, ma di più lunga durata, in pazienti con dolore post-operatorio o associato al cancro, a lesioni del midollo spinale o del trattamento gastrointestinale. Va però sottolineato la presenza di effetti collaterali quali difficoltà di linguaggio, sedazione, confusione ed atassia.

L'alta densità del recettore CB1 nei gangli della base e nel cervelletto depone a favore di un loro coinvolgimento nel controllo psicomotorio. Nei roditori i cannabinoidi sembrano dimostrare un effetto trifasico: dosi molto basse di Δ^9 -THC decrementano l'attività locomotoria, dosi intermedie stimolano la locomozione, mentre dosi più alte inducono catalessia. Nell'uomo la cannabis peggiora le prestazioni nei test di equilibrio ed in quelli che richiedono un fine controllo psicomotorio. Il meccanismo d'azione risiederebbe nella inibizione, da parte dei cannabinoidi, del release di GABA e glutammato a livello delle giunzioni presinaptiche presenti nei gangli della base e del cervelletto. Questo effetto potrebbe avere dei risvolti terapeutici in quelle patologie caratterizzate da spasmi muscolari, come la sclerosi multipla. Studi clinici controllati sono infatti in corso sul possibile uso terapeutico dei composti cannabinici nella sclerosi multipla. Studi sperimentali dimostrano che sia il Δ^9 -THC che i composti sintetici che

l'AEA, causano deficit nella memoria a breve termine in test di apprendimento spaziale che sono antagonizzati dall'SR141716A. Tale effetto trova perfetto riscontro anche nell'uomo, soprattutto nei test che richiedono una forte attenzione. Il meccanismo molecolare di tale azione potrebbe risiedere nell'attivazione dei recettori CB₁ nell'ippocampo, con conseguente riduzione del rilascio di glutammato ed inibizione dell'LTP (Long Term Potentiation) e dell'LTD (Long Term Depression). Dati sperimentali indicano che la stimolazione del recettore CB₁ provoca un aumento dell'assunzione di cibo e di peso negli animali e questo effetto è antagonizzato dall'SR141716A. Anche nell'uomo esiste una significativa correlazione tra uso di cannabis e stimolazione dell'appetito e l'utilizzo del Δ^9 -THC nel deperimento da AIDS è uno delle poche indicazioni mediche ufficialmente approvate in USA per questa sostanza.

La capacità dell'AEA di aumentare l'ingestione di cibo nei ratti ha suggerito che il sistema cannabinoide endogeno abbia un ruolo importante nella regolazione dell'appetito. A sostegno di questa ipotesi, l'SR141716A, noto anche come rimonabant, riduce l'ingestione di cibo ed è ora giunto in fase clinica III come farmaco contro l'obesità.

L'abilità del Δ^9 -THC e dei cannabinoidi sintetici di controllare la nausea ed il vomito associato con la chemioterapia è un'altra applicazione medica per il Δ^9 -THC approvata negli USA, sebbene la stretta finestra terapeutica tra la dose antiemetica e quella che dà effetti psichici ne renda difficoltoso l'uso.

Per quanto riguarda la neurotossicità, studi sperimentali sul Δ^9 -THC hanno dato risultati contrastanti, evidenziando un danno neuronale a livello ippocampale

caratterizzato da una ridotta densità sinaptica o addirittura un apparente incremento nella lunghezza dei dendriti e nella densità delle cellule granulari. Trattamenti molto forti nelle scimmie non hanno rilevato nessun danno istopatologico nel setto e nell'ippocampo degli animali trattati.

Nell'uomo non ci sono studi convincenti che dimostrino la presenza di alterazioni neuropatologiche nei cervelli di fumatori di cannabis anche quando l'analisi è stata condotta con tecniche di neuroimaging.

La situazione appare ancora più confusa se si considera che dati recenti suggeriscono che i cannabinoidi possono avere un effetto neuroprotettivo quando testati in modelli sperimentali di ischemia: questa proprietà sembra condivisa anche dal cannabidiolo, un cannabinoide non psicoattivo. Secondo questi studi l'attività di neuroprotezione è legata all'attività anti-ossidativa e riduttiva dei cannabinoidi, in grado di donare elettroni proteggendo così importanti strutture nervose, più che alla capacità di diminuire il rilascio di glutammato a livello presinaptico (117,118).

I cannabinoidi hanno effetti anche su altri sistemi:

Sistema immunitario: i cannabinoidi possono essere considerati degli immunomodulatori. Essi manifestano delle azioni piuttosto complesse su quasi ogni tipo cellulare presente nel sistema immunitario, con un effetto finale generalmente inibitorio sui diversi parametri della risposta immunitaria. L'effetto immunosoppressivo, comunque, sembra essere mediato solo parzialmente dai recettori cannabinoidi CB1 e CB2.

Sistema cardiovascolare: i cannabinoidi riducono l'aggregazione piastrinica e, producendo vasodilatazione periferica, inducono anche tachicardia ed ipotensione

ortostatica. L'effetto vasodilatatorio sembra essere mediato dal recettore CB₁ presente a livello endoteliale.

Sistema gastrointestinale: i cannabinoidi riducono la motilità intestinale attraverso l'inibizione del release di acetilcolina dalle terminazioni nervose del sistema nervoso autonomo.

Effetto antiproliferativo: i cannabinoidi presentano effetti antiproliferativi dose-dipendenti in alcune linee cellulari tumorali, direttamente ascrivibili alla stimolazione del recettore CB₁ e/o CB₂. In alcuni casi i cannabinoidi si sono dimostrati efficaci anche in vivo nel ridurre la crescita tumorale in topi immunodeficienti iniettati con cellule tumorali. Spesso il livello di recettori cannabinoidi è più elevato nel tessuto tumorale rispetto al corrispondente tessuto sano e la malignità del tumore può essere correlata con il livello di espressione di tali recettori. Questa osservazione suggerisce un ruolo importante del sistema cannabinoide endogeno nel controllo della proliferazione, aprendo in tal modo la strada allo sviluppo di farmaci antineoplastici in grado di modulare l'attività di tale sistema (110).

Per quanto riguarda il possibile sviluppo di dipendenza e rischio di abuso legato all'assunzione di cannabinoidi, nell'ultimo decennio sono stati messi a punto numerosi modelli animali che, pur con le limitazioni legate all'uso di dosi generalmente elevate e a vie di somministrazione diverse dal fumo, hanno fornito importanti informazioni. La presenza di tolleranza, astinenza e dipendenza psicologica nei vari tests condotti su animali da laboratorio indica una stretta similarità tra cannabinoidi ed altre sostanze d'abuso. Le basi neurochimiche della dipendenza ai cannabinoidi sono paragonabili a quelle di altre farmaci d'abuso ed implicano l'attivazione dei circuiti dopaminergici

della gratificazione. Al contrario nell'uomo la situazione appare confusa, con testimonianze discrepanti per quanto riguarda la presenza di tolleranza e dipendenza sia psichica che fisica. Dati recenti scientificamente più corretti indicano che circa il 10% dei consumatori di cannabis diventa dipendente ed esiste una ben identificata sindrome astinenziale quando si sospende l'uso della droga (110).

1.2.5 Correlazione tra sistema cannabinoide e sistema oppioide

Oppioidi e cannabinoidi appartengono a due diversi gruppi di sostanze psicoattive, condividono un simile profilo farmacologico: inducono analgesia, ipotermia, ipotensione, immunosoppressione, riduzione dell'attività locomotoria, sedazione e reward (119,120).

A livello cellulare attivano due differenti recettori CB1 e CB2 accoppiati a proteine G di tipo inibitorio, sono localizzati prevalentemente a livello presinaptico e la loro attivazione causa l'inibizione del rilascio di diversi neurotrasmettitori (121).

Studi anatomici hanno dimostrato una simile distribuzione dei recettori CB1 e dei recettori μ nelle corna dorsali del midollo spinale (122) e in diverse strutture del S.N.C.

I primi studi relativi all'effetto analgesico del Δ^9 -THC hanno dimostrato che induceva un grado di analgesia comparabile a quella indotta dall'oppiaceo codeina, presentando però una serie di effetti collaterali tra cui la disforia (123, 124).

La prima evidenza che l'effetto antinocicettivo del Δ^9 -THC potesse essere separato dagli effetti collaterali fu dimostrato nel 1994 quando Smith e collaboratori rilevarono che la nor-binaltorfimina, un antagonista dei recettori oppioidi κ , somministrata in

roditori, bloccava unicamente l'effetto antinocicettivo del Δ^9 -THC senza indurre variazioni su altri effetti come l'ipotermia o l'ipoattività motoria (97).

Gli oppiacei sono i farmaci di elezione per la terapia analgesica, ma il loro uso è accompagnato da una serie di effetti collaterali, così, per migliorare le terapie antidolorifiche, sono state condotte una serie di ricerche che hanno portato alla dimostrazione che, in modelli animali di dolore, il Δ^9 -THC aumenta la potenza analgesica di oppioidi come la morfina.

L'aumento della potenza analgesica della morfina, indotta dai cannabinoidi non è univoca; alcuni studi hanno infatti dimostrato l'esistenza di due tipi di interazione fra il sistema cannabinoide e quello oppioide, una spinale ed una sovrspinale. Alcuni cannabinoidi infatti aumentano la potenza analgesica della morfina a livello cerebrale, altri principalmente a livello spinale, come evidenziato confrontando dati ottenuti da somministrazioni intratecali ed intracerebroventricolari nei ratti (125). In particolare il Δ^9 -THC sembra mediare gli effetti della morfina a livello spinale. Il Δ^9 -THC, somministrato per via intratecale, porta ad un aumento del release di oppioidi endogeni che stimolano i recettori δ e κ (126,127). Si pensa che gli effetti sinergici del Δ^9 -THC e della morfina derivino da un'iniziale rilascio di dinorfina A e alla formazione di leu-enkefalina (128,129). La correlazione temporale tra effetto antinocicettivo del Δ^9 -THC e aumento dei livelli di dinorfina A ha suggerito che tale effetto sia dovuto all'interazione di tali peptidi oppioidi endogeni con i recettori δ e κ (128,129). E' stato dimostrato infatti che il trattamento con Δ^9 -THC, protratto per cinque giorni, porta ad un aumento dell'espressione genica sia della pro-enkefalina che di prodinorfina nel midollo spinale di ratto (130), ciò è confermato anche da studi condotti su animali

knock-out per il gene della prodinorfina, in cui si dimostra una riduzione dell'analgesia indotta dal Δ^9 -THC (111).

Ad avvalorare l'ipotesi dell'interazione tra oppioidi e cannabinoidi si aggiungono anche i dati ottenuti da studi relativi agli antagonisti per il recettore CB₁ e per il recettore μ .

L'SR1417A, antagonista selettivo per il recettore CB₁, è in grado di bloccare l'aumentato effetto analgesico, ottenuto somministrando basse dosi di Δ^9 -THC e basse dosi di morfina. Allo stesso modo il naloxone, antagonista per il recettore μ , blocca il sinergico effetto analgesico prodotto da Δ^9 -THC e morfina o codeina, indicando in tal modo anche un coinvolgimento del recettore μ (132, 133).

I recettori oppioidi e cannabinoidi, infine, sono analogamente distribuiti nelle corna dorsali del midollo spinale e in aree cerebrali definite, deputate al controllo delle risposte nocicettive quali il grigio peracquaduttale, i nuclei talamici del rafe e centro-mediale.

Sulla base di queste evidenze emerge quindi l'ipotesi a favore di un cross-talk tra il sistema oppioide e quello cannabinoide. Tale sinergismo potrebbe rappresentare un punto di partenza per un eventuale impiego del Δ^9 -THC nella terapia analgesica. Basse dosi di Δ^9 -THC, infatti, potrebbero essere somministrate insieme ad oppiacei come la morfina, senza portare ad un aumento degli effetti collaterali, allo sviluppo di tolleranza e di dolore morfino-resistente che sono osservabili, invece, nella pratica clinica (134).

1.3 Sistema nocicettina/NOP e oppiacei

1.3.1 Sistema oppioidi

I farmaci oppiacei rappresentano oggi il più potente strumento per la terapia del dolore ed esplicano la loro efficacia terapeutica mimando le azioni dei peptidi oppioidi endogeni, ligandi naturali dei recettori oppioidi.

I tre recettori oppioidi μ , δ e kappa furono clonati nel biennio 1992-1993 (1,2,3,4), la nomenclatura ufficiale più recente riporta la denominazione MOP (μ), KOP (k) e DOP (δ). Dal punto di vista strutturale i peptidi oppioidi sono brevi sequenze di amminoacidi che svolgono funzioni di neurotrasmissione, di modulazione nei confronti dei trasmettitori classici o si comportano come neuro-ormoni. Essi rappresentano i ligandi naturali endogeni per i recettori oppioidi.

Tutti i peptidi oppioidi classici appartengono a tre famiglie: le enkefaline, le endorfine e le dinorfine ognuna delle quali deriva rispettivamente dalla proenkefalina, dalla proopiomelanocortina e dalla prodinorfina, codificato da un corrispondente gene.

Tutti i recettori oppioidi appartengono ai recettori di membrana a sette domini (fig. 15), accoppiati a proteine G di tipo inibitorio e la loro attivazione inibisce la produzione di cAMP da parte dell'adenilato ciclasi, causa l'apertura dei canali del potassio e l'inibizione di quelli del calcio.

Il secondo messaggero è rappresentato dalla molecola di cAMP che può attivare delle proteine chinasi (effetto a breve termine) o la trascrizione di alcune proteine o di alcuni geni target (effetti a lungo termine) (fig. 16).

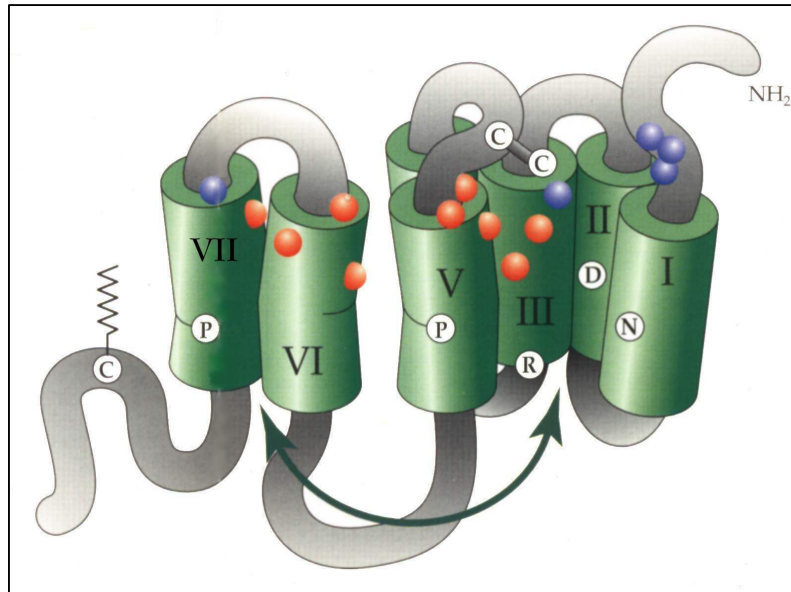


Fig. 15 struttura dei recettori oppioidi.

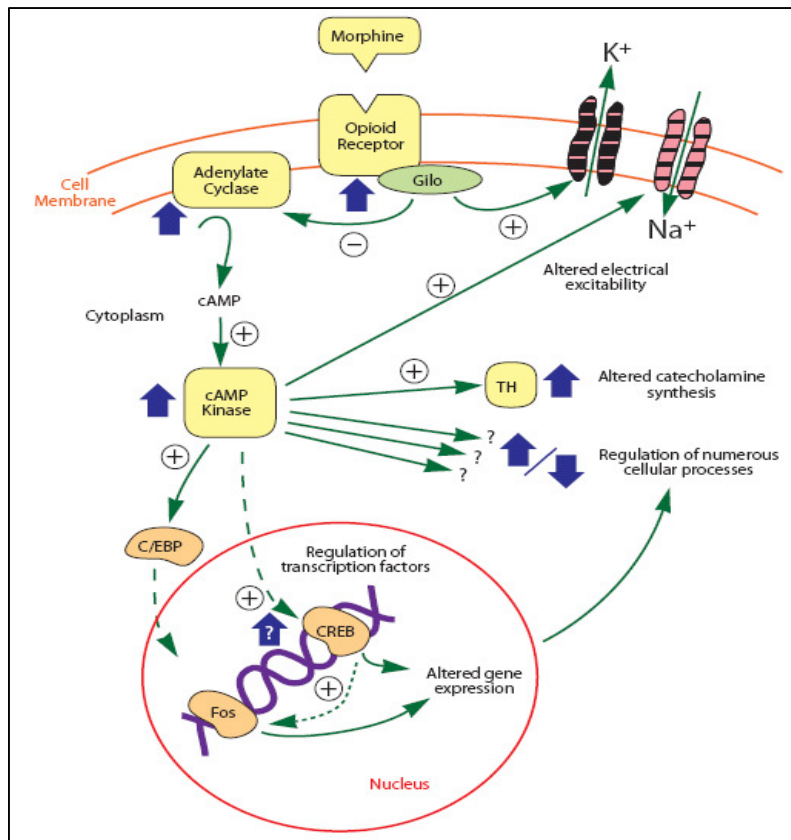


Fig.16 Traduzione del segnale mediata dalla molecola di cAMP.

I recettori oppioidi presenti sui terminali presinaptici delle fibre nocicettive di tipo C e A δ , quando vengono attivati da un agonista oppioide, inibiscono indirettamente i canali del calcio voltaggio dipendenti, diminuendo i livelli di cAMP e bloccando il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori dalle fibre nocicettive (ad esempio glutammato, sostanza P) che si traduce in analgesia. (fig 17).

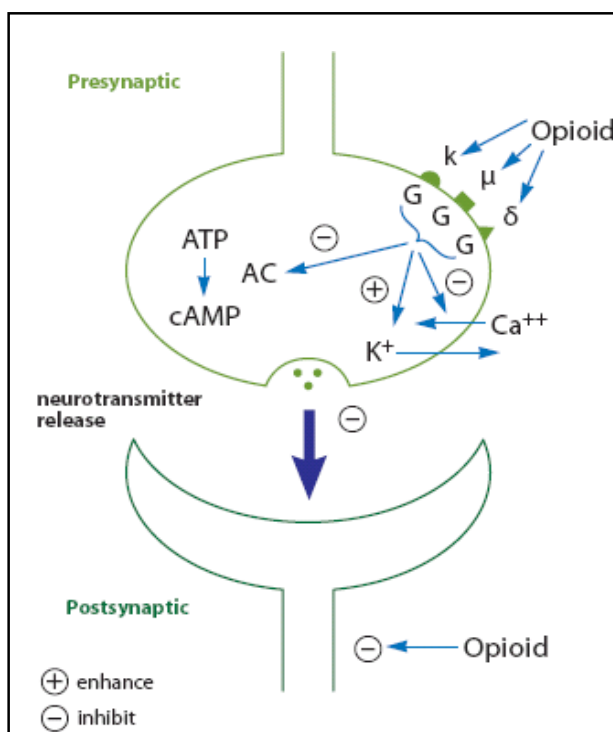


Fig. 17 meccanismo d'azione degli oppioidi

1.3.2 Analgesici oppiacei: morfina e fentanil

La morfina (da Morfeo, dio greco del sonno) è il prototipo di tutti gli analgesici narcotici (fig.18). Viene estratta dall'oppio, che si ottiene per essiccamento del lattice fatto fluire dalle capsule immature di *Papaver Somniferum* (fig.18), pianta coltivata principalmente nelle regioni dell'Estremo Oriente, Asia Minore, Egitto e Balcani. L'oppio contiene più di venti alcaloidi diversi, suddivisi in due gruppi.

- 1) derivati del fenantrene, come la morfina (contenuto medio del 10% circa), la codeina e la tebaina;
- 2) derivati della benzilisoquinolina, come la papaverina, la noscapina e la narceina.

Solo gli alcaloidi del primo gruppo sono analgesici, ma anche quelli del secondo gruppo come la papaverina trovano applicazioni terapeutiche.

Chimicamente la morfina è un derivato del fenantrene condensato con un anello piperidinico; un ponte epossidico collega gli atomi di carbonio 4 e 5 del fenantrene mentre due ossidrili, uno fenolico e uno alcolico, sono in posizione rispettivamente 3 e 6 della molecola.

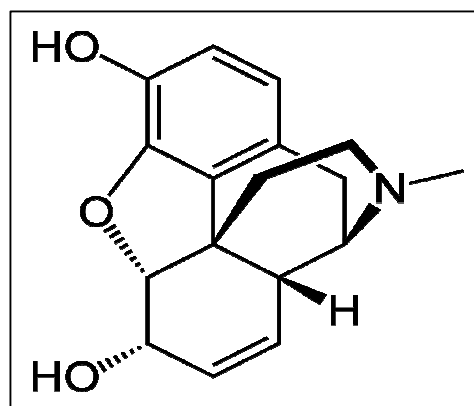


Fig. 18 Papaver Somniferum e struttura chimica della morfina.

La morfina è uno degli analgesici agonisti del recettore μ più efficaci per la terapia del dolore nei pazienti oncologici e per la terapia palliativa (75,135). La morfina, come

tutti gli oppiacei, induce depressione respiratoria per inibizione diretta dei centri bulbopontini della respirazione, tanto che la morte in caso di sovradosaggio sopravviene per depressione respiratoria. La morfina deprime l'attività respiratoria entro mezz'ora dalla somministrazione intramuscolare di una dose analgesica ed occorrono più di due ore per la ripresa di una funzionalità respiratoria normale.

L'azione antitussiva si esercita per intervento diretto sui centri bulbari che modulano il riflesso della tosse.

La morfina e gli oppiacei in genere hanno un effetto emetico, come risultato di una stimolazione diretta della zona bulbare chemiosensibile che a sua volta stimola il centro del vomito.

La morfina esercita sulla pupilla un effetto di costrizione che è dose-dipendente. La miosi sembra essere dovuta ad un effetto indiretto sui nuclei mesencefalici che controllano l'innervazione parasimpatica della pupilla e, contemporaneamente, ad un effetto diretto su recettori dell'iride.

A livello gastrointestinale la morfina ed i suoi analoghi determinano costipazione conseguente ad un aumento del tono muscolare e ad una diminuzione del normale riflesso di defecazione.

Il comune riferimento dell'innalzamento del tono dell'umore, indicato come euforia, da parte degli oppiacei si riscontra in realtà solo in una percentuale molto bassa degli individui che non siano dipendenti da oppiacei, i quali lamentano molto più frequentemente una disforia. È opportuno ricordare che molti pazienti dopo somministrazione di morfina dichiarano di avvertire ancora dolore, ma di riuscire a sopportarlo molto meglio. Dal punto di vista neurochimico la possibilità di

modificazione delle risposte soggettive agli oppiacei, è data dall'elevata concentrazione dei peptidi oppioidi e dei loro recettori a livello del sistema limbico, area cerebrale particolarmente coinvolta nelle reazioni di tipo emozionale.

La via di somministrazione più frequente è la via parenterale, l'assorbimento per via orale è modesto. Il rapporto di dose intramuscolare/dose orale per avere il medesimo effetto è 1:6.

È stata proposta la somministrazione intratecale ed epidurale dopo la scoperta dei recettori oppioidi a livello spinale, però queste tecniche di somministrazione facilitano l'assorbimento del farmaco da parte del sistema nervoso e la sua diffusione nel liquido cerebrospinale.

La somministrazione spinale è riservata al paziente neoplastico in fase terminale, con dolore difficilmente controllabile, attuata eventualmente mediante uso di un catetere permanente.

La biotrasformazione della morfina avviene a livello epatico e consiste fondamentalmente in una glucuronoconiugazione, un processo che aumenta la sua solubilità e ne favorisce l'escrezione renale (135).

Il fentanil, sintetizzato in Belgio alla fine degli anni cinquanta, fu immesso in commercio il decennio successivo e utilizzato nella pratica anestetica. L'uso illecito del fentanil apparve intorno alla metà degli anni 70 e si è oggi sviluppato un vero e proprio traffico illegale dei suoi derivati. Gli effetti del fentanil sono indistinguibili da quelli dell'eroina, con l'eccezione che esso può essere centinaia di volte più potente e che, comunemente viene somministrato per via endovenosa ma, come l'eroina, può essere anche fumato o aspirato.

Questo potente oppiaceo di sintesi ha un'azione analgesica circa 100 volte maggiore rispetto a quella della morfina, si è osservato che una dose di 100 microgrammi esercita un'azione analgesica paragonabile a quella di 10 milligrammi di morfina.

Il fentanil (N-fenil-N-[1-(2-fenilettil)-4-piperidinyl]propanamide) (fig. 19) è stato sintetizzato a partire dalla morfina ed appartiene alla classe delle fenilpiperidine.

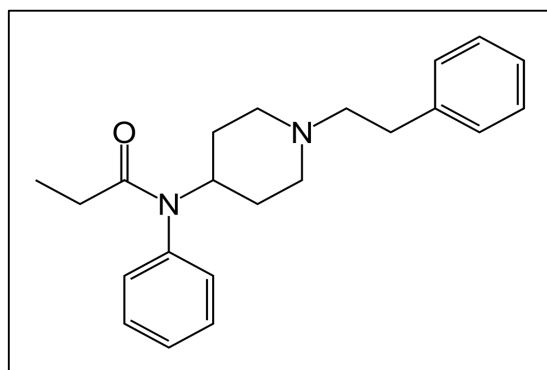


Fig. 19 Struttura chimica del fentanil.

La novità strutturale è la presenza di un atomo di azoto terziario ammidico, quindi non basico, al posto del C quaternario corrispondente al C-13 della morfina. Si noti che sull'azoto basico compreso nell'anello piperidinico è legato il radicale feniletilico che già in altre serie di morfinosimili aveva portato a notevole incremento di attività per la sua stretta somiglianza con il residuo della fenilalanina presente nelle endomorfine. Allo stesso gruppo del fentanil appartengono: il sufentanil e l'alfentanil, che hanno attività più bassa, induzione più veloce e durata d'azione più breve (fentanil >> sufentanil > alfentanil), queste caratteristiche ne permettono la scelta in funzione della durata dell'intervento quando usati come anestetici.

Il fentanil produce i suoi effetti molto rapidamente dopo somministrazione endovenosa o intramuscolare (3-5 minuti) ed è caratterizzato, in virtù della spiccata liposolubilità,

da una breve durata d'azione, compresa tra i 5 ed i 20 minuti, in relazione alla dose. Si lega in elevata percentuale alle proteine plasmatiche e subisce una significativa ridistribuzione tissutale; da ciò si evince che la velocità di eliminazione del farmaco è piuttosto variabile. Viene metabolizzato a livello epatico mediante reazioni di dealchilazione ed idrossilazione, ed i suoi metaboliti sono escreti prevalentemente con le urine. L'emivita di eliminazione è di 2-4 ore. Tuttavia, la completa eliminazione è relativamente lunga ed aumenta in maniera esponenziale dopo una o due ore di infusione continua; ciò suggerisce che i dosaggi dovrebbero essere ridotti trascorse due ore di infusione.

L'elevata attività del fentanil anche a dosaggi molto bassi ha permesso la sua somministrazione attraverso cerotti transdermici o "STICK" da sciogliere in bocca, andando così notevolmente a migliorare la compliance del paziente per la terapia. Duragesic è un esempio di cerotto transdermico e Actiq di "stick" a base di fentanil, entrambi utilizzati nel trattamento del dolore cronico.

L'impiego concomitante del fentanil con potenti inibitori del citocromo P450 3A4 (nelnavor, ritonavir, ketoconazolo, itraconazolo, claritromicina, nefazodone) ne incrementa le concentrazioni plasmatiche, determinando aumento e prolungamento degli effetti avversi, tra cui la depressione respiratoria.

Oltre ad esercitare un'importante azione analgesica può indurre una depressione respiratoria dose dipendente che si manifesta con riduzione della frequenza respiratoria, aumento della pressione di CO₂ e, nei casi più gravi, apnea. La depressione respiratoria può persistere anche una volta cessata l'azione analgesica; pertanto il monitoraggio del paziente dovrebbe protrarsi anche oltre il termine

dell'intervento chirurgico. Ad eccezione dell'effetto bradicardizzante, il farmaco a dosaggi terapeutici produce effetti minimi sul sistema cardiovascolare; tuttavia può comparire ipotensione, seppure transitoria, qualora si somministri l'oppioide per via endovenosa in associazione ai barbiturici. Complessivamente il farmaco esercita un'azione simpaticolitica; pertanto tra gli altri possibili effetti collaterali si annoverano il rilascio dello sfintere anale e scialorrea.

Il fentanil, come la morfina, agisce da agonista nei confronti del recettore μ e inibisce, come descritto precedentemente, l'inibizione dell'enzima adenilato ciclastasi e la conseguente diminuzione di AMPc.

Si è sempre ritenuto che gli oppioidi inibissero il flusso di calcio e che questo fenomeno fosse alla base della loro azione analgesica. Recentemente invece è stato dimostrato che agonisti del recettore MOP possono causare un aumento della permeabilità al calcio in cellule appartenenti alla linea SH-SH5Y. In particolare sono stati condotti studi trattando le cellule con fentanil e si è osservato che la concentrazione di calcio aumenta in modo dose-dipendente dopo il trattamento con fentanil (136) e resta invariata dopo trattamento con il DPDPE, agonista del recettore oppioide δ (137).

Questo comportamento suggerisce che solo gli agonisti μ sono in grado di indurre tale risposta e concorda con l'evidenza sperimentale che solo queste sostanze possono stimolare la formazione di inositolo tri-fosfato (138).

Per quanto riguarda l'effetto eccitatorio indotto dagli agonisti oppioidi si è visto che esso è dovuto alla loro azione inibitoria sugli interneuroni terminali, è stato riportato che l'attivazione dei recettori μ provoca l'iperpolarizzazione degli interneuroni

terminali inibendo il rilascio di GABA nell'ippocampo e bloccando quindi l'azione inibitoria esercitata da questo neurotrasmettitore (139).

1.3.3 Tolleranza agli oppiacei

È noto da tempo che la somministrazione cronica di oppiacei dà luogo allo sviluppo di tolleranza all'effetto analgesico.

Dal punto di vista strettamente farmacologico, si definisce tolleranza il progressivo decremento dell'effetto di una sostanza in seguito a somministrazioni ripetute della stessa, ne consegue la necessità di aumentare la dose per ottenere lo stesso effetto, con il risultato di raggiungere dosaggi così alti da rischiare di essere letali. Dal punto di vista sperimentale, l'induzione di tolleranza all'effetto antinocicettivo di un oppiaceo si osserva nel tempo con una diminuzione della soglia nocicettiva che passa da valori alti nei primi trattamenti a valori sempre più bassi fino a tornare ai livelli dei controlli, a conferma di un decremento dell'effetto. I recettori oppioidi associati allo sviluppo della tolleranza sono μ e δ , studi condotti in vitro su linee cellulari che esprimono recettori per gli oppioidi (in particolare i recettori μ) hanno rilevato che l'esposizione cronica a morfina induce dapprima una diminuzione dell'affinità dell'agonista per il recettore e poi un graduale decremento del numero di recettori disponibili per il legame con l'agonista. E' perciò stata avanzata l'ipotesi di una "down-regulation" per il recettore oppure di una sua internalizzazione.

Recentemente è stato osservato che gli analgesi oppiacei ad alta efficacia sono capaci di internalizzare il recettore μ e questo fenomeno sembra inversamente proporzionale allo sviluppo della tolleranza, si è perciò ipotizzato che maggiore è l'efficacia del

ligando maggiore sarà la sua capacità di internalizzare il recettore MOP e minore sarà il grado di tolleranza indotta.

Studi in vivo hanno evidenziato che gli agonisti oppioidi ad alta efficacia producono sostanzialmente meno tolleranza in vivo rispetto a quelli meno efficaci somministrati alle stesse dosi (140). Studi condotti su topi sottoposti al test del tail-flick dopo trattamento con morfina, ossicodone e oppiacei ad alta efficacia come l'etorfina e il fentanyl, hanno dimostrato che gli oppiacei ad alta efficacia presentano una maggiore attività analgesica e inducono un minor grado di tolleranza all'effetto analgesico (140). Sono state proposte varie ipotesi per spiegare la relazione tra lo sviluppo della tolleranza e l'internalizzazione o la down-regulation del recettore (fig. 20). Un'ipotesi suggerisce che un agonista a bassa efficacia occupi più recettori rispetto ad un agonista più efficace e di conseguenza si avranno poi più recettori in stato di desensitizzazione. Altri hanno suggerito che gli agonisti a più bassa efficacia non regolano le proteine di trasporto che favoriscono la down-regulation del recettore. Un'altra ipotesi mette in relazione lo sviluppo della tolleranza agli effetti degli oppioidi alle modificazioni della biosintesi dei precursori oppioidi proopiomelanocortina, proenkefalina A e prodinorfina. Dati sperimentali supportano questa ipotesi ed evidenziano ad esempio, dopo trattamento ripetuto con morfina, una diminuzione dei livelli di mRNA della proenkefalina A nel nucleus accumbens e variazioni dei livelli di mRNA della prodinorfina nel nucleus accumbens e nello striato di topi (141). Contemporaneamente a questi risultati, altri sono a favore di una mancanza di modificazione dell'assetto biosintetico del sistema oppioide dopo esposizione cronica alla morfina (142).

In ogni caso l'incapacità di un ligando oppioide di indurre l'internalizzazione del recettore potrebbe aumentare la tolleranza perché il recettore attivato non viene inavaginato nella membrana e non si innescano i meccanismi cellulari responsabili della risensitizzazione.

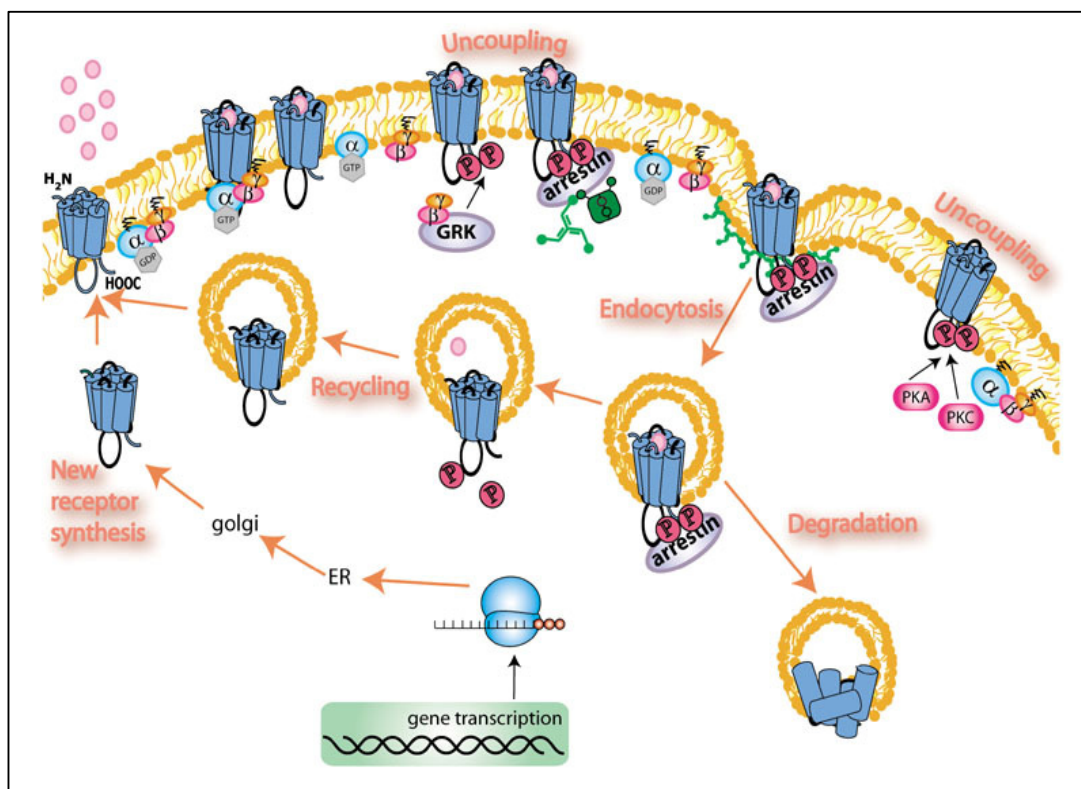


Fig. 20 Regolazione dei recettori accoppiati a proteine G.

In altre parole il recettore rimane per più tempo nello stato di desensitizzazione incrementando il fenomeno della tolleranza (143).

Sono anche stati fatti studi riguardo agli effetti del fentanil sui livelli di espressione genica del recettore MOP in una linea cellulare di feocromocitoma di ratto (PC12) ed è stato dimostrato che il trattamento della linea tumorale PC12 con questo potente μ -agonista ha prodotto un aumento dose e tempo dipendente dell'espressione del gene

che codifica per il recettore MOP (144). L'up-regulation dell'espressione genica del recettore MOP indotta dal fentanyl potrebbe rappresentare un evento importante nel compensare la riduzione del numero di recettori che si verifica in seguito a trattamento a lungo termine con fentanil, in quanto, come detto precedentemente, nella fase di desensitizzazione si verifica l'internalizzazione del recettore. Si è inoltre osservato che la cosomministrazione di morfina e un potente μ -agonista, come il fentanil, produce un potenziamento dell'attività della morfina (146).

Nello studio della tolleranza esercitata dagli oppioidi si è anche indagato il ruolo della β -arrestina, la proteina che interviene in seguito alla fosforilazione del recettore e che attiva i meccanismi di desensitizzazione tra cui il disaccoppiamento con le proteine G e l'internalizzazione. Si è osservato che gli agonisti oppioidi a bassa efficacia intrinseca (morfina) oltre ad indurre, come detto sopra, l'internalizzazione di un minor numero di recettori legano solo la β -arrestina di tipo 1; d'altro canto gli agonisti ad alta efficacia (fentanil, etorfina) legano sia la β -arrestina di tipo 1 che quella di tipo 2 (145).

Sono state fatte anche ricerche sulle cause della sindrome astinenziale che può verificarsi in seguito al trattamento con oppioidi e si è visto che l'occupazione prolungata dei recettori da parte di oppiacei esogeni potrebbe determinare una diminuzione della biosintesi ex-novo di oppioidi endogeni, non più necessari all'equilibrio neuronale a causa della presenza degli esogeni. Al momento della brusca interruzione dell'espressione cronica, i recettori verrebbero a trovarsi in una situazione di "siti vacanti" perché il corredo endogeno si trova al di sotto dei normali valori all'equilibrio. Questo potrebbe determinare la cosiddetta "sindrome da astinenza",

superata la quale si ricostituirebbero i normali valori nei livelli di peptidi oppioidi endogeni.

1.3.4 Correlazione tra sistema nocicettina/NOP e sistema oppioide

Dal punto di vista molecolare, basandosi su criteri genetici non vi è dubbio che il recettore NOP e i recettori oppioidi, appartengano alla stessa famiglia ed anche i precursori dei loro ligandi endogeni, rispettivamente la nocicettina e i neuropeptidi oppioidi possiedono una elevata omologia sotto il profilo genetico.

Tuttavia dal punto di vista funzionale il recettore NOP non è un recettore oppioide: non lega i ligandi dei recettori oppioidi con elevata affinità e, cosa ancor più importante, gli effetti farmacologici da esso mediati sono per lo più insensibili agli antagonisti dei recettori oppioidi.

Inoltre la nocicettina non è un peptide oppioide: non lega i recettori oppioidi con elevata affinità e gli effetti farmacologici da essa mediati sono insensibili agli antagonisti dei recettori oppioidi.

La marcata analogia strutturale tra il recettore NOP e i recettori oppioidi (specialmente il recettore κ) e tra la nocicettina e i peptidi oppioidi (in particolare la dinorfina A) non è tuttavia riflessa sul piano anatomico, poiché la nocicettina e i peptidi oppioidi sembrano essere localizzati in circuiti neuronali separati.

Per di più, la nocicettina ha in comune con i peptidi oppioidi la stessa via di trasduzione del segnale mediata da proteine G, in particolare stimolano entrambi correnti di K^+ “outward” e/o inibiscono canali del Ca^{2+} voltaggio dipendenti, tramite i quali riduce l'efficacia sinaptica.

Sudi sperimentali hanno evidenziato che l'azione della nocicettina si oppone a quella degli oppioidi, attenuandone così l'effetto analgesico (147); microiniezioni di N/OFQ nella sostanza grigia peracqueduttale antagonizzano l'effetto analgesico mediato dalla morfina (148) ed la N/OFQ è coinvolta nello sviluppo della tolleranza indotta da morfina (149), il blocco del sistema nocicettina/NOP nella sostanza grigia peracqueduttale potenzia l'attività analgesica del DAMGO (150); la N/OFQ blocca l'effetto analgesico di agonisti oppioidi μ , δ e κ (151); inoltre, in vitro, la morfina induce up-regulation della biosintesi del precursore della nocicettina (152)

Da quanto esposto non sorprende che il profilo farmacologico in vivo della nocicettina differisca in molti aspetti e in alcuni addirittura si opponga a quello dei peptidi oppioidi.

Quindi se sotto il profilo genetico il sistema nocicettina/recettore NOP appartiene alla stessa famiglia dei sistemi recettoriali oppioidi, sotto il profilo farmacologico-funzionale si comporta come un sistema anti-oppioide (153).

1.4 Sistema nocicettina/NOP e alcol

1.4.1 Alcol

L'alcolismo, o dipendenza da alcol, è un disordine complesso del comportamento, di grande impatto economico e medico per la società moderna.

L'etanolo è un depressante del S.N.C. e le proprietà farmacologiche includono effetti sull'apparato gastrointestinale, cardiovascolare e influenzano stati patologici e di sviluppo prenatale. Il consumo di etanolo altera il delicato equilibrio esistente nel cervello tra influenze eccitatorie e inibitorie, causando disinibizione, ansia e sedazione. La tolleranza all'alcol si sviluppa dopo uso cronico e la dipendenza fisica è dimostrata dalla presenza di sintomi di astinenza.

La comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari delle molteplici azioni in vivo dell'etanolo richiede la conoscenza e la comprensione di varie discipline biomediche.

1.4.2 Proprietà farmacologiche dell'alcol

Dopo somministrazione orale, l'etanolo viene rapidamente assorbito nel flusso sanguigno, attraverso lo stomaco e l'intestino tenue, e distribuito nell'acqua corporea.

Grazie al metabolismo di primo passaggio, che avviene tramite l'azione dell'alcol deidrogenasi (ADH) presente sia a livello gastrico che epatico, i livelli ematici di etanolo risultano più bassi di quelli che si osserverebbero se una medesima dose fosse somministrata per via endovenosa. L'etanolo viene metabolizzato principalmente mediante ossidazione epatica sequenziale, prima ad acetaldeide da parte dell'ADH e poi ad acido acetico da parte dell'aldeide deidrogenasi (ALDH). Anche il citocromo P450 2E1 (CYP2E1) può contribuire al metabolismo dell'etanolo, specialmente se

l'alcol è presente in concentrazioni elevate e quando l'attività di questo sistema microsomiale epatico viene indotta (fig. 21)

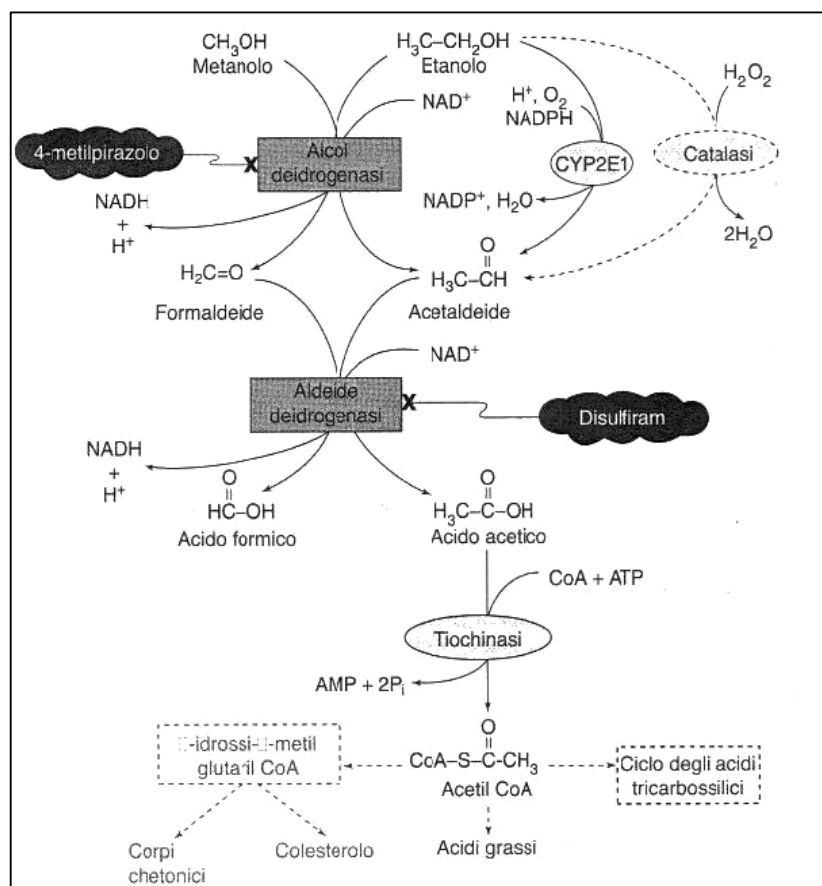


Fig. 21 Metabolismo dell'alcol.

I meccanismi alla base delle malattie epatiche causate da abuso di etanolo riflettono probabilmente una complessa combinazione dei seguenti fattori metabolici: induzione di CYP2E1 (e incremento dell'attivazione di tossine e della produzione di H_2O_2 e formazione dei radicali dell'ossigeno) e possibilmente aumento del rilascio di endotossine come conseguenza dell'effetto dell'etanolo sulla flora batterica del tratto gastro-intestinale. Gli effetti di un uso eccessivo di etanolo possono essere riassunti in: danneggiamento dei tessuti, che riflette verosimilmente le carenze nutrizionali degli

alcolizzati (cattivo assorbimento dei nutrienti, carenza della tiamina, delle vitamine A e D) e, soppressione della funzione immunitaria ed altri effetti generalizzati.

1.4.2 Basi Neurobiologiche del consumo di alcol

L'alcol non possiede un proprio recettore target e per molto tempo si è ritenuto che agisse in modo aspecifico aumentando semplicemente la fluidità delle membrane cellulari neuronali (154). Ci sono crescenti evidenze che in realtà la dipendenza da alcol è un disordine cerebrale cronico la cui eziologia è multifattoriale e che il consumo incontrollato di etanolo ne è un conseguenza comportamentale. Gli studi condotti sino ad oggi indicano che produce i suoi effetti alterando direttamente diverse proteine neuronali e in particolare i recettori di diversi neurotrasmettitori (155). Si ritiene che la plasticità neuronale sia alla base della dipendenza da alcol anche se non si conosce il preciso meccanismo attraverso cui il consumo occasionale sfocia nell'abuso.

Intossicazione acuta da alcol

Gli effetti dell'intossicazione acuta da alcol sono dovuti principalmente ai cambiamenti dell'attività recettoriale di diversi neurotrasmettitori. L'effetto predominante è l'inibizione delle funzioni cerebrali dovuta alle alterazioni dei maggiori sistemi neurotrasmettitoriali eccitatori e inibitori del S.N.C., a carico cioè della neurotrasmissione gabaergica e glutammatergica.

Il GABA è il principale neurotrasmettitore inibitorio, agisce attraverso l'interazione con due diversi recettori: il recettore ionotropo GABA_A e il recettore metabotropo GABA_B associato a proteine G. Il GABA_A è un recettore canale che regola il passaggio dello ione cloro all'interno delle cellule, la sua stimolazione causa l'apertura del canale

e l'ingresso dello ione cloro all'interno dei neuroni, generando così iperpolarizzazione della membrana. L'iperpolarizzazione della membrana rende i neuroni meno eccitabili e questo spiega perché il GABA è un neurotrasmettitore inibitorio. L'azione inibitoria dell'alcol è dovuta proprio al potenziamento della funzionalità del recettore GABA_A (156) e probabilmente anche all'aumento del rilascio di GABA da parte dei neuroni tramite un meccanismo indiretto (157). Le aree principalmente coinvolte nel potenziamento della funzione gabaergica nell'intossicazione acuta da alcol sono la corteccia cerebrale, il setto mediale e alcune regioni ippocampali (158).

Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio e causa depolarizzazione di membrana dei neuroni. I recettori per il glutammato sono sia ionotropi che metabotropi accoppiati a proteine G. I recettori canale ionotropi regolano il passaggio degli ioni calcio, sodio e potassio, ne esistono tre sottotipi per l'acido α -Amino-3-idrossi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), per il kainato e per il N-metil-D-aspartato (NMDA). Sebbene sia stato riportato che l'alcol è in grado di inibire i differenti recettori del glutammato (159,160), il recettore NMDA è il più sensibile a basse dosi di etanolo ed è quello più coinvolto negli effetti neurofarmacologici dell'assunzione acuta di alcol (161,162).

L'alterazione del delicato equilibrio che esiste tra le funzioni eccitatorie ed inibitorie nel cervello, mediate dall'interazione con questi sistemi neurotrasmettitoriali e canali ionici, produce i principali effetti comportamentali dell'assunzione acuta di alcol, come l'ataxia, l'amnesia e la sedazione.

L'assunzione acuta di alcol è in grado di influenzare anche l'attività di diversi canali ionici. I canali del calcio voltaggio dipendenti (tipo L) svolgono un ruolo importante

nei meccanismi di eccitabilità neuronale e l'assunzione acuta di etanolo ne inibisce l'attività (163), inoltre apre i canali del K^+ "inwardly rectifying" attivati da proteine G (GIRKs) (164,165).

L'alcol è in grado di interagire anche con i recettori di altri neurotrasmettitori, inclusi i recettori 5-HT₃ per la serotonina (166) considerati di natura eccitatoria, i recettori neuronali nicotinici per l'acetilcolina (nAChRs) (167,168) e i recettori per la glicina (169).

Inoltre l'assunzione acuta di alcol induce una serie di effetti indiretti, in particolare influenza il rilascio presinaptico di alcuni neurotrasmettitori (170), come ad esempio la dopamina, la serotonina e i peptidi oppioidi endogeni fortemente implicati nelle proprietà di rinforzo dell'alcol e nello sviluppo della tolleranza.

Inizio del consumo di alcol (initiation of alcohol consumption)

Le caratteristiche genetiche individuali influenzano notevolmente l'inizio dell'assunzione cronica di alcol e una variabile importante è il grado di risposta della prima assunzione che è un indice della sensibilità individuale all'etanolo.

Le regioni cerebrali importanti nel mediare gli effetti di rinforzo positivo all'alcol sono state ben identificate mediante studi neurofarmacologici. Il sistema mesocorticolimbico rappresenta la via dopaminergica maggiormente implicata nell'addiction da sostanze d'abuso (171), origina nell'area tegmentale ventrale (VTA) che proietta al nucleus accumbens (NAc) e alla corteccia prefrontale (PFC). Aumentare le concentrazioni di dopamina nelle strutture target delle proiezioni mesocorticolimbiche è una caratteristica di tutte le sostanze d'abuso, si ritiene che il rilascio della dopamina da queste proiezioni giochi un ruolo cruciale nell'induzione

dei comportamenti compulsivi dell'addiction. (172,173) L'assunzione acuta di alcol aumenta il rilascio endorfine ed enkefaline che possono causare il rilascio di dopamina attivando i neuroni dopaminergici nella VTA e nel NAc (174). Si ritiene che questo generalizzato potenziamento dell'attività dopaminergica operi come un segnale che media le proprietà di rinforzo dell'alcol e che sia importante nella formazione di connessioni tra gli stimoli ambientali e i processi di rinforzo o gli eventi aversivi. L'aumento dell'attività dopaminergica indotta dall'etanolo a livello del sistema mesolimbico è infatti ritenuta da tempo uno dei meccanismi chiave nella sua azione di rinforzo (175).

Inoltre, si ritiene che la diversità di queste risposte biologiche e genetiche (sensibilità iniziale, rinforzo alcol-mediato) dovute all'assunzione acuta di alcol in individui naive e le influenze ambientali (ad esempio lo stress), facilitino l'inizio del consumo di alcol. Lo stress può favorire l'assunzione di alcol aumentando l'attività di diversi sistemi neurobiologici, ad esempio dell'asse ipotalamo-pituitario-surrenale (HPA) e dell'ormone di liberazione della corticotropina (CRF) (176). È stato riportato infatti che l'iperattività del sistema CRF in differenti regioni limbiche è correlata alla spinta motivazionale del consumo di alcol (177). Quindi le differenze individuali nell'attività dei diversi neurotrasmettitori sono un punto importante per capire il perché alcune persone iniziano a consumare alcol e altre no. Il patrimonio genetico di ogni individuo determina fenotipi che sono più o meno sensibili all'etanolo e in particolari situazioni ambientali può incentivare il consumo di alcol poiché la risposta di alcuni individui alle proprietà di rinforzo dell'alcol è maggiore rispetto ad altri.

Assunzione cronica di alcol (maintenance of alcohol consumption)

In seguito al consumo ripetuto di etanolo, si verificano dei cambiamenti neuronali che generalmente si oppongono agli effetti acuti dell'alcol e mirano a ripristinare le normali funzioni delle cellule neuronali. Questi adattamenti neuronali portano alla tolleranza e alla dipendenza fisica da etanolo, quest'ultima dimostrata dall'insorgenza della sindrome di astinenza quando si interrompe il consumo di alcol.

Durante il consumo cronico di alcol si ha una diminuzione della densità cerebrale dei recettori canale GABA_A e up- o down-regulation dell'espressione genica in specifiche regioni cerebrali (178). Particolarmente importanti sono i recettori GABA_A presenti nella VTA e nel NAc, infatti antagonizzandone l'attività nella VTA (179) o incrementandola nel NAc si interrompe il consumo di alcol negli alcohol-preferring P rats (180), suggerendo un ruolo molto importante di queste due aree nel consumo di etanolo.

Il sistema glutammatergico non sembra avere un ruolo importante nel mantenimento del consumo di alcol, infatti gli studi farmacologici condotti utilizzando antagonisti del recettore NMDA mostrano una riduzione o nessun effetto sul consumo di alcol (181, 182).

Il rilascio di dopamina dal NAc è un punto cruciale per iniziare il processo di rinforzo da alcol (175) ma le lesioni del tratto mesolimbico indotte con la 6-idrossi-dopamina non sono in grado di alterare l'autosomministrazione volontaria nei ratti, suggerendo un ruolo meno importante della dopamina nel mantenimento del consumo di alcol (183).

L'utilizzo degli inibitori selettivi della ricaptazione di serotonina, degli agonisti e degli antagonisti dei recettori 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃ sono in grado di ridurre il consumo di alcol sia negli animali alcohol-preferring che nei non preferring (184, 185, 186, 187).

I topi knockouts per i recettori oppioidi μ e κ mostrano bassi livelli di auto somministrazione di alcol (188, 189) e questi dati supportano l'ipotesi che, in seguito ad assunzione cronica di alcol, avvengano dei cambiamenti nel sistema endorfina/recettore MOP e dinorfina/recettore KOP (190, 191) 37, 38) suggerendo un ruolo importante di questi recettori nel mantenimento del consumo di alcol.

Ricadute al consumo di alcol (relapse to alcohol use)

Un aspetto molto importante nella pratica clinica per il trattamento dell'alcolismo è la prevenzione delle ricadute durante i periodi di astinenza da alcol. Infatti le ricadute sono presenti nella maggior parte dei casi clinici se non trattati adeguatamente, indicando che la ricaduta deve essere considerata come una componente importante dell'alcolismo.

Gli animali che hanno avuto libero accesso all'alcol e vengono poi deprivati per giorni o mesi, mostrano un marcato e transiente aumento dell'assunzione di alcol rispetto al periodo antecedente l'astinenza (192). Questo fenomeno viene chiamato "alcohol deprivation effect" (ADE) e si osserva in differenti specie animali, inclusi ratti, topi e scimmie (192, 193, 194). Il meccanismo alla base di questo temporaneo aumento del consumo di alcol in seguito ad un periodo di astinenza non è chiaro, anche se potrebbe essere causato da un aumento della capacità di rinforzo dell'alcol; in alternativa l'alcol potrebbe agire da segnale di inizio (l'odore e/o il sapore) ed essere il primo stimolo. Il naltrexone e l'acamprosato, utilizzati nella pratica clinica per il trattamento

dell'alcolismo, diminuiscono l'effetto ADE nei ratti. (195, 196). Il modello animale di ADE può essere di aiuto per la ricerca di nuovi composti terapeutici per il trattamento delle ricadute.

Il sistema glutammatergico gioca sicuramente un ruolo importante nell'alcolismo e in modo particolare nelle ricadute (197, 198), l'acamprosato riduce l'iperattività glutammatergica (199) e l'effetto ADE in ratti Wistar (200, 201). Inoltre è stato dimostrato che il trattamento cronico con antagonisti non selettivi del recettore NMDA aboliscono l'aumento dell'assunzione di alcol durante l'ADE (202).

La somministrazione del diazepam, agonista del recettore GABA_A, diminuisce il consumo di alcol nel periodo successivo alla deprivazione mentre la tiagabina, inibitore del trasportatore di GABA, aumenta l'effetto ADE nei ratti (203) e agonisti del recettore GABA_B diminuiscono l'ADE in Sardinian alcohol-preferring rats (204). Questi studi suggeriscono che il sistema gabaergico è implicato nel comportamento legato alle ricadute.

Inoltre, negli alcohol preferring rats con libero accesso all'alcol, la neurotrasmissione dopaminergica e serotoninergica risultano alterate nel NAc e questi effetti persistono per almeno due settimane dopo la sospensione del consumo di alcol, suggerendo che i cambiamenti del sistema monoaminergico possono essere responsabili almeno in parte dell'aumento del consumo di alcol osservato nell'ADE (205).

Per quel che riguarda il sistema oppioide, è stato visto che il trattamento con antagonisti oppioidi non selettivi diminuisce l'effetto ADE (206) e che la morfina accentua l'iniziale aumento del consumo di alcol riscontrato dopo un periodo di privazione di etanolo in high-alcohol-preferring rats (207). Risultati simili sono stati

ottenuti con l'agonista κ selettivo CI-977, i ratti che hanno avuto accesso all'etanolo per un lungo periodo, registrano un forte aumento di consumo di alcol durante l'ADE. (208).

Diversi studi condotti su pazienti alcolisti mostrano specifiche variazioni genetiche del sistema oppioide e, ad esempio, il sistema oppioide κ è stato associato alla dipendenza da alcol (209).

In conclusione l'alcol agisce sui sistemi di diversi neurotrasmettitori e neuro modulatori, inclusi i recettori NMDA, GABA_A, della glicina, della serotonina e nicotinici dell'acetilcolina e attraverso i canali del Ca²⁺ di tipo L. Le variazioni genetiche di queste molecole target possono generare fenotipi diversamente suscettibili all'alcol. In particolare, le differenze innate nella funzionalità di diversi sistemi cerebrali, che definiscono la capacità di rinforzo dell'alcol, contribuiscono alla risposta individuale a questa sostanza d'abuso. Una volta iniziato il consumo di alcol, questo può virtualmente alterare la neurotrasmissione in tutto il cervello, perciò è difficile definire quali siano i sistemi neuronali che contribuiscono maggiormente al passaggio dall'uso controllato di etanolo all'uso compulsivo. In ogni caso alcuni cambiamenti nel S.N.C. alla base del rinforzo possono diventare persistenti e si ritiene che questi cambiamenti irreversibili costituiscono lo "switch molecolare e strutturale" che determina il passaggio dal consumo controllato all'abuso di alcol (199).

A tutt'oggi questi cambiamenti persistenti che possono portare all'alcolismo non sono stati completamente chiariti.

1.4.3 Correlazione tra sistema nocicettina/NOP e alcol

Recenti studi in modelli animali evidenziano che il sistema nocicettina/NOP risulta coinvolto nei meccanismi di gratificazione attivati dalle sostanze da abuso e queste evidenze sono particolarmente consistenti nel caso dell'alcol. (210,211,212,213).

Studi neuroanatomici e immunoistochimici hanno evidenziato che il sistema nocicettina/NOP è ampiamente distribuito nel S.N.C. in differenti strutture mesocorticolimbiche, incluse l'amigdala, il bed nucleus of the stria terminalis, il nucleus accumbens, e varie aree corticali coinvolte nella regolazione degli effetti motivazionali legati alle sostanze d'abuso. Studi in ratti geneticamente modificati msP (Marchigian Sardinian alcohol preferring rats) hanno dimostrato che somministrazioni intracerebroventricolari di nocicettina inibiscono la conditioned place preference indotta da etanolo, la self-administration di etanolo e il relapse (211,214,215,216).

L'esatto meccanismo attraverso cui la nocicettina esercita una funzione modulatoria sul consumo di alcol non è ancora stato chiarito. Considerando il ruolo svolto dal sistema dopaminergico e dal sistema oppioide nell'influenzare i comportamenti legati all'etanolo e considerando il ruolo modulatorio che svolge la nocicettina sull'attività dopaminergica e oppioide nel sistema mesocorticolimbico, si può ipotizzare che l'interazione del sistema nocicettina/NOP con questi due sistemi potrebbe ridurre le proprietà motivazionali dell'alcol. Studi di microdialisi hanno infatti dimostrato che la nocicettina è in grado di inibire il rilascio di dopamina dal nucleus indotta da morfina e cocaina (217,218) ed è in grado di modulare l'attività dopaminergica nel sistema mesolimbico (219).

Le proprietà di rinforzo dell'alcol sono mediate dall'interazione dell'etanolo anche con altri sistemi neuronali (220) tra questi gioca un ruolo importante il sistema gabaergico. E' stato dimostrato che nell'amigdala, area implicata nei meccanismi della gratificazione, la somministrazione di antagonisti del recettore GABA_A riducono significativamente l'autosomministrazione di etanolo nei ratti (221, 222) inoltre l'alcol aumenta la trasmissione gabaergica nell'amigdala e questo effetto è bloccato dal pretrattamento con nocicettina (223, 59). E' noto che la nocicettina svolge antagonismo funzionale nei confronti del sistema oppioide ed è capace di inibire il firing delle cellule B-endorfinergiche dei neuroni del nucleo arcuato ipotalamico (224). Dal nucleo arcuato ipotalamico i neuroni proiettano alla VTA e al NAc, dove interagiscono con i neuroni dopaminergici mesolimbici coinvolti nei meccanismi di gratificazione. Inoltre è stato dimostrato che i neuroni della VTA esprimono il recettore NOP e che la nocicettina può modulare direttamente e indirettamente, attraverso gli interneuroni GABA, l'attività dei neuroni dopaminergici della VTA.

Le evidenze sperimentali appena esposte suggeriscono che il sistema nocicettina/NOP potrebbe essere un potenziale target farmacologico per il trattamento dell'alcolismo.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Le evidenze sperimentali esposte nella introduzione sottolineano le caratteristiche del neuropeptide nocicettina, ligando endogeno del recettore NOP, e ne delineano il profilo farmacodinamico. Dal punto di vista strutturale il recettore NOP mostra un'elevata omologia di sequenza con i recettori oppioidi MOP, KOP e DOP (16), tuttavia non è in grado di interagire con i ligandi per tali recettori. Sono presenti anche analogie strutturali tra la sequenza codificante per il peptide nocicettina e quella di alcuni peptici oppioidi, ma, nonostante ciò, la nocicettina non è in grado di interagire con i recettori oppioidi. La caratterizzazione farmacologica del sistema neuronale nocicettina/recettore NOP ha permesso di avanzare l'ipotesi che il neuropeptide nocicettina possa svolgere una sorta di antagonismo funzionale nei confronti degli effetti del sistema oppioide endogeno (36). Studi sperimentali hanno evidenziato che l'azione della nocicettina si oppone a quella degli oppioidi, attenuandone così l'effetto analgesico (147); microiniezioni di N/OFQ nella sostanza grigia peracqueduttale antagonizzano l'effetto analgesico mediato dalla morfina (148) ed la N/OFQ è coinvolta nello sviluppo della tolleranza indotta da morfina (149), il blocco del sistema nocicettina/NOP nella sostanza grigia peracqueduttale potenzia l'attività analgesica del DAMGO (150); la N/OFQ blocca l'effetto analgesico di agonisti oppioidi μ , δ e κ (151); inoltre, in vitro, la morfina induce up-regulation della biosintesi del precursore della nocicettina (152)

Oltre ad avere un ruolo importante nella trasmissione degli impulsi nocicettivi, il sistema nocicettina/recettore NOP risulta essere coinvolto in numerose funzioni

biologiche, tra cui il comportamento alimentare, i meccanismi di stress e ansia, i processi cognitivi e di memoria, l'attività locomotoria spontanea, i meccanismi di ipereccitabilità neuronale e gli effetti indotti da sostanze d'abuso. Sulla base di queste premesse lo scopo di questa tesi di dottorato è stato quello di fornire approfondimenti relativi alle possibili implicazioni del sistema nocicettiva/NOP negli effetti mediati da diverse sostanze d'abuso quali il Δ^9 -THC, gli oppiacei morfina e fentanil e l'alcol.

Per quel che riguarda il Δ^9 -THC, è stato evidenziato negli ultimi anni l'esistenza di una correlazione tra il sistema cannabinoide e quello oppioide. In particolare i cannabinoidi risultano in grado di potenziare le proprietà antinocicettive degli oppioidi e numerose evidenze sperimentali indicano che l'effetto analgesico del Δ^9 -THC è almeno in parte mediato da meccanismi che coinvolgono i recettori oppioidi. In particolare il Δ^9 -THC sembra mediare gli effetti della morfina a livello spinale e, somministrato per via intratecale, porta ad un aumento del release di oppioidi endogeni che stimolano i recettori δ e κ (126,127). Si pensa che gli effetti sinergici del Δ^9 -THC e della morfina derivino da un'iniziale rilascio di dinorfina A e alla formazione di leu-enkefalina (128,129). Ad avvalorare l'ipotesi dell'interazione tra oppioidi e cannabinoidi si aggiungono anche i dati ottenuti da studi relativi agli antagonisti per il recettore CB₁ e per il recettore μ . L'SR1417A, antagonista selettivo per il recettore CB₁, è in grado di bloccare l'aumentato effetto analgesico, ottenuto somministrando basse dosi di Δ^9 -THC e basse dosi di morfina. Allo stesso modo il naloxone, antagonista per il recettore μ , blocca il sinergico effetto analgesico prodotto da Δ^9 -THC e morfina o codeina, indicando in tal modo anche un coinvolgimento del recettore μ (132, 133).

Sulla base della duplice interazione del sistema oppioide sia con il sistema nocicettina/recettore NOP che con il sistema cannabinoide è stato indagato un possibile cross-talk tra il sistema neuropeptidergico nocicettina/recettore e il sistema cannabinoide. In particolare sono stati indagati gli effetti del Δ^9 -THC sull'espressione genica e sulla densità del recettore NOP nella linea cellulare SH-SY5Y che deriva da un neuroblastoma umano ed esprime costitutivamente sia il recettore NOP che il recettore cannabinoide CB₁. L'espressione genica del recettore NOP è stata valutata mediante la metodica dell'RT-PCR in cellule trattate con Δ^9 -THC per 24 ore a diverse concentrazioni (50,100,150,200 nM). Inoltre, per verificare che gli effetti Δ^9 -THC sulla biosintesi di NOP fossero dovuti all'occupazione e all'attivazione dei recettori cannabinoidi CB₁, le cellule sono state pretrattate con la molecola AM251, antagonista selettivo del recettore CB₁, alla concentrazione di 1 μ M venti minuti prima dell'esposizione al Δ^9 -THC per 24 ore. La densità recettoriale del recettore per la nocicettina è stata valutata mediante studi di binding per competizione nelle medesime condizioni sperimentali.

Per quel che riguarda i farmaci oppiacei, essi rappresentano oggi il più potente strumento per la terapia del dolore cronico ed esplicano la loro efficacia terapeutica mimando le azioni dei peptidi oppioidi endogeni ma il loro uso è reso difficoltoso dallo sviluppo della tolleranza e della dipendenza. Il prototipo degli analgesici oppiacei è la morfina (135), agonista di origine naturale del recettore oppioide MOP, il cui effetto analgesico va incontro a tolleranza in seguito ad esposizione cronica e diventa necessario aumentare la dose del farmaco per produrre il medesimo effetto. Studi sperimentali hanno evidenziato che tra i farmaci oppiacei, il fentanil è un potente

agonista puro del recettore oppioide MOP ed è importante sottolineare che rispetto alla morfina ha un minore potenziale d'abuso e una ridotta frequenza di insorgenza della sindrome d'astinenza. A differenza della morfina, il fentanil è in grado di influenzare l'attività dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (137) e dei canali del potassio ATP-dipendenti (137), inoltre ha un minor effetto immunosoppressore. L'aspetto più interessante è legato alla capacità del fentanil di internalizzare il recettore MOP (145). La teoria tradizionale attribuisce alla desensitizzazione e all'internalizzazione del recettore lo sviluppo della tolleranza agli oppiacei, tuttavia la morfina induce velocemente tolleranza senza però essere in grado di internalizzare il recettore MOP. Recenti studi ipotizzano che l'internalizzazione del recettore MOP possa rendere più veloce il riciclo del recettore, rendendolo nuovamente disponibile e questo potrebbe spiegare almeno in parte la ridotta tolleranza al fentanil rispetto alla morfina. E' stato anche osservato che l'azione analgesica della morfina possa essere potenziata quando somministrata insieme ad un agonista oppiaceo più potente, come ad esempio il fentanil (146). Dalla letteratura sono noti gli effetti della morfina sulla biosintesi del recettore MOP, al contrario esiste un solo studio riguardante il fentanil da cui emerge che, a differenza della morfina, il fentanil induce l'up-regulation di MOP (144). La regolazione dell'espressione genica è proprio uno dei meccanismi attraverso cui i farmaci d'abuso possono alterare i sistemi endogeni neurotrasmettitoriali dando luogo così a fenomeni di adattamento neuronale. A questo proposito riveste un ruolo rilevante il sistema oppioide e negli ultimi anni assume un ruolo sempre più importante anche il sistema nocicettina/NOP di recente scoperta. Sulla base di queste premesse e per meglio comprendere i meccanismi legati allo sviluppo della tolleranza

e della dipendenza ai farmaci d'abuso, sono indagati gli effetti della morfina e del fentanil sull'espressione genica dei recettori MOP e NOP nella linea cellulare SH-SY5Y che esprime costitutivamente sia il recettore MOP che il recettore NOP. L'espressione genica dei recettore MOP e NOP è stata valutata mediante la metodica dell'RT-PCR in cellule trattate con morfina e fentanil per 24 ore a due diverse concentrazioni (1 e 10 uM).

L'alcol è tra le sostanze d'abuso maggiormente consumate e l'alcolismo è un disordine comportamentale caratterizzato dal consumo eccessivo di etanolo, dallo sviluppo di tolleranza e dipendenza, e dalla diminuzione delle normali funzioni sociali e occupazionali. L'alcolismo è una patologia complessa, implica il coinvolgimento di fattori genetici, psicologici, ambientali e neurobiologici. Al pari di altre dipendenze, l'alcolismo è caratterizzato dalla vulnerabilità alle ricadute anche dopo tempi lunghi dalla cessazione di assunzione della sostanza d'abuso. In contrasto con altre sostanze d'abuso, le cui azioni sono confinate a un numero limitato di sistemi neurochimici o recettoriali, gli effetti farmacologici che supportano il reward e il disordine comportamentale legati all'assunzione da alcol, implicano l'azione di più recettori e sistemi neurochimici in diverse sedi anatomiche del cervello. Recenti studi in modelli animali evidenziano che il sistema nocicettina/NOP risulta coinvolto nei meccanismi di gratificazione attivati dalle sostanze da abuso e queste evidenze sono particolarmente consistenti nel caso dell'alcol (210-215). Una vasta distribuzione di questo sistema peptidergico è stata trovata in diverse strutture del sistema mesocorticolimbico, inclusa l'amigdala e varie regioni della corteccia frontale, importanti aree cerebrali coinvolte nella regolazione delle proprietà motivazionali

delle sostanze d'abuso. Negli ultimi anni si sono ottenute numerose informazioni sui meccanismi alla base della dipendenza da alcol e cresce sempre di più l'interesse per i meccanismi coinvolti nella sindrome da astinenza, poiché potrebbero rappresentare un nuovo target terapeutico per la cura dell'alcolismo. I sintomi dell'astinenza da alcol sembrano dovuti alla plasticità neuronale che determina profondi cambiamenti dei sistemi neurotrasmettitoriali, neuropeptidergici ed endocrini che possono sfociare nell'abuso. In seguito a questi cambiamenti, durante l'astinenza da alcol, si osserva una ipofunzione del sistema gabaergico, con inibizione delle funzioni inibitorie, e un aumento dell'attività eccitatoria dovuta all'aumento di glutammato e dopamina. Risulta evidente da quanto esposto che il sistema nocicettina/NOP è coinvolto negli effetti indotti dall'alcol e per chiarire ulteriormente il coinvolgimento di questo sistema neuropeptidergico negli effetti indotti dall'alcol, sono state indagate le possibili alterazioni della biosintesi del recettore NOP e del suo ligando endogeno nocicettina, a due diversi time point di astinenza, in un modello animale di alcolismo. Sulla base di quanto esposto sono state esaminate le aree cerebrali amigadala, setto laterale, corteccia prefrontale, BNST (bed nucleus of stria terminalis) e ipotalamo, poiché importanti sedi implicate nella plasticità neuronale e fortemente coinvolte negli effetti indotti dall'alcol.

3. MATERIALI E METODI

3.1 La linea cellulare SH-SY5Y

La linea cellulare SH-SY5Y è un subclone fenotipicamente stabile derivato dal neuroblastoma umano chiamato SK-N-SH, esprime costitutivamente i recettori oppioidi μ e δ in rapporto di 5:1, i recettori cannabinoidi neuronale (CB1) e periferico (CB2) (127), i recettori sigma (σ_1 e σ_2), i recettori del glutammato sia ionotropi che metabotropici e il recettore NOP che sembrerebbe rappresentare il 40% del numero totale dei recettori oppioidi. Hanno piccoli corpi cellulari rotondi, citoplasma allungato, neuriti che assomigliano a processi citoplasmatici e formano densi aggregati (pseudogangli) (fig. 22). Questa linea cellulare dopaminergica è pertanto un buon modello in vitro per studiare i meccanismi attivati da sostanze d'abuso prese in esame. Le cellule crescono adese alla superficie della fiasca e sono state coltivate in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplementato con 10% di siero fetale bovino, 1% di una miscela di antibiotici e antimicotici (penicillina 100 IU/ml e streptomina 100 μ g/ml) e 2mM di glutamina in incubatore a 37°C e 5% di CO₂.

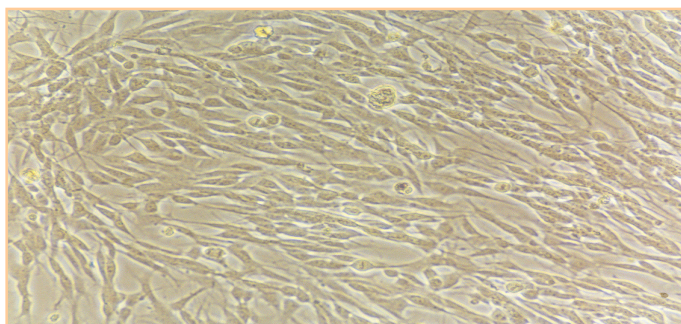


Fig. 22 Linea cellulare SH-SY5Y vista al microscopio elettronico.

3.2 Animali

Gli esperimenti sono stati condotti sul ratto. Sono stati utilizzati maschi del ceppo Wistar del peso di 200 ± 10 g. Gli animali sono stati alloggiati in gabbie di macrolon e sono stati alimentati con una dieta standard in pellets ed acqua liberamente disponibili, tranne nel periodo di trattamento, come descritto più avanti.

L'illuminazione è stata regolata in modo automatico in cicli di 12 ore di luce (7-19) e 12 ore di buio e la temperatura era mantenuta costante a 21 ± 2 °C. Per facilitare l'acclimatazione degli animali, si è lasciato trascorrere un periodo di una settimana nelle condizioni sopra descritte, prima del loro utilizzo sperimentale.

3.3 Trattamenti

Linea cellulare SH-SY5Y:

- a) le cellule sono state esposte a quattro diverse concentrazioni di Δ^9 -THC (50, 100, 150, 200 nM) per 24 ore o pretrattate con AM251 20 minuti prima dell'esposizione a Δ^9 -THC 200 nM per 24 ore;
- b) le cellule sono state esposte a due diverse concentrazioni di fentanil e morfina (1 e 10 μ M) per 24 ore e trattate contemporaneamente con l'antagonista naloxone (500 μ M) e il fentanil per 24 ore.

Animali: i ratti sono stati resi fisicamente dipendenti da etanolo mediante dieta liquida, gli animali sono stati suddivisi in cinque gruppi: naive, alimentati con dieta liquida con aggiunta del 20% di etanolo per i due gruppi dei dipendenti e alimentati con dieta liquida senza etanolo per i due gruppi dei non dipendenti (veicoli). Gli animali hanno ricevuto somministrazioni intragastriche con dosi intossicanti di etanolo o veicolo per

sei giorni. Il primo giorno sono stati somministrati un totale di 12 g/Kg di etanolo in 5 dosi ogni 4 ore. Il secondo giorno, 8 ore dopo l'ultima somministrazione, i ratti hanno ricevuto un totale di 10g/Kg di etanolo o veicolo, in 4 dosi ogni 4 ore. Questo schema di trattamento è stato ripetuto per i successivi 4 giorni. Gli animali sono stati sacrificati in due tempi diversi: dopo 1 settimana e dopo 3 settimane di astinenza da alcol (fig. 23).

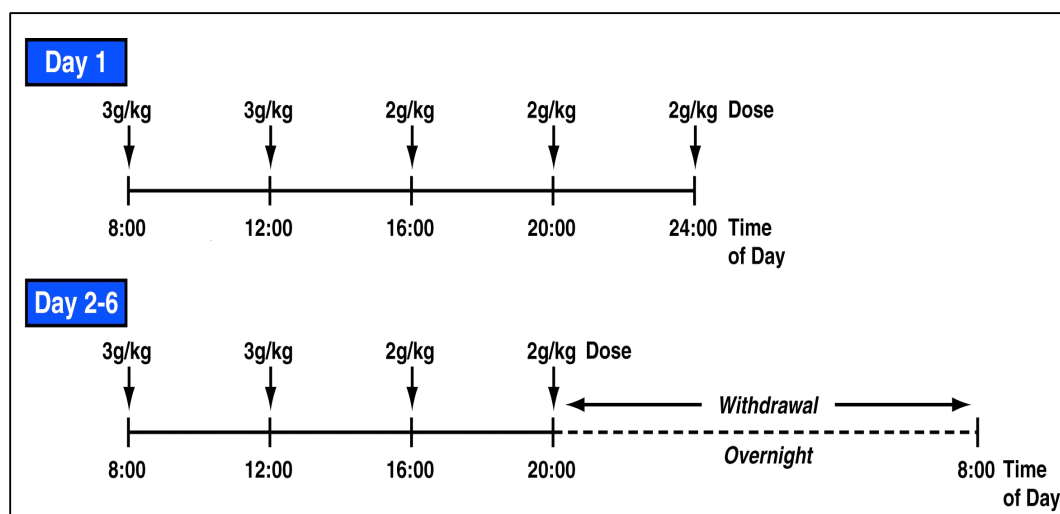


Fig. 23 Schema di trattamento per l'induzione dell'alcolismo.

3.4 Prelievo dei tessuti

Al termine del trattamento cronico, i ratti sono stati sacrificati per decapitazione, i cervelli rapidamente immersi in isopentano freddo, le aree cerebrali di interesse (Corteccia Prefrontale, Amigdala, Ipotalamo, BNST e Setto Laterale) sono state successivamente prelevate mediante la tecnica del punching e conservate a -80°C fino al loro utilizzo.

3.5 Estrazione di RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule e dalle aree cerebrali secondo la metodica di Chomczynski e Sacchi (132): i campioni sono stati inizialmente trattati con una soluzione contenente fenolo e guanidinio isotiocianato, denominata OMNIzol.

E' stato poi aggiunto cloroformio alla concentrazione finale del 10%, si è agitato vigorosamente e poi per favorire la separazione delle fasi organica e acquosa si è lasciato in ghiaccio per 5 minuti. L'omogenato è stato centrifugato per 15 minuti alla velocità di 12.000 giri/min. a 4 °C. Dopo la centrifuga, il campione forma due fasi: una inferiore organica gialla, contenente il fenolo, ed una superiore acquosa incolore contenente l'RNA. Successivamente, viene prelevata la fase acquosa il cui volume è circa la metà di quello iniziale e ad essa viene aggiunto un uguale volume di isopropanolo per facilitare la precipitazione dell'RNA, il tutto viene lasciato per 15 minuti a 4 °C. Dopo aver agitato vigorosamente per qualche secondo, la seconda centrifuga viene fatta per 15 minuti alla velocità di 12.000 giri/minuto sempre a 4 °C. In tal modo l'RNA totale resta stratificato in fondo al tubo in forma di un piccolo pellet. Al termine della centrifuga il surnatante viene allontanato e il pellet lavato con etanolo al 75% (circa 1 ml) e si centrifuga nuovamente per 10 minuti alla velocità di 12.000 giri/minuti a 4 °C. Alla fine della procedura si lascia asciugare il pellet per 10-15 minuti e poi viene sciolto in 15µl di acqua RNAasi e DNAasi free. Si agita sino a completa dissoluzione del pellet e poi si conservava a -80 °C. La concentrazione di RNA è stata determinata mediante lettura spettrofotometrica misurando l'assorbanza a 260 nm (1 O.D./ml = 40 µg RNA totale/ml) e a 280 nm e il rapporto delle assorbanze 260/280 era >2.0 e l'integrità è stata verificata su gel di agarosio 1%.

3.6 Quantificazione di RNA messaggero mediante RT-PCR

Il DNA complementare (cDNA) è stato ottenuto a partire da RNA secondo il protocollo del kit Superscript First Strand Synthesis System dell'Invitrogen. Si è proceduto poi con l'amplificazione del cDNA utilizzando la Platinum Taq DNA Polymerase in presenza di specifici primer per NOP e L19 utilizzato come standard interno. I primer da noi disegnati sono stati prodotti dalla Invitrogen Life Technologies, hanno le sequenze sotto riportate e amplificavano un frammento di 198bp per la proteina L19 e 330 bp per il NOP.

| | |
|------------------------|----------------------------|
| NOP for (5'–3') | CGC TGT GAC AGA CAG TCA TT |
| NOP rev (5'–3') | ACA GAG ATG ACG AGC ACG G |
| L19 for (5'–3') | CTA GTG TCC TCC GCT GTG G |
| L19 rev (5'–3') | AAG GTG TTT TTC CGG CAT C |

Le condizioni di amplificazione sono state: 30 sec a 94 °C, 30 sec a 60 °C e 1 min per 72 °C per 34 cicli.

I prodotti risultanti dalla PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

3.7 Real Time PCR

Il cDNA diluito è utilizzato come utilizzato templatò nella reazione di Real-Time PCR (circa 5 ng totali di cDNA per reazione) condotta in 20 uL con SYBR GREEN Master Mix della Roche. L'abbondanza di mRNA dei vari trascritti è stata quantificata come differenze di Ct tra il gene target e il gene controllo. L'espressione genica relativa è

stata calcolata mediante il metodo del delta-delta Ct e convertita mediante la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ per l'analisi statistica. Tutti i dati sono stati normalizzati prima con l'espressione del gene di controllo interno gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) e poi con il gruppo naive (non trattati).

3.8 Binding recettoriale

I campioni provenienti dalla linea cellulare SH-SY5Y sono stati sonicati in 5ml di buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 2 mM, PMSF 100 mM) e centrifugati a 1500 x g per 10 minuti a 4 °C per eliminare i residui cellulari. I surnatanti sono stati nuovamente centrifugati a 19.000 x g per 25 minuti e i pellets risospesi in 10 volumi di buffer A. Aliquote di questa sospensione di membrane sono state utilizzate per la determinazione della concentrazione proteica utilizzando il metodo di Lowry (133). Dopo il prelievo delle aliquote necessarie per la determinazione della concentrazione proteica, alla sospensione finale è stata aggiunta albumina bovina (BSA, 1 mg/ml) e le membrane sono state immediatamente utilizzate per il binding. La reazione di binding è stata condotta in buffer B (buffer A con aggiunta di BSA allo 0.1%), in un volume finale di 0,25 ml contenente 500 µg di proteine. Gli esperimenti di competizione sono stati effettuati in presenza di [leucyl-³H]-N/OFQ 1 nM (attività specifica 164 Ci/mM; Amersham Biosciences).

Le curve di saturazione sono state ottenute incubando i campioni con [leucyl-³H]-N/OFQ a otto diverse concentrazioni (0.05-12 nM) per un'ora. Il binding non specifico è stato determinato in presenza di N/OFQ alla concentrazione di 5 µM.

Le curve di competizione sono state ottenute usando N/OFQ non marcata (Bachem) a nove differenti concentrazioni usando un intervallo compreso tra 10pM e 10µM. I tubi da saggio, infine, sono stati incubati a 25°C per 1ora.

La reazione è stata terminata con l'aggiunta di 3ml di buffer C (Tris-HCl 50 mM e BSA allo 0.1%) a 4°C seguita da filtrazione sotto vuoto su filtri GF-B (Schleicher & Schuell), previamente immersi in buffer C addizionato di polietilenimina allo 0,3 % per almeno 3 ore. I filtri, sui quali rimangono trattenuti i complessi recettore-ligando marcato, e i tubi sono stati lavati per due volte con 3 ml di tampone C a 4°C.

Infine, dopo l'aggiunta di 4 ml di liquido di scintillazione (Filter Count, Packard), la radioattività presente nei filtri viene contata utilizzando un contatore di emissioni β , Beckman LS170. I risultati sono stati elaborati mediante il software GraphPad Prism 3.02.

3.9 Analisi statistica

I risultati sperimentali sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (One Way Anova ANOVA) seguita dal test di Dunnett per gli studi condotti in vitro o dal test di Newman Keuls per gli studi condotti in vivo.

I dati derivanti dagli esperimenti sono riportati come medie \pm errore standard, per gli studi in vitro come variazioni percentuali dei controlli posti pari a cento e per gli studi in vivo come variazioni rispetto ai controlli posti pari ad uno.

Il livello di significatività statistica è stato posto a $p < 0.05$, $p < 0.01$.

4. RISULTATI

4.1 Effetti del Δ^9 -THC sull'espressione genica di NOP nelle cellule SH-SY5Y

Gli studi di espressione genica, condotti mediante RT-PCR, mostrano una diminuzione dose-dipendente dei livelli di mRNA codificanti per il recettore NOP.

In particolare, dopo esposizione alle concentrazioni 50 e 100 nM di Δ^9 -THC per 24 ore non si verifica nessuna variazione statisticamente significativa (rispettivamente $95.0 \pm 4.5\%$ e $81.5 \pm 6.3\%$ vs controlli $100 \pm 3.5\%$), una diminuzione statisticamente significativa della biosintesi di NOP si verifica dopo esposizione alle concentrazioni 150 e 200 nM di Δ^9 -THC (rispettivamente $**71.0 \pm 5.7\%$, $**65.0 \pm 4.7\%$, $**p < 0.01$ vs controlli $100 \pm 3.5\%$; fig. 24). Il pretrattamento con l'antagonista AM251 (selettivo CB1) alla concentrazione di 1 μ M 20 minuti prima dell'esposizione a Δ^9 -THC per 24 ore, abolisce l'effetto del Δ^9 -THC sull'espressione genica di gene NOP (rispettivamente $91.7 \pm 3.1\%$, $100.6 \pm 10.1\%$, $110.0 \pm 3.3\%$, $101.1 \pm 3.2\%$, per le concentrazioni 50, 100, 150 e 200 nM di Δ^9 -THC per 24 ore vs controlli $100 \pm 2.15\%$). Il trattamento con il solo AM251 alla concentrazione di 1 μ M per 24 ore non ha effetto sulla biosintesi del recettore NOP ($116.8 \pm 14.2\%$ vs controlli $100 \pm 2.15\%$; fig. 25).

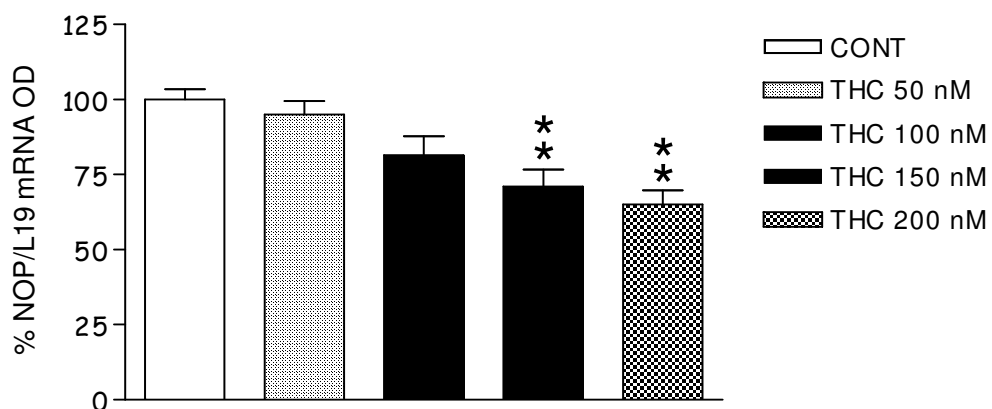


Fig. 24 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP in cellule SH-SY5Y controllo e trattate Δ^9 -THC. Le cellule sono state esposte a quattro diverse concentrazioni di Δ^9 -THC: 50, 100, 150 and 200 nM per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100. $**p < 0.01$ vs controlli.

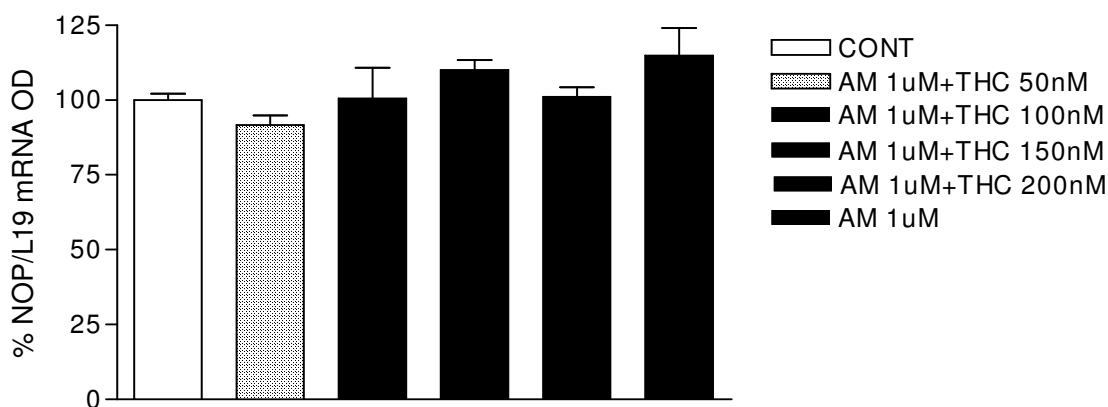


Fig. 25 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP in cellule SH-SY5Y controllo, pretrattate con AM251 1 μ M 20 minuti prima di aggiungere Δ^9 -THC 50, 100, 150 e 200 nM per 24 ore e trattate con AM251 1 μ M per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100.

4.2 Effetti del Δ^9 -THC sulla densità recettoriale di NOP nelle cellule SH-SY5Y

Dagli studi di binding di saturazione si sono ottenuti i seguenti parametri:

K_d (nM) = 1.07 ± 0.3 and B_{max} (fmol/mg prot) = 19.0 ± 1.9 , per un singolo sito di legame (fig. 26).

Gli studi di binding per competizione mostrano che il Δ^9 -THC è in grado di influenzare la densità recettoriale di NOP nella line cellulare SH-SY5Y, infatti si osserva una diminuzione dose dipendente della B_{max} del recettore NOP. In particolare, dopo esposizione alla concentrazione 50 nM di Δ^9 -THC per 24 h non si verifica nessuna variazione ($95.0 \pm 2.7\%$ vs controls $100 \pm 3.2\%$), una significativa down-regulation della densità recettoriale di NOP si verifica dopo esposizione alla concentrazione 100 nM ($73.2 \pm 4.1\%$ vs controlli $100 \pm 4.2\%$, * $p < 0.05$), 150 nM ($67.0 \pm 5.1\%$ vs controlli $100 \pm 4.9\%$, ** $p < 0.01$) e 200 nM di Δ^9 -THC per 24 ore ($62.1 \pm 5.2\%$ vs controlli $100 \pm 3.9\%$, ** $p < 0.01$; fig. 27). L'effetto del Δ^9 -THC sulla densità recettoriale di NOP è abolita dal pretrattamento con l'antagonista CB1 selettivo AM251 1 μ M, 30 minuti prima di esporre le cellule alla concentrazione 200 nM di Δ^9 -THC ($78.0 \pm 7.4\%$ vs controlli $100 \pm 7.2\%$) e il trattamento con la concentrazione 1 μ M di AM251 da solo per 24 h, non influenza la densità recettoriale di NOP ($102.7 \pm 4.6\%$ vs controls $100 \pm 7.2\%$; fig. 28).

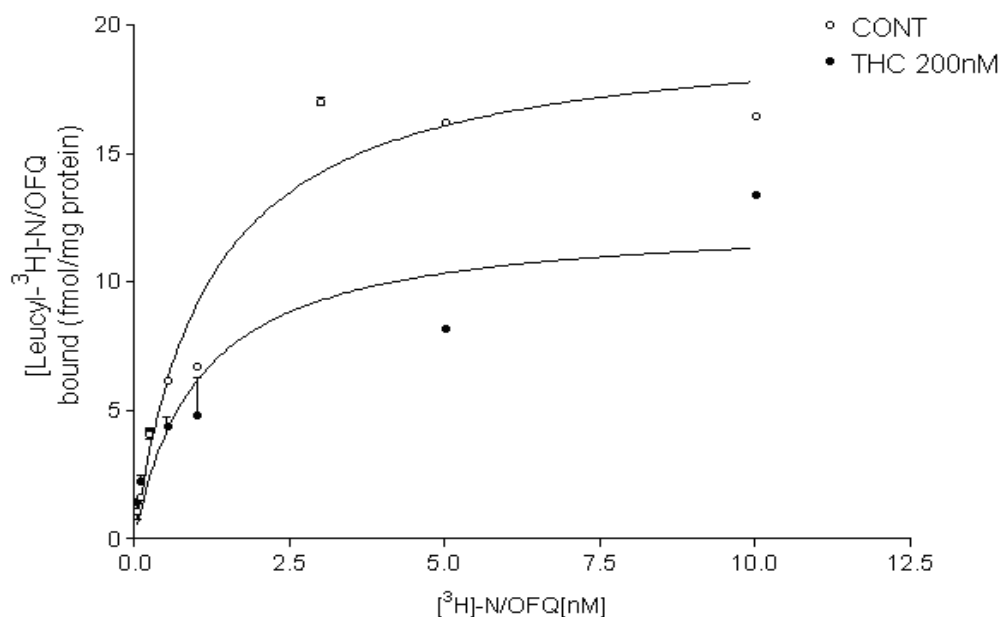


Fig. 26 Curva di saturazione ottenuta dal binding di [leu-³H]-N/OFQ (nocicettina) al recettore NOP in membrane preparate dalle cellule SH-SY5Y esposte a Δ^9 -THC 200 nM per 24 ore.

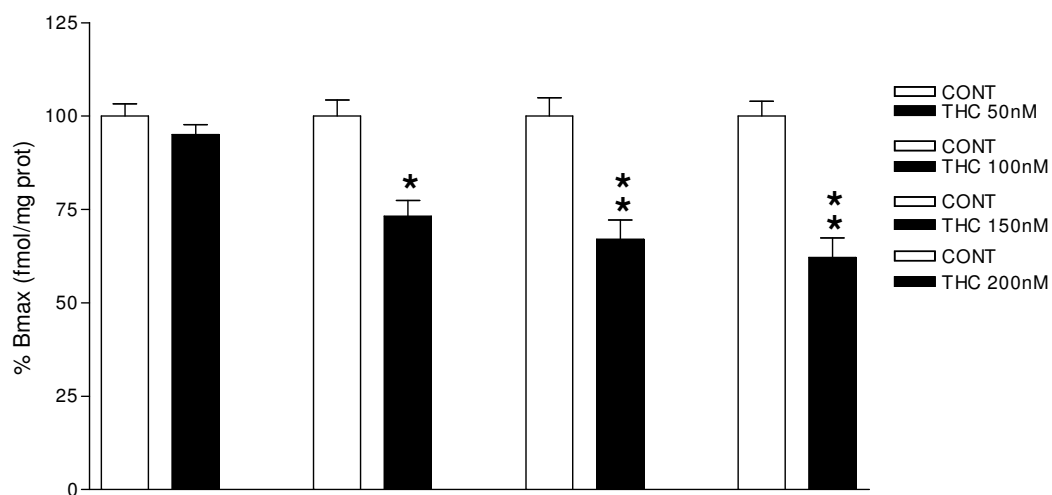


Fig. 27 Variazione nella Bmax del recettore NOP in cellule SH-SY5Y controllo e trattate Δ^9 -THC. Le cellule sono state esposte a quattro diverse concentrazioni di Δ^9 -THC: 50, 100, 150 and 200 nM per 24ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs controlli.

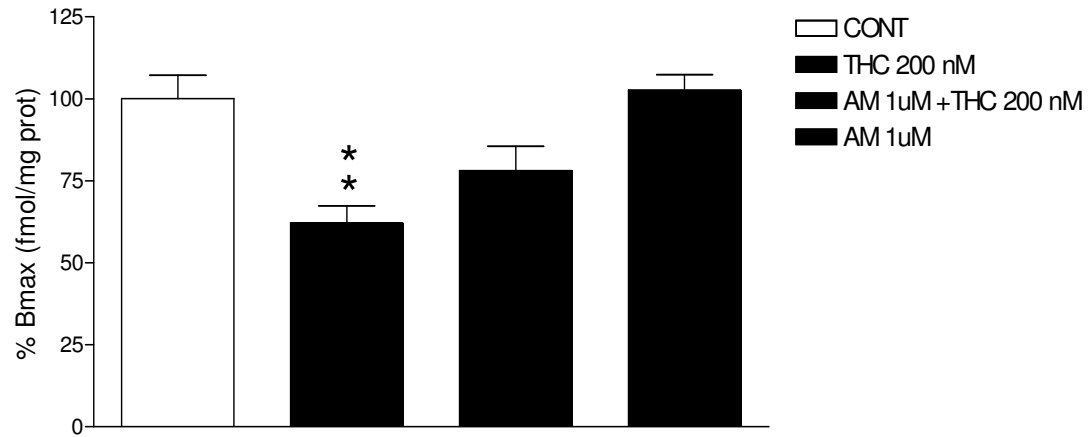


Fig. 28 *Variazione nella Bmax del recettore NOP in cellule SH-SY5Y controllo, trattate con Δ^9 -THC. 200 nM per 24 ore, con AM251 1 μ M 20 minuti prima di aggiungere Δ^9 -THC. 200 nM per 24 ore e con AM251 1 μ M per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100. ** $p < 0.01$ vs controlli.*

4. 3 Effetti della morfina sull'espressione genica di NOP e MOP nelle cellule SH-SY5Y

Gli studi di espressione genica, condotti mediante RT-PCR, non mostrano variazioni statisticamente significative nella biosintesi del recettore NOP, nella linea cellulare SH-SY5Y, dopo trattamento con morfina alle concentrazioni 1 e 10 μM (rispettivamente $84.3 \pm 10.3\%$ e 78.0 ± 7.30 vs controlli $100.0 \pm 1.6\%$; fig. 29).

Nelle medesime condizioni sperimentali non vi è variazione statisticamente significativa nella biosintesi del recettore MOP ($94.3 \pm 7.8\%$ e $98.6 \pm 18.1\%$ vs controlli $100.0 \pm 6.7\%$; fig. 30)

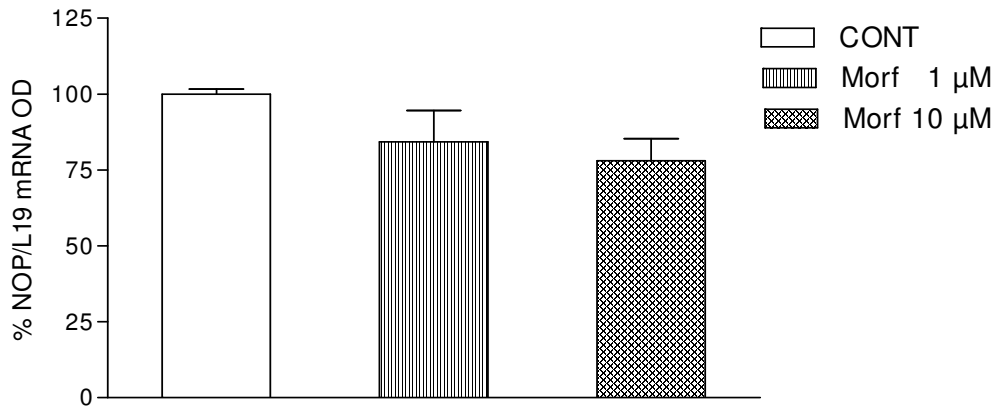


Fig. 29 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP in cellule SH-SY5Y controllo e trattate con morfina. Le cellule sono state esposte alle concentrazioni di morfina 1 e 10 μ M per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100.

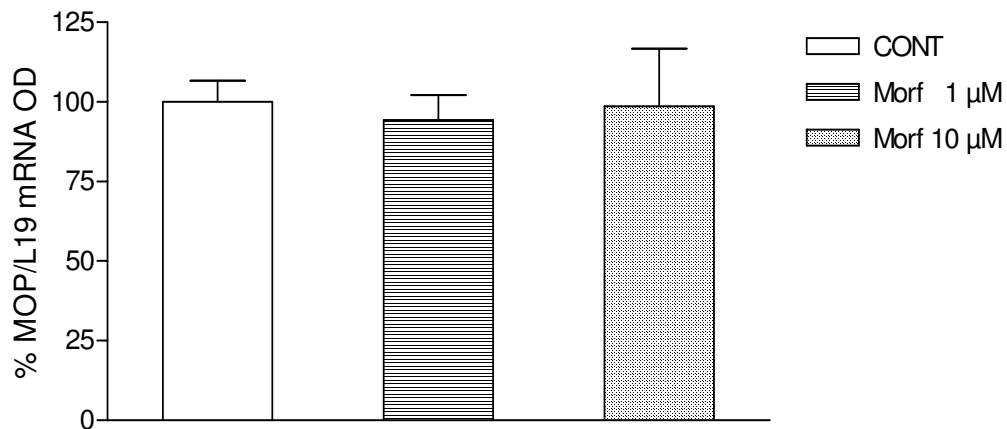


Fig. 30 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore MOP in cellule SH-SY5Y controllo e trattate con morfina. Le cellule sono state esposte alle concentrazioni di morfina 1 e 10 μ M per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100.

4. 4 Effetti del fentanil sull'espressione genica di NOP e MOP nelle cellule SH-SY5Y

Gli studi di espressione genica, condotti mediante RT-PCR, mostrano una diminuzione della biosintesi del recettore NOP, nella linea cellulare SH-SY5Y, dopo trattamento con fentanil alle concentrazioni 1 e 10 μM (rispettivamente $88.9 \pm 7.6\%$ e $70.6 \pm 5.8\%$ vs controlli $100.0 \pm 5.5\%$, $**p < 0.01$; fig. 31).

Nelle medesime condizioni sperimentali vi è una diminuzione anche della biosintesi del recettore MOP ($101.3 \pm 12.9\%$ e $144.0 \pm 9.7\%$ vs controlli $100.0 \pm 2.4\%$, $**p < 0.01$). Il pretrattamento con l'antagonista naloxone alla concentrazione di 500 μM , abolisce l'effetto del fentanil sull'espressione genica di gene MOP ($87.33 \pm 2.9\%$ vs controlli $100.0 \pm 2.4\%$). Il trattamento con il solo naloxone alla concentrazione di 500 μM per 24 ore non ha effetto sulla biosintesi del recettore MOP ($95.0 \pm 9.8\%$ vs controlli $100 \pm 2.4\%$; fig. 32).

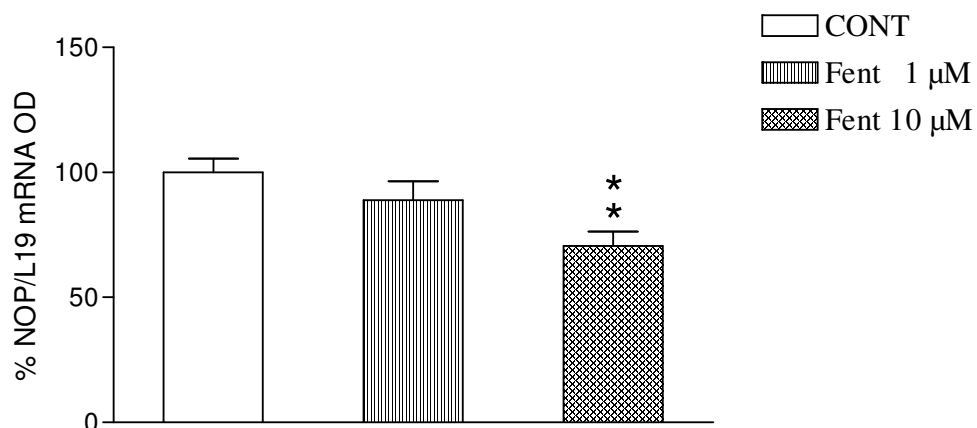


Fig.31 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP in cellule SH-SY5Y controllo e trattate con fentanil. Le cellule sono state esposte alle concentrazioni di morfina 1 e 10 μM per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100. ** $p < 0.01$ vs controlli

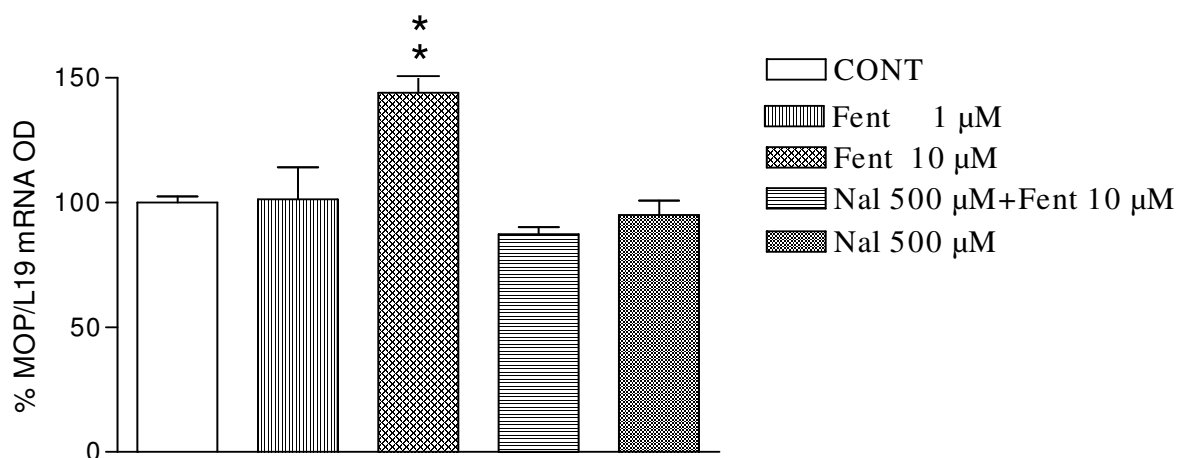


Fig. 32 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore MOP in cellule SH-SY5Y controllo, trattate con fentanil 1 e 10 μM per 24 ore, con naloxone 500 μM e fentanil 10 μM per 24 ore, infine con naloxone 500 μM per 24 ore. I dati sono presentati come variazioni percentuali rispetto ai controlli posti pari a 100. ** $p < 0.01$ vs controlli

4.5 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nell'amigdala

Gli studi di espressione genica, condotti mediante real time PCR, non mostrano alterazioni della biosintesi del recettore NOP nell'amigdala nei ratti naive, nei ratti trattati con veicolo ed in astinenza da etanolo dopo una e tre settimane (naive 1.04 ± 0.11 , veicolo una settimana 1.19 ± 0.15 , deprivati una settimana 1.42 ± 0.06 , veicolo tre settimane 1.32 ± 0.13 e deprivati tre settimane 1.43 ± 0.09 ; fig. 33).

Nelle medesime condizioni sperimentali vi è aumento statisticamente significativo della biosintesi del neuropeptide nocicettina dopo tre settimane di astinenza da alcol (naive 1.04 ± 0.11 , veicolo una settimana 1.09 ± 0.10 , deprivati una settimana 1.20 ± 0.12 , veicolo tre settimane 1.15 ± 0.15 e deprivati tre settimane 1.67 ± 0.19 ; * $p < 0.05$ vs naive e $\bullet p < 0.05$ vs veicolo; fig. 34).

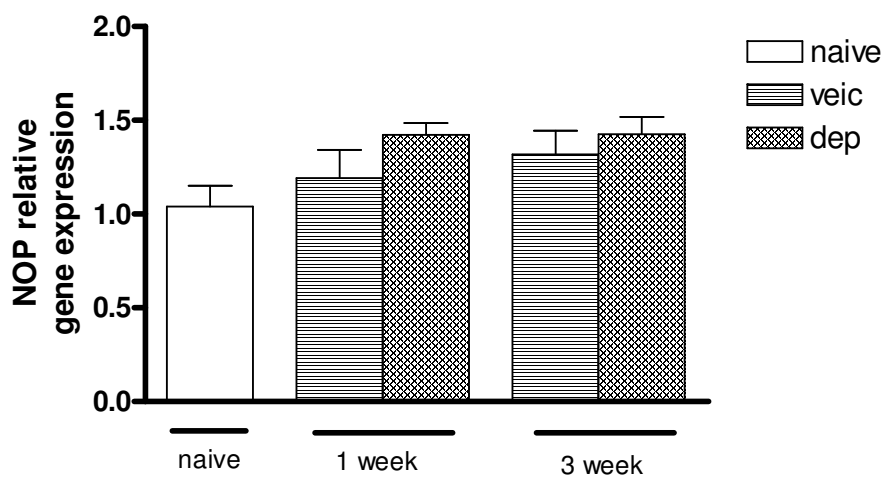


Fig. 33 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nell'amigdala in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

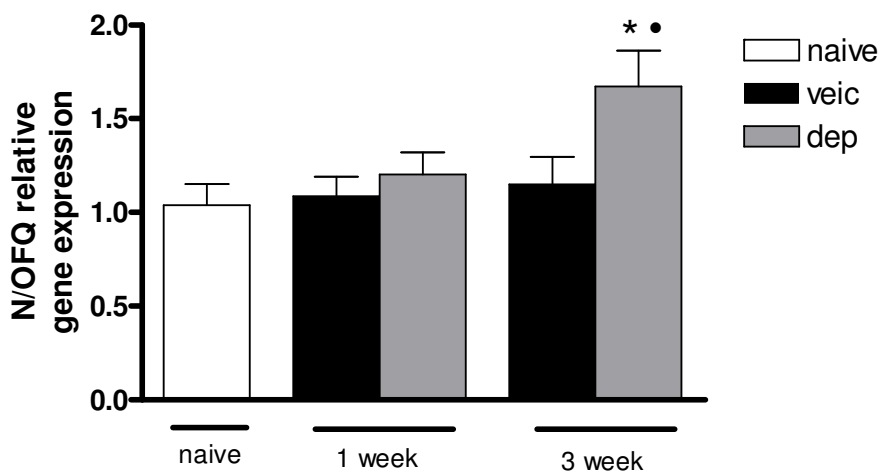


Fig. 34 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il peptide N/OFQ nell'amigdala in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive. * $p < 0.05$ vs naive e • $p < 0.05$ vs veicolo

4.6 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nella corteccia prefrontale

Gli studi di espressione genica, condotti mediante real time PCR, non mostrano alterazioni della biosintesi del recettore NOP nella corteccia prefrontale nei ratti naive, nei ratti trattati con veicolo ed in astinenza da etanolo dopo una e tre settimane (naive 1.01 ± 0.04 , veicolo una settimana 1.04 ± 0.06 , deprivati una settimana 1.05 ± 0.06 , veicolo tre settimane 1.12 ± 0.04 e deprivati tre settimane 1.14 ± 0.04 ; fig. 35).

Nelle medesime condizioni sperimentali non vi è variazione della biosintesi del neuropeptide nocicettina (naive 1.01 ± 0.06 , veicolo una settimana 1.02 ± 0.04 , deprivati una settimana 1.13 ± 0.03 , veicolo tre settimane 1.01 ± 0.04 e deprivati tre settimane 1.00 ± 0.03 ; fig. 36).

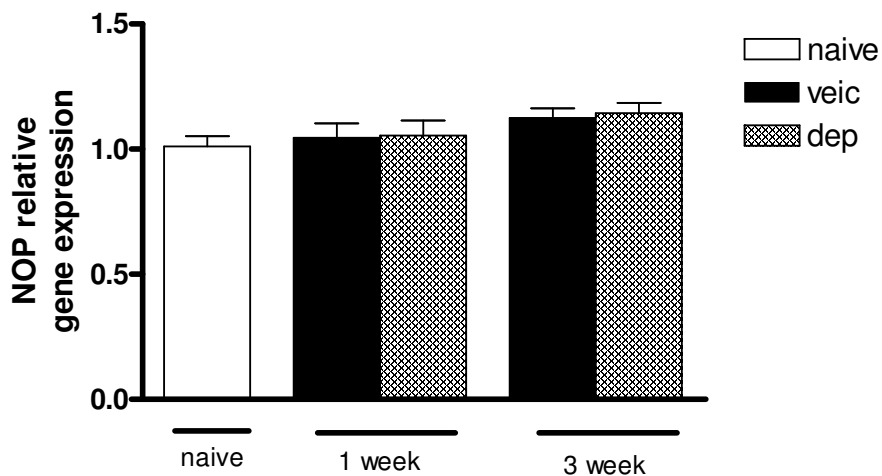


Fig. 35 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nella corteccia prefrontale in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

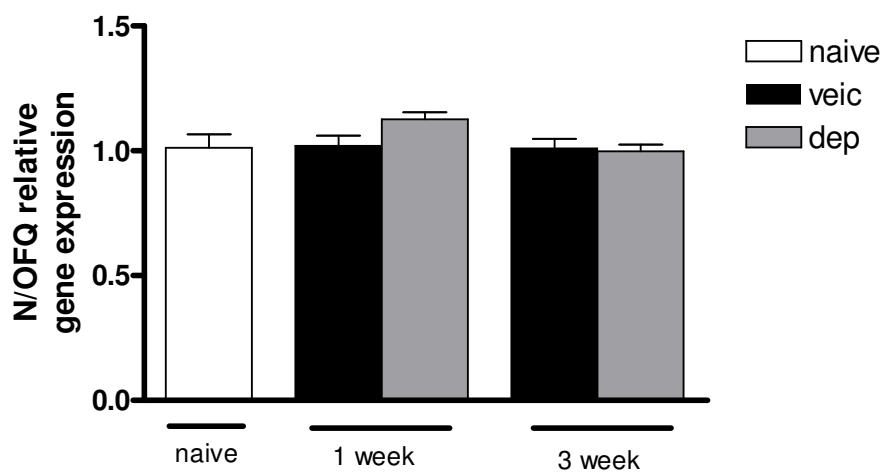


Fig. 36 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il peptide N/OFQ nella corteccia prefrontale in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

4.7 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nel BNST

Gli studi di espressione genica, condotti mediante real time PCR, mostrano un aumento statisticamente significativo della biosintesi del recettore NOP nel BNST nei ratti in astinenza da alcol dopo una e tre settimane (naive 1.02 ± 0.07 , veicolo una settimana 1.21 ± 0.13 , deprivati una settimana $^{**}/^{**}$ 1.82 ± 0.18 , veicolo tre settimane 0.85 ± 0.09 e deprivati tre settimane $^{*}/^{**}$ 1.56 ± 0.07 ; $^{*}p < 0.05$ e $^{**}p < 0.05$ vs naive; $^{**}p < 0.01$ vs veicolo fig. 37).

Nelle medesime condizioni sperimentali non vi è variazione statisticamente significativa della biosintesi del neuropeptide nocicettina (naive 1.02 ± 0.08 , veicolo una settimana 1.70 ± 0.17 , deprivati una settimana 1.84 ± 0.25 , veicolo tre settimane 1.24 ± 0.16 e deprivati tre settimane 1.46 ± 0.14 ; fig. 38).

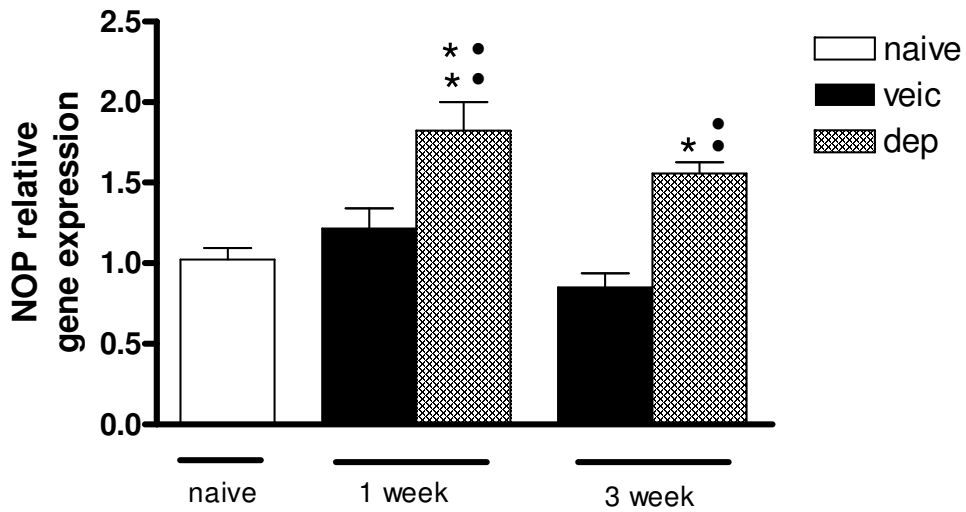


Fig. 37 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nel BNST in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs naive; •• $p < 0.01$ vs veicolo

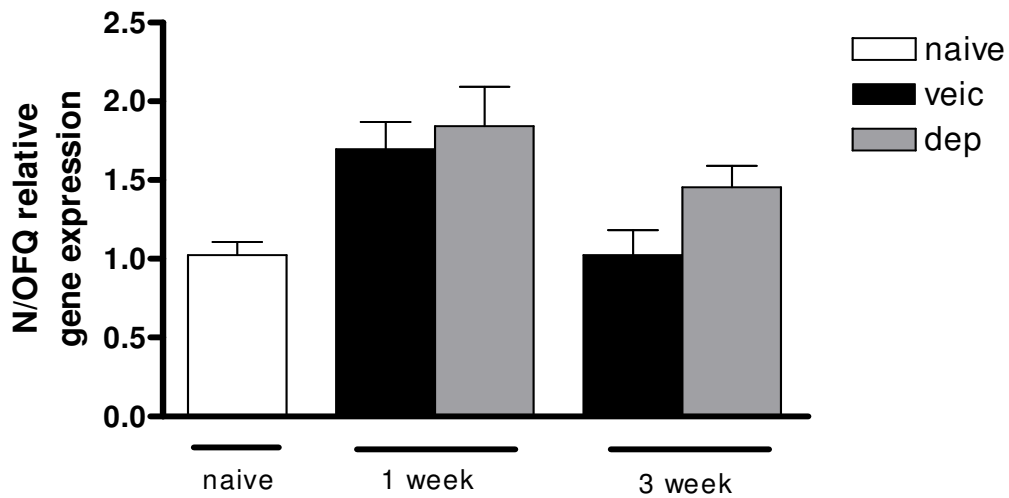


Fig. 38 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il peptide N/OFQ nella BNST in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

4.8 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nell'ipotalamo

Gli studi di espressione genica, condotti mediante real time PCR, mostrano un aumento statisticamente significativo della biosintesi del recettore NOP nell'ipotalamo nei ratti in astinenza da etanolo dopo una e tre settimane (naive 1.01 ± 0.05 , veicolo una settimana $**1.47 \pm 0.10$, deprivati una settimana $**1.56 \pm 0.07$, veicolo tre settimane 1.12 ± 0.10 e deprivati tre settimane $**/\bullet\bullet 1.50 \pm 0.10$; $**p < 0.05$ vs naive; $\bullet\bullet p < 0.01$ vs veicolo; fig. 39).

Nelle medesime condizioni sperimentali non vi è variazione della biosintesi del neuropeptide nocicettina dopo tre settimane di astinenza da alcol (naive 1.01 ± 0.04 , veicolo una settimana 1.25 ± 0.04 , deprivati una settimana 1.26 ± 0.12 , veicolo tre settimane 1.0 ± 0.11 e deprivati tre settimane 0.98 ± 0.06 ; fig. 40).

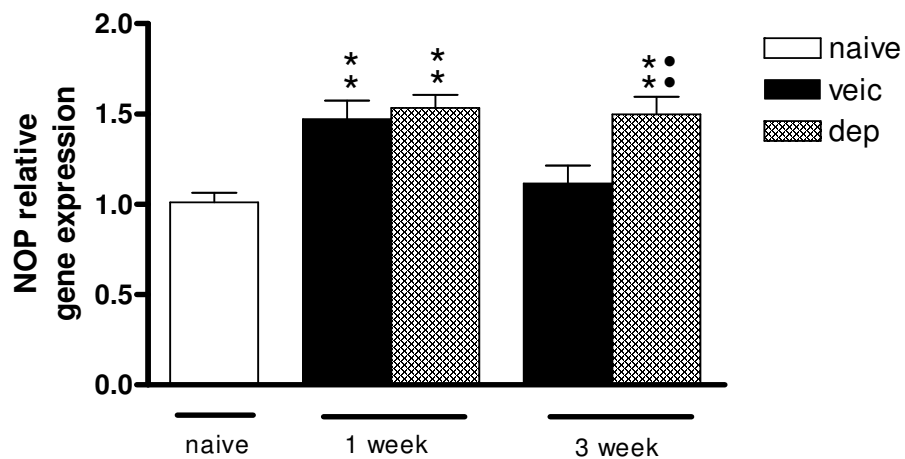


Fig. 39 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nell'ipotalamo in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive. ** $p < 0.01$ vs naive; •• $p < 0.01$ vs veicolo

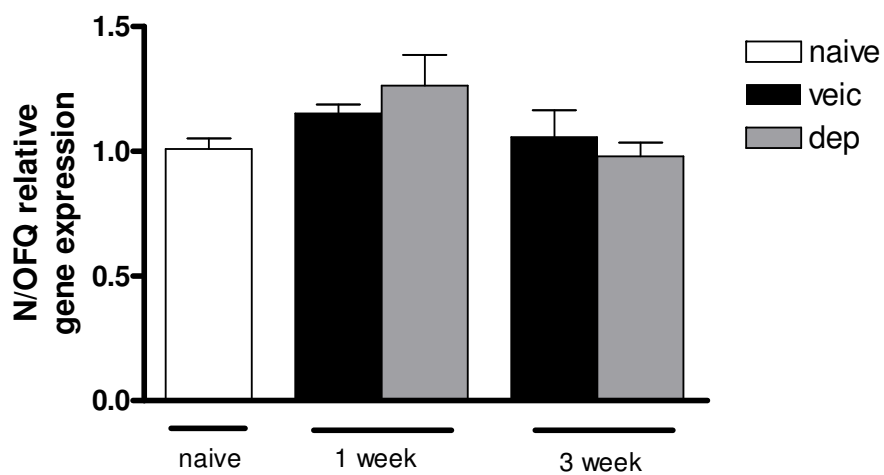


Fig. 40 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il peptide N/OFQ nell'ipotalamo in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

4.9 Effetti dell'astinenza da alcol sull'espressione genica del sistema nocicettina/NOP nel setto laterale

Gli studi di espressione genica, condotti mediante real time PCR, non mostrano alterazioni statisticamente significative della biosintesi del recettore NOP nel lateral septum nei ratti naive, nei ratti trattati con veicolo ed in astinenza da etanolo dopo una e tre settimane (naive 1.01 ± 0.06 , veicolo una settimana 0.93 ± 0.06 , deprivati una settimana 0.98 ± 0.05 , veicolo tre settimane 1.02 ± 0.06 e deprivati tre settimane 1.02 ± 0.05 ; fig. 41).

Nelle medesime condizioni sperimentali non vi è variazione statisticamente significativa della biosintesi del neuropeptide nocicettina (naive 1.01 ± 0.04 , veicolo una settimana 0.99 ± 0.04 , deprivati una settimana 1.00 ± 0.04 , veicolo tre settimane 1.00 ± 0.05 e deprivati tre settimane 0.99 ± 0.07 ; fig. 42).

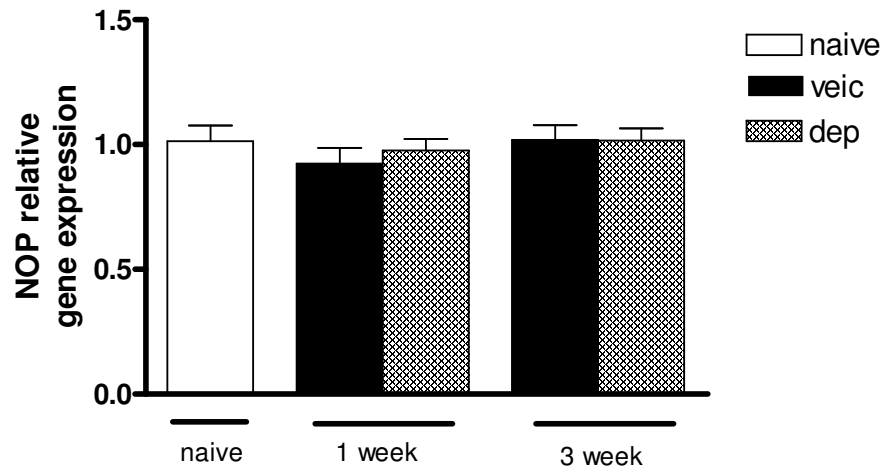


Fig. 41 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il recettore NOP nel setto laterale in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

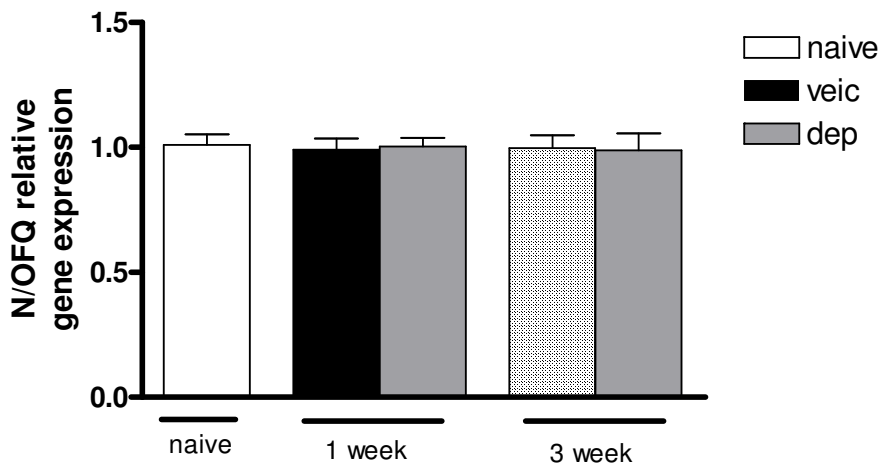


Fig. 42 Variazione dei livelli di mRNA codificante per il peptide N/OFQ nel setto laterale in ratti naive, veicolo o in astinenza da alcol dopo una e tre settimane. I dati sono presentati come variazioni rispetto ai naive.

5. DISCUSSIONE

Coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP negli effetti mediati dal Δ^9 -THC

Nell'ambito degli studi sugli effetti dei farmaci d'abuso è ampiamente documentata l'esistenza di numerose interazioni tra differenti sistemi neurotrasmettitoriali classici e specifici sistemi peptidergici. In questo contesto si inserisce il sistema recettoriale nocicettina/NOP che dal punto di vista strutturale è correlato al sistema oppioide ma dal punto di vista funzionale svolge un ruolo antioppiode (36).

La nocicettina esercita a livello soprasspinale un effetto iperalgesico, antagonizza l'analgesia indotta da morfina, è anche in grado di diminuire la liberazione di dopamina nel nucleo accumbens sempre indotta da morfina e studi precedenti mostrano variazioni nel SNC di ratto dei livelli della biosintesi del precursore della nocicettina in seguito a trattamento acuto e cronico con morfina (70,71). Oltre ad avere un ruolo importante nella trasmissione degli impulsi nocicettivi il sistema recettoriale nocicettina/NOP, risulta coinvolto in numerose funzioni biologiche tra cui, il comportamento alimentare, i meccanismi di stress/ansia, i processi cognitivi e di memoria, l'attività locomotoria spontanea, i meccanismi di ipereccitabilità neuronale e gli effetti indotti da farmaci d'abuso. A questo proposito negli ultimi anni sono stati studiati i possibili effetti di differenti farmaci d'abuso sul sistema oppioide endogeno e recenti studi hanno dimostrato che il sistema oppioide e quello cannabinoide condividono un simile profilo farmacologico, inoltre il sistema oppioide è coinvolto

nella regolazione di alcuni effetti evocati dai cannabinoidi, come l'analgesia, gli effetti gratificanti, le risposte immunologiche o i meccanismi di stress/ansia (119,120).

Il Δ^9 -THC, isolato a metà degli anni '60, è il maggior costituente psicoattivo della Cannabis Sativa e deve le sue azioni sul SNC e periferico, nonché sul sistema immunitario, alla capacità di attivare 2 recettori specifici di membrana, i recettori cannabinoidi CB1 e CB2, mimando in tal modo l'azione di due neurotrasmettitori endogeni: l'N-arachidoniletanolamina (anandamide) e il 2-arachidonilglicerolo. L'effetto analgesico indotto dal Δ^9 -THC, suscita da sempre interesse scientifico per il suo possibile utilizzo terapeutico e recenti studi hanno dimostrato che tale effetto è in parte mediato dai recettori oppioidi δ e κ . In seguito al trattamento con Δ^9 -THC si osserva inoltre un up-regulation dei recettori oppioidi μ nel SNC di ratto e tali dati si aggiungono a quelli ottenuti in vivo dove si evidenzia che il Δ^9 -THC è in grado di aumentare l'effetto analgesico della morfina in modelli di dolore acuto e neuropatico (132). È chiara, quindi l'esistenza di una correlazione tra il sistema cannabinoide e quello oppioide. Sulla base della duplice interazione del sistema oppioide sia con il sistema cannabinoide che con il sistema nocicettina/NOP è stato indagato il possibile coinvolgimento del sistema neuropeptidergico nocicettina/NOP negli effetti indotti dal Δ^9 -THC. Gli studi sono stati condotti sulla linea cellulare SH-SY5Y derivante da un neuroblastoma umano e che esprime costitutivamente sia il recettore NOP che il recettore CB₁, sono state valutate le possibili variazioni biosintetiche e funzionali del recettore NOP mediante studi di espressione genica e di binding recettoriale. Le cellule sono state sottoposte a quattro diverse concentrazioni di Δ^9 -THC: 50, 100, 150 e 200 nM per 24 ore e dall'analisi condotta con RT-PCR si è osservata una diminuzione

dose-dipendente dei livelli di mRNA per il recettore NOP che diventa significativa alla dose di 150 nM. Questi risultati indicano che a seguito del trattamento con Δ^9 -THC si verifica una inibizione della biosintesi del recettore NOP. Il pretrattamento con l'antagonista CB₁ AM251 abolisce la diminuzione progressiva dei livelli di mRNA di NOP, confermando che sono proprio i meccanismi attivati dall'occupazione del recettore CB₁ che contribuiscono alla regolazione della biosintesi del recettore NOP. In accordo con gli studi di RT-PCR, gli studi di binding per competizione hanno permesso di verificare una riduzione dose-dipendente della densità recettoriale di NOP, si verifica una diminuzione statisticamente significativa della B_{max} già alla dose di 100 nM . suggerendo che il recettore vada incontro a desensibilizzazione. Il pretrattamento con l'antagonista CB₁ AM251 abolisce la diminuzione la down regulation della densità recettoriale di NOP, confermando che sono proprio i meccanismi attivati dall'occupazione del recettore CB₁ che contribuiscono alla regolazione del recettore della nocicettina.

In conclusione i dati ottenuti da questo studio sperimentale, indicano per la prima volta l'esistenza di interazioni fra il sistema cannabinoide e il sistema nocicettina/NOP suggerendo in tal senso un cross talk fra i recettori CB₁ e NOP e conferiscono al recettore NOP un ruolo cruciale negli effetti indotti dal THC.

Coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP negli effetti mediati da morfina e fentanil

Il problema principale legato all'uso prolungato e ripetuto delle sostanze d'abuso è l'insorgenza della tolleranza e della dipendenza fisica. La tolleranza caratterizzata da

una diminuita sensibilità alle sostanze d'abuso è il risultato dell'esposizione prolungata per cui è necessario assumerne una quantità sempre maggiore per produrre il medesimo effetto. Alla tolleranza si accompagna la dipendenza fisica che si manifesta con la sindrome di astinenza, in cui spiacevoli effetti fisici insorgono in seguito alla sospensione improvvisa della sostanza d'abuso o in seguito al trattamento con antagonisti specifici.

La tossicodipendenza (definita come drug addiction) è un disordine cronico caratterizzato da un comportamento compulsivo nella ricerca e nell'assunzione della sostanza d'abuso, dalla perdita del controllo nel limitarne l'assunzione e dall'insorgenza di stati emozionali negativi, quali disforia, ansia o irritabilità, quando viene meno l'accesso alla sostanza d'abuso. I farmaci d'abuso esplicano i loro effetti attraverso l'interazione con sistemi endogeni, un ruolo rilevante è rivestito dal sistema oppioide e negli ultimi anni assume un ruolo sempre più importante il sistema nocicettina/NOP di recente scoperta. Dal punto di vista strutturale il sistema nocicettina/NOP è correlabile al sistema oppioide, infatti esiste un'omologia superiore all'ottanta per cento tra la sequenza codificante per il recettore NOP e quella dei tre recettori oppioidi, ma nonostante ciò il recettore NOP non è in grado di interagire con i peptidi oppioidi e viceversa. Dal punto di vista funzionale il sistema N/OFQ-NOP svolge un ruolo antioppiode (36).

I farmaci d'abuso esplicano i loro effetti alterando alcuni sistemi endogeni neurotrasmettitoriali dando così luogo a fenomeni di adattamento neuronale. Le alterazioni dovute a esposizione limitate a farmaci d'abuso coinvolgono la funzionalità recettoriale, i sistemi di trasduzione del segnale e i secondi messaggeri. Esposizione

prolungate hanno effetti più profondi e interessano le chinasi, i fattori di trascrizione e la regolazione dell'espressione genica .

I farmaci oppiacei rappresentano oggi il più potente strumento per la terapia del dolore cronico ed esplicano la loro efficacia terapeutica mimando le azioni dei peptidi oppioidi endogeni ma il loro uso è reso difficoltoso proprio dallo sviluppo della tolleranza e della dipendenza (75,135). Studi sperimentali hanno evidenziato che tra i farmaci oppiacei, il fentanil è un potente agonista puro del recettore oppioide MOP ed è importante sottolineare che rispetto alla morfina ha un minore potenziale d'abuso e una ridotta frequenza di insorgenza della sindrome d'astinenza. A differenza della morfina, il fentanil è in grado di influenzare l'attività dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (136) e dei canali del potassio ATP-dipendenti, inoltre ha un minor effetto immunosoppressore. Ma l'aspetto più interessante è legato alla capacità del fentanil di internalizzare il recettore MOP. La teoria tradizionale attribuisce alla desensitizzazione e all'internalizzazione del recettore lo sviluppo della tolleranza agli oppiacei, tuttavia recenti studi ipotizzano che l'internalizzazione del recettore MOP possa rendere più veloce il riciclo del recettore, rendendolo nuovamente disponibile e questo potrebbe spiegare la ridotta tolleranza al fentanil rispetto alla morfina (140,143). E' stato anche osservato che l'azione analgesica della morfina può essere potenziata se somministrata insieme ad un agonista oppiaceo più potente, come ad esempio il fentanil (146).

Sulla base di queste premesse, per meglio comprendere i meccanismi legati allo sviluppo della tolleranza, sono stati indagati gli effetti del fentanil e della morfina sull'espressione genica dei recettori MOP e NOP nella linea cellulare SH-SY5Y che esprime costitutivamente sia il recettore MOP che il recettore NOP.

Le cellule sono state trattate con due differenti concentrazioni di fentanil e morfina 1 e 10 uM per 24. Dall'analisi condotta con l'RT-PCR, nelle cellule trattate con fentanil, si è osservato una up-regulation del recettore MOP alla concentrazione più alta e il pretrattamento con il naloxone, antagonista del recettore MOP, abolisce questo effetto, indicando la specificità d'azione del fentanil su questo recettore. Nelle medesime condizioni sperimentali emerge un dato interessante, infatti il fentanil sempre alla concentrazione più alta induce down-regulation del recettore NOP che ne è l'antagonista funzionale. Nelle cellule trattate con morfina, non si sono verificate variazioni statisticamente significative, riguardo l'espressione genica né del recettore NOP né del recettore MOP. Nel loro insieme i nostri dati sono in accordo con la letteratura per quel che riguarda la capacità del fentanil di indurre up-regulation del recettore, determinando un più veloce riciclo e quindi una maggior disponibilità dei recettori. La definizione dei meccanismi molecolari che sottendono l'azione analgesica del fentanil porterà ad un suo più razionale uso terapeutico nel trattamento del dolore riducendo anche il rischio dello sviluppo di tolleranza e dipendenza. Alla luce di ciò si confermerà l'ipotesi sempre più accertata che l'uso di analgesici oppiacei in condizioni di dolore cronico non attivi questi meccanismi di gratificazione che portano alla dipendenza.

In conclusione i dati emersi sul fentanil riguardo la capacità di internalizzazione del recettore μ , la up-regulation della biosintesi del recettore MOP e la down-regulation della biosintesi del recettore NOP, potrebbero spiegare almeno in parte il minor potenziale d'abuso e la minor frequenza di insorgenza della sindrome d'astinenza in seguito alla sospensione del trattamento con fentanil.

Coinvolgimento del sistema N/OFQ-NOP negli effetti mediati dall'alcol

L'alcol è tra le sostanze d'abuso maggiormente consumate e l'alcolismo è un disordine comportamentale caratterizzato dal consumo eccessivo di etanolo, dallo sviluppo di tolleranza e dipendenza, e dalla diminuzione delle normali funzioni sociali e occupazionali. L'alcol non possiede un proprio recettore target e per molto tempo si è ritenuto che agisse in modo aspecifico aumentando semplicemente la fluidità delle membrane cellulari neuronali (154). Ci sono crescenti evidenze che in realtà la dipendenza da alcol è un disordine cerebrale cronico la cui eziologia è multifattoriale e che il consumo incontrollato di etanolo ne è una conseguenza comportamentale. Gli studi condotti sino ad oggi indicano che produce i suoi effetti alterando direttamente diverse proteine neuronali e in particolare i recettori di diversi neurotrasmettitori (155). Si ritiene che la plasticità neuronale sia alla base della dipendenza da alcol anche se non si conosce il preciso meccanismo attraverso cui il consumo occasionale sfocia nell'abuso. Le regioni cerebrali importanti nel mediare gli effetti di rinforzo positivo all'alcol sono state ben identificate mediante studi neurofarmacologici. Il sistema mesocorticolimbico rappresenta la via dopaminergica maggiormente implicata nell'addiction da sostanze d'abuso (171), origina nell'area tegmentale ventrale (VTA) che proietta al nucleus accumbens (NAc) e alla corteccia prefrontale (PFC).

La regolazione dell'espressione genica è proprio uno dei meccanismi attraverso cui i farmaci d'abuso possono alterare i sistemi endogeni neurotrasmettitoriali dando luogo così a fenomeni di adattamento neuronale. A questo proposito riveste un ruolo rilevante il sistema oppioide e negli ultimi anni assume un ruolo sempre più

importante anche il sistema nocicettina/NOP di recente scoperta. Recenti studi in modelli animali evidenziano che il sistema nocicettina/NOP risulta coinvolto nei meccanismi di gratificazione attivati dalle sostanze da abuso e queste evidenze sono particolarmente consistenti nel caso dell'alcol. (210,211,212,213). Studi neuroanatomici e immunoistochimici hanno evidenziato che il sistema nocicettina/NOP è ampiamente distribuito nel S.N.C. in differenti strutture mesocorticolimbiche, incluse l'amigdala, il bed nucleus of the stria terminalis, il nucleus accumbens, e varie aree corticali coinvolte nella regolazione degli effetti motivazionali legati alle sostanze d'abuso. Studi in ratti geneticamente modificati msP (Marchigian Sardinian alcohol preferring rats) hanno dimostrato che somministrazioni intracerebroventricolari di nocicettina inibiscono la conditioned place preference indotta da etanolo, la self-administration di etanolo e il relapse (211,214,215,216).

L'esatto meccanismo attraverso cui la nocicettina esercita una funzione modulatoria sul consumo di alcol non è ancora stato chiarito. Considerando il ruolo svolto dal sistema dopaminergico e dal sistema oppioide nell'influenzare i comportamenti legati all'etanolo e considerando il ruolo modulatorio che svolge la nocicettina sull'attività dopaminergica e oppioide nel sistema mesocorticolimbico, si può ipotizzare che l'interazione del sistema nocicettina/NOP con questi due sistemi potrebbe ridurre le proprietà motivazionali dell'alcol. Negli ultimi anni sono ottenute numerose informazioni sui meccanismi alla base della dipendenza da alcol e cresce sempre di più l'interesse per i meccanismi coinvolti nella sindrome da astinenza, poiché potrebbero rappresentare un nuovo target terapeutico per la cura dell'alcolismo. I sintomi dell'astinenza da alcol sembrano dovuti alla plasticità neuronale che determina

profondi cambiamenti dei sistemi neurotrasmettitoriali, neuropeptidergici ed endocrini (225) che possono sfociare nell'abuso. In seguito a questi cambiamenti, durante l'astinenza da alcol, si osserva una ipofunzione del sistema gabaergico, con inibizione delle funzioni inibitorie, e un aumento dell'attività eccitatoria dovuta all'aumento di glutammato e dopamina (225).

A questo proposito va ricordato che il sistema nocicettina/NOP è implicato nella regolazione del rilascio di neurotrasmettitori, agisce per lo più sui recettori presinaptici attraverso l'inibizione dei canali del calcio sui terminali nervosi, l'attivazione dei canali del potassio o direttamente sul rilascio dei neurotrasmettitori (226). L'analisi dei risultati ottenuti, mostrano che nelle corteccia prefrontale e nel stto laterale non vi sono variazioni dell'espressione genica nè del recettore NOP nè del peptide nocicettina, suggerendo che, durante brevi periodi di astinenza da alcol, in queste aree non vi è coinvolgimento del sistema nocicettina/NOP nei meccanismi di adattamento neuronale. Nell'ipotalamo l'espressione genica del recettore NOP risulta notevolmente aumentata dopo tre settimane di astinenza da alcol e nel BNST anche dopo astinenza pbreve, nell'amigdala i livelli di mRNA di NOP restano invariati, mentre dopo tre settimane di astinenza da alcol quelli della nocicettina risultano notevolmente aumentati. I dati ottenuti sono molto interessanti dal momento che queste aree cerebrali svolgono un ruolo cruciale nei meccanismi di gratificazione attivati dalle sostanze da abuso e nella plasticità neuronale.

L'ipofunzione gabaergica e l'iperfunzione glutamatergica sono i sistemi più coinvolti nei sintomi dell'astinenza e se consideriamo la capacità della nocicettina di aumentare il rilascio di GABA e inibire il rilascio di glutammato, possiamo ipotizzare

che l'aumento della biosintesi della N/OFQ e di NOP durante l'astinenza, possa servire a bilanciare il pronunciato squilibrio esistente tra i maggiori sistemi eccitatori e inibitori del S.N.C. Da questi dati emerge che, in specifiche aree cerebrali, il sistema nocicettina/NOP è coinvolto nei fenomeni di adattamento neuronale che si verificano in seguito a periodi brevi e prolungati di astinenza da alcol e conferisce a questo sistema un ruolo importante nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base delle dipendenze.

In conclusione questa tesi sperimentale evidenzia il coinvolgimento del sistema nocicettina/NOP negli effetti indotti da diverse sostanze d'abuso, siano esse usate a scopo terapeutico o voluttuario, conferendogli un ruolo importante nei fenomeni di adattamento neuronale che si verificano in seguito all'assunzione cronica di queste sostanze. I dati esposti si aggiungono a quelli presenti in letteratura e suggeriscono che questo sistema possa essere un potenziale target terapeutico nelle terapie analgesiche e nel trattamento delle dipendenze da sostanze d'abuso.

6. BIBLIOGRAFIA

1. EVANS CJ, KEITH DE JR, MORRISON H, MAGENDZO K, EDWARDS RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**:1952 - 1955
2. KIEFFER BL, BEFORT K, GAVERIAUX-RUFF C, HIRTH CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:12048-12052
3. CHEN Y, MESTEK A, LIU J, HURLEY JA, YU L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **44**:8-12
4. YASUDA K, RAYNOR K, KONG H, BREDER CD, TAKEDA J, REISINE T, BELL GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:6736-6740
5. BUNZOW JR, SAEZ C, MORTRUD M, BOUVIER C, WILLIAMS JT, LOW M, GRANDY DK (1994) 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 Lett.* **347**:284-288
6. FUKUDA K, KATO S, MORI K, NISHI M, TAKESHIMA H, IWABE N, MIYATA T, HOUTANI T, SUGIMOTO T (1994) cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* **343**:42-46
7. MOLLEREAU C, PARMENTIER M, MAILLEUX P, BUTOUR JL, MOISAND C, CHALON P, CAPUT D, VASSART G, MEUNIER JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family cloning, functional expression and localization, *Febs Lett.* **341**:33-38
8. NISHI M, TAKESHIMA H, MORI M, NAKAGAWARA K, TAKEUCHI T (1994) Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse k-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MORC). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**:1353-1357
9. WANG JB, JOHNSON PS, IMAI Y, PERSICO A.M, OZENBERGER BA, EPPLER CM, UHL GR (1994) cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* **348**:75-79.
10. MEUNIER JC, MOLLEREAU C, TOLL L, SUAUDEAU C, MOISAND C, ALVINERIA P, BUTOUR JL, GUILLEMOT JC, FERRARA P, MONSARRAT B,

- MAZARGULL H, VASSART G, PARMENTIER M, COSTANTIN J (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature*. **377**:532-535
11. REINSCHIED RK, NOTHACKER HP, BOURSON A, ARDATI A, HENNINGSEN RA, BUNZOW JR, GRANDY DK, LANGEN H, MONSMA FJ JR, CIVELLI O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science*. **270**:792-794
 12. CHUANG TT, LACOVELLI L, SALLESE M; DE BLASI A (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitisation and its implications. *Tips*, **17**:416-421
 13. MEUNIER JC, MOULEDOUS L, TOPHAM CM (2000) The nociceptin (ORL-1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides*, **21**:893-900
 14. CHEN Y, FAN Y, LIU J, MESTEK A, TIAN, KOZAK CA, YU (1994) Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *Febs Lett*. **347**:279-283
 15. WICK MJ, MINNERATH SR, LIN X, ELDE R, LAW PJ, LOH HH (1994) Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned μ , δ and κ opioid receptors. *Mol Brain Res*. **27**:37-44
 16. LACHOWICZ JE, SHEN Y, MONSMA JR, SIBLEY DR (1995) Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J. Neurochem*. **64**:34-40
 17. CONNOR M, YEO A, HENDERSON G. (1996) 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**(2):205-7
 18. VAUGHAN CW, CHRISTIE MJ (1996) Increase by the ORL-1 receptor ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal rafe nucleus neurones. *Br J Pharmacol*. **117**(8):1609-11
 19. DOOLEY CT, HOUGHTEN RA (1996) Orphanin FQ: receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain. *Life Sci*. **59**:23-29
 20. DUNNILL RJ, KAKIZAWA K, MCKNIGHT AT, HENDERSON G (1996) Characterization of the actions of naloxone benzoylhydrazone at μ -opioid, κ -opioid and ORL-1 receptors in isolated tissues from rat and guinea-pig. *Br. J. Pharmacol*. **119**:275P

21. CALO G, RIZZI A, BOGONI G, NEUGEBAUER V, SALVADORI S, GUERRINI R, BIANCHI C, REGOLI D (1996) The mouse vas deferens: a pharmacological preparation sensitive to nociceptin. *Eur. J. Pharmacol.* **311**:R3-R5
22. BUTOUR JL, MOISAND C, MAZARGUIL H, MEUNIER JC (1997) Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL-1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *Eur. J. Pharmacol.* **321**:97-103
23. WATSON SJ, MANSOUR A, MENG F, DEVINE D, CIVELLI O, AKIL H (1996) Orphanin FQ peptide and receptor: structure-function, anatomical and behavioral analysis. *27th Meeting of the INRC.* S3-S4
24. SCHULZ S, SCHREFF M, NUSS D, GRAMSCH C, HOLLT V (1996) Nociceptin/orphanin FQ and opioid peptides show overlapping distribution but not colocalization in pain-modulatory brain regions. *Neuroreport.* **7**:3021-3025
25. RIEDL M, SHUSTER S, VULCHANOVA L, WANG J, LOH HH, ELDE R (1996) Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport.* **7**:1369-1372
26. VAUGHAN CW, CHRISTIE MJ (1996) 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
27. VAUGHAN CW, INGRAM SL, CHRISTIE MJ (1997) Actions of the ORL-1 receptor ligand nociceptin on membrane properties of rat periaqueductal gray neurons in vitro. *J. Neurosci.* **17**:996-1003
28. CONNOR M, YEO A, HENDERSON G (1996) The effect of nociceptin on Ca²⁺ channel current and intracellular Ca²⁺ in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br. J. Pharmacol.* **118**:205-207
29. KNOFLACH F, REINSCHIED RK, CIVELLI O, KEMP JA (1996) Modulation of voltage-gated calcium channels by orphanin FQ in freshly dissociated hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **16**:6657-6664
30. NICOL B, LAMBERT DG, ROWBOTHAM DJ, SMART D, MCKNIGHT AT (1996) Nociceptin induced inhibition of K⁺-evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Br. J. Pharmacol.* **119**:1081-1083
31. SCHLICKER E, MORARI M (2000) Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides.* **21**:1023-9
32. NEAL MJ, CUNNINGHAM JR, PATERSON SJ, MC KNIGHT AT (1997) Inhibition by nociceptin of the light-evoked release of Ach from retinal cholinergic neurones. *Br. J. Pharmacol.* **120**:1399-1400

33. NICHOLSON JR, PATERSON SJ, MCKNIGHT AT (1996) Characterization of the response in the rat vas deferens to the ORL-1 agonist nociceptin. *Br. J. Pharmacol.* **119**: 36P
34. BERZETEI-GURSKIE IP, SCWARTZ TOLL L (1996) Determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **302**:R1-R2
35. PATEL HJ, GIEMBYCZ MA, SPICUZZA L, BARNES PJ, BELVISI MG (1997) Naloxone-insensitive inhibition of acetylcholine release from parasympathetic nerves innervating guinea-pig trachea by the novel opioid nociceptin. *Br. J. Pharmacol.* **120**: 765-736
36. MOGIL JS, GRISEL JE, REINSCHEID RK, CIVELLI O, BELKNAP JK, GRANDY DK (1996) Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience*, **75**:333-337
37. ROSSI GC, LEVENTHAL L, PASTERNAK GW (1996) Naloxone sensitive orphanin FQ-induced analgesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **311**:R7-R8
38. TIAN JH, XU W, FANG Y, MOGIL JS, GRISEL JE, GRANDY DK, HAN JS (1997) 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
39. FABER ES, CHAMBERS JP, EVANS RH, HENDERSON G (1996) Depression of glutamatergic transmission by nociceptin in the neonatal rat hemisectioned spinal cord preparation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **119**:189-190
40. STANFA LC, CHAPMAN V, KERR N, DICKENSON AH (1996) Inhibitory action of nociceptin on spinal dorsal horn neurones of the rat in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **118**:1875-1877
41. GIULIANI S, MAGGI CA (1996) Inhibition of tachykinin release from peripheral endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 1567-1569
42. FLORIN S, SUAUDEAU C, MEUNIER JC, COSTENTIN J (1996) Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **317**:9-13
43. DEVINE DP, REINSCHEID RK, MONSMA FJ, CIVELLI O, AKIL H (1996) The novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion. *Brain Res.* **727**:225-229

44. MURPHY NP, LY HY, MAIDMENT NT (1996) Intracerebroventricular orphanin FQ/nociceptin suppresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience*. **75**:1-4
45. KOOB GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of rewards pathways. *Tips*. **13**:177-184
46. DEVINE DP, TAYLOR L, REINSCHIED RK, MONSMA FJ, CIVELLI O, AKIL H (1996) Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem. Res.* **21**:1387-1396
47. MURPHY NP, LEE Y, MAIDMENT NT (1999) Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference. *Brain Res.* **832**:168-170
48. YUAN L, HAN Z, CHANG JK, HANS JS (1999) Accelerated release and production of orphanine FQ in brain of chronic morphine tolerant rats. *Brain Res.* **826**:330-334
49. KING M, CHANG A, PASTERNAK GW (1998) Functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin. *Biochem. Pharmacol.* **55**:1537-1540
50. NARAYANAN S, MAIDMENT NT (1999) Orphanin FQ and behavioral sensitization to cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **63**:271-277
51. CABEZA DE VACA S., CARR KD (1998) Food restriction enhances the central rewarding effect of abused drugs. *J Neurosci.* **18**:7502-7510
52. STRATFORD TR, HOLAHAN MR, KELLY AE (1997) Injections of nociceptin into nucleus accumbens shell or ventromedial hypothalamic nucleus increase food intake. *Neuroreport* **8**:423-426
53. LEVENTHAL L, MATHIS JP, ROSSI GC, PASTERNAK GW, BODNAR RJ (1998) Orphanin opioid receptor antisense probes block orphanin FQ-induced hyperphagia. *Eur. J. Pharmacol.* **349**:R1-R3
54. RIZZI A, RIZZI D, MARZOLA G, REGOLI D, LARSEN BD, PETERSEN JS, CALO' G (2002) Pharmacological characterization of the novel nociceptin/orphanin FQ receptor ligand, ZP120: in vitro and in vivo studies in mice. *Br. J. Pharmacol.* **137**:369-74
55. SHOBLOCK JR (2007) The pharmacology of Ro 64-6198, a systemically active, nonpeptide NOP receptor (opiate receptor-like 1, ORL-1) agonist with diverse preclinical therapeutic activity. *CNS Drug Rev.* **13**:107-36
56. NICHOLSON JR, PATERSON SJ, MENZIES JRW, CORBETT AD, MCKNIGHT AT (1998) Pharmacological studies on the "orphan" receptor in central and peripheral sites. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **76**:304-313

57. KAWAMOTO H, OZAKI S, ITOH Y, MIYAJI M, ARAI S, NAKASHIMA H, KATO T, OHTA H, IWASAWA Y (1999) Discovery of the first potent and selective small molecule opioid receptor-like (ORL-1) antagonist: 1-[(3R,4R)-1-cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazole-2-one (J113397). *J. Med. Chem.* **42**:5061-3
58. OZAKI S, KAWAMOTO H, ITOH Y, MIYAJI M, IWASAWA Y, OHTA H (2000) A potent and highly selective nonpeptidyl nociceptin/orphanin FQ receptor (ORL1) antagonist: J-113397. *Eur J Pharmacol.* **387**:R17-8
59. OZAKI S, KAWAMOTO H, ITOH Y, MIYAJI M, AZUMA T, ICHIKAWA D, NAMBU H, IGUCHI T, IWASAWA Y, OHTA H (2000) In vitro and in vivo pharmacological characterization of J-113397, a potent and selective non-peptidyl ORL1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2000 **402**:45-53.
60. CALO G, GUERRINI R, RIZZI A, SALVADORI S, BURMEISTER M, KAPUSTA DR, LAMBERT DG, REGOLI D (2005) UFP-101, a peptide antagonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. *CNS Drug Rev.* **11**:97-112
61. NAZZARO C, RIZZI A, SALVADORI S, GUERRINI R, REGOLI D, ZEILHOFER HU, CALO G. (2007) UFP-101 antagonizes the spinal antinociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ: behavioral and electrophysiological studies in mice. *Peptides.* **28**:663-9
62. YAMADA H, NAKAMOTO H, SUZUKI Y, ITO T, AISAKA K (2002) Pharmacological profiles of a novel opioid receptor-like1 (ORL₁) receptor antagonist, JTC-801. *Br J Pharmacol.* **135**:323-32
63. SUYAMA H, KAWAMOTO M, GAUS S, YUGE O (2003) Effect of JTC-801 (nociceptin antagonist) on neuropathic pain in a rat model. *Neuroscience Letters.* **351**:133-6
64. TAMAI H, SAWAMURA S, TAKEDA K, ORII R, HANAOKA K (2005) Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of nociceptin receptor antagonist, JTC-801, in rats after spinal nerve injury and inflammation. *European Journal of Pharmacology.* **510**:223-8
65. SINISCALCHI A, RODI D, SBRENNNA S, MARTI M, BIANCHI C (1999) Species difference in nociceptin inhibition of cortical noradrenaline release in vitro. *Regul. Pept.* **80**:127
66. SCHLICKER E, WERTHWEIN S, KAHMANN M (1998) Orphan opioid receptor-mediated inhibition of noradrenaline, dopamine and serotonin release in the mouse, rat, guinea-pig brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**:R90

67. WERTHWEIN S, BAUER U, NAKAZI M, KAHMANN M, SCHLICKER E (1999) Further characterization of the ORL-1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the mouse brain in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **127**:300-308
68. MOLLEREAU C, MOULEDOUS L (2000) Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL-1) receptor. *Peptides.* **21**:907-917
69. MURPHY NP, MAIDMENT NT (1999) Orphanin FQ/nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis. *J. Neurochem.* **73**:179-186
70. DI GIANNUARIO A., PIERETTI S., CATALANI A., LOIZZO A., Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats, *Neurosci. Lett.*, 272, 183-186, 1999.
71. DI GIANNUARIO A, PIERETTI S (2000) Nociceptin differentially affects morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats, *Peptides.* **21**:1125-1130
72. KONYA H, MASUDA H, ITOH K, NAGAI K, KAKISHITA E, MATSUOKA A (1998) Modification of dopamine release by nociceptin in conscious rat striatum. *Brain Res.* **788**:341-344
73. MANEUF YP, HUGHES J, MCKNIGHT AT (1999) Different actions of ORL₁ agonists on K⁺ evoked [³H]-5-HT release from rat cortical slices. *Soc. Neurosci. Abstr.* **25**:433
74. NISHI M, HOUTANI T, NODA Y (1997) Unretrained nociceptive response and disregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Embo. J.* **16**:1858-1864
75. CANDELETTI S, ROMUALDI P (2004) Farmacologia degli analgesici oppiacei in: Strategie per il trattamento del dolore. *Il Pensiero Scientifico* Ed. Roma
76. ZEILHOFER HU, CALÒ G (2003) Nociceptin/orphanin FQ and its receptor: potential targets for pain therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**:423-429
77. PAN Z, HIRAKAWA N, FIELDS HL (2000) A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin. *Neuron.* **26**:515-522
78. ZHANG X, BEAN A J, WIESENFELD-HALLIN Z, XU XJ, HOKFELT T (1995) Ultrastructural studies on peptides in the dorsal horn of the rat spinal cord. III. Effects of peripheral axotomy with special reference to galanin. *Neuroscience.* **64**:893-915
79. SCHWEI MJ, HONORE P, ROGERS SD, SALAK-JOHNSON JL, FINKE MP, RAMNARAIN ML, CLOHISY DR, MANTYH PW(1999) Neurochemical and

- cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain. *J. Neurosci*, **19**: 10886-97
80. HONORE P, ROGERS SD, SCHWEI MJ, SALAK-JOHNSON JL, LUGER NM, SABINO MC, CLOHISY DR, MANTYH PW (2000) Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. *Neuroscience*. **98**:585–598
 81. GALASKO CS (1995) Diagnosis of skeletal metastases and assessment of response to treatment. *Clin.Orthop*. **312**:64–75
 82. NIELSEN OS, MUNRO AJ, TANNOCK IF (1991) Bone metastases: pathophysiology and management policy. *J. Clin. Oncol*. **9**:509–24
 83. NELSON JB, CARDUCCI MA (2000) The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in prostate cancer. *BJU Intern*. **85**:45–48
 84. DELEO JA, YEZIERSKI RP (2001) The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain*. **90**:1–6
 85. DAVAR G (2001) Endothelin-1 and metastatic cancer pain. *PainMed*. **2**:24-27
 86. OPREE A, KRESS M (2000) Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J. Neurosci*. **20**:6289–6293
 87. WATKINS LR, GOEHLER LE, RELTON J, BREWER MT, MAIER SF (1995) Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. *Brain Res*. **692**:244-250
 88. STOSCHECK CM, KING LE (1996) Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res*. **46**:1030-1037
 89. MOORE BC, SIMMONS DL (2000) COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by non steroidal anti-inflammatory drugs. *Curr. Med. Chem*. **7**:1131–1144
 90. MASFERRER, JL (2000) Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res*. **60**:1306–1311
 91. SHANKAR A (1998) Raised endothelin 1 levels in patients with colorectal liver metastases. *Br. J. Surg*. **85**:502-506
 92. KURBEL S (1999) Endothelin-secreting tumors and the idea of the pseudoectopic hormone secretion in tumors. *Med. Hypotheses*. **52**:329-333

93. GAONI Y, MECHOULAM R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**:1646-1647
94. PERTWEE RG (2007) The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: D9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and D9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol* **153**:199-215
95. KARNIOL IG, SHIRAKAWA I, KASINSKI N, PFEFERMAN A, CARLINI EA (1974) Cannabidiol interferes with the effects of Δ^9 - tetrahydrocannabinol in man. *Eur. J. Pharmacol.* **28**:172-7
96. RUSSO E, GUY GW (2006) A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combinino tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses.***66**:234-46
97. ZUARDI AW, SHIRAKAWA I, FINKELFARB E, KARNIOL IG (1982) Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 - tetrahydrocannabinol in normal subjects. *Psychopharmacology.* **76**:245-50
98. MATSUDA L, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER T (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* **346**:561-564
99. VAN SICKLE MD, DUNCAN M, KINGSLEY PJ, MOUIHATE A, URBANI P, MACKIE K, STELLA N, MAKRIYANNIS A, PIOMELLI D, DAVISON JS, MARNETT LJ, DI MARZO V, PITTMAN QJ, PATEL KD, SHARKEY KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science.* **310**:329-32
100. HERKENAM M, LYNN AB, JOHNSON MR (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptor in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* **11**:563-583
101. MACKIE K, HILLE B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:3825-3829
102. TWICHELL W, BROWN S, MACKIE K (1997) Cannabinoids inhibit N and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **78**:43-50
103. DI MARZO V, MELCK D, BISOGNO T, DE PETROCELLIS L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory actions. *Trends in Neurosci.* **21**:521-528
104. FREUND TF, KATONA I, PIOMELLI D (2003) Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic. Signaling. *Physiol Rev.* **83**:1017–1066
105. DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R

- (1992) Isolation of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. **258**:1946-1949
106. SUGIURA T, KONDO S, SUKAGAWA A, NAKANE S, SHINODA A, ITOH K, YAMASHITA A, WAKU K (1995) 2-Arachidonylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**:89-97
107. MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**:83-90
108. HANUS L, ABU-LAFI S, FRIDE E, BREUER A, VOGEL Z, SHALEV DE, KUSTANOVICH I, MECHOULAM R (2001) 2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 3662-3665
109. DI MARZO V, DE PETROCELLIS L, FEZZA F, LIGRESTI A, BISOGNO T (2002) Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**:377-391
110. CLEMENTI F, FUMAGALLI G (2004) Farmacologia generale e molecolare, UTET Ed. Italia **37**: 551
111. RINALDI-CARMONA M, BARTH F, CONGY C, MARTINEZ S, OUSTRIC D, PÉRIO A, PONCELET M, MARUANI J, ARNONE M, FINANCE O, SOUBRIÉ P, LE FUR G (2004) SR147778 [5-(4-Bromophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB₁ cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**:905-914
112. PERTWEE RG (2005) Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB₁ receptors. *Life Sciences*. **76**:1307-1324
113. HOHMANN AG, TSOU K, WALKER JM (1999) Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J. Neurophysiol.* **81**:575-583
114. PERTWEE RG (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol.* **63**:569-611
115. VAUGHAN CW, CONNOR M, BAGLEY EE, CHRISTIE MJ (2000) Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray in neurons in vitro. *Mol Pharmacol.* **57**:288-295
116. RICHARDSON JD, AANONSEN L, HARGREAVES KM (1998) Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J. Neurosci.* **18**:451-7

117. JAN SEVEIK MASEK K (2000) Potential role of cannabinoids in Parkinson's disease. *Drugs and Aging*. **16**:391-396
118. HAMPSON AJ, GRIMALDI M, AXELROD J, WINK D (1998) Cannabidiol and delta-9-THC are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sc.* **14**:8268-8273
119. MANZANARES J, CORCHERO JJ, ROMERO JA, FERNANDEZ-RUIZ JJ, RAMOS JA, FUENTES JA (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends in Pharm. Sc.* **20**:278-294
120. MASSI P, VACCANI A, ROMORINI S, PAROLARO D (2001) Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects *J. Neuroimmunol.* **117**:116-124
121. SCHLICKER E, KATHMANN M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci.***22**:565-72
122. SALIO C, FISCHER J, FRANZONI MF, MACKIE K, KANEKO T, CONRATH M (2001) CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport.* **12**:3689-92
123. NOYES R, BRUNK SF, AVERY DH, CANTER A (1975) The analgesic properties of delta-9-THC and codeine. *Clin. Pharm. and Ther.* **18**:84-89
124. CAMPBELL FA, TRAMER MR, CARROLL D, REYNOLDS DJ, MOORE RA, McQUAY HJ (2001) Are cannabinoids an effective and safe treatment option in the management of pain? A qualitative systematic review. *Brit. Med. J.* **323**:13-16
125. WELCH SP, THOMAS C, PATRICK GS (1995) Modulation of cannabinoid-induced antinociception following intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J. of Pharm. And Exp. Ther.* **272**:310-321
126. SMITH PB, WELCH SP, MARTIN BR (1994) Interaction between Δ^9 -tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* **268**:1382-1387
127. PUGH G, SMITH P, DOMBROWSKI D, WELCH SP (1996) The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J. Pharm. Exp. Ther.* **279**:608-616
128. MASON DJ, LOWE J, WELCH SP (1999) Cannabinoid modulation of dynorphin A: correlation to cannabinoid-induced antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* **378**:237-248
129. WELCH SP, EADES M (1999) Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid system. *Brain Research.* **848**:183-190

130. CORCHERO J, AVILA MA, FUENTES JA, MANZANARES J (1997) Delta-9-tetrahydrocannabinol increases prodynorphin gene expression in the spinal cord of the rat. *Life Sci.* **61**:39-43
131. ZIMMER A, VALJENT E, KONIG M, ZIMMER AM, ROBLEDO P, HAHN H, VALVERDE O, MALDONADO R (2001) Absence of delta-9-tetrahydrocannabinol dysphoric effects in dynorphin-deficient mice *J. Neurosci.* **21**:9499-9505
132. SMITH FL, CICHEWICZ D, MARTIN ZL, WELCH SP (1998) The enhancement of morphine antinociception by Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Pharmacology Bioch. And Behavior.* **60**:559-566
133. CICHEWICZ DL, MARTIN ZL, SMITH FL, WELCH SP (1999) Enhancement of μ opioid antinociception by oral delta-9-tetrahydrocannabinol: dose-response analysis and receptor identification. *J. Pharm. Exp. Ther.* **289**:859-867
134. CICHEWICZ DL (2004) Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci.* **74**:1317-1324
135. GOODMAN GA, RAIL TW, NIES AS, TAYLOR P (1992) Le basi farmacologiche della terapia. *Zanichelli Ed. Italia.* **22**:483
136. WANDLESS AL, SMART D, GLAMBERT D (1996) Fentanyl increases intracellular Ca^{2+} concentration in SH-SY5Y cells. *Br. J. Anaesthesia.* **76**:461-463
137. CONNOR M, HENDERSON G (1996) δ and μ opioid receptor mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol.* **117(2)**:333-40.
138. SMART D, SMITH G, LAMBERT DG (1994) μ opioid receptor stimulation of inositol (1,4,5) trisphosphate formation via a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Neurochem.* **62(3)**:1009-14
139. KOUVARAS E, ASPRODINI EK, ASOUCRIDOU I, VASILAKI A, KILINDRIS T, MICHALOUDIS I, KOUKOUTIANOU D, PAPTAEODOROPOULUS C, KOSTOPULOS G (2008) Fentanyl treatment reduces GABAergic inhibition in the CA1 area of hippocampus 24 hours after exposure to the drug. *Neuropharmacol.* **55**:1172-1182
140. SIROHI S, DIGHE SV, WALKER EA, YOBURN BC (2008) The analgesic effect of fentanyl: relationship to tolerance and μ -opioid receptor regulation. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour.* **91**:115-120
141. TURCHAN J, LASON W, BUDZISZEWSKA B, PRZEWLOCKA B (1997) Effects of single and repeated morphine administration on the prodynorphin, proenkephalin

- and dopamine D2 receptor gene expression in the mouse brain. *Neuropeptides*. **31**:24-8
142. ZHOU Y, BENDOR J, HOFMANN L, RANDESIM, HO A, KREEK MJ (2006) Mu opioid receptor and orexin/hypocretin mRNA levels in the lateral hypothalamus and striatum are enhanced by morphine withdrawal. *J Endocrinol*. **191**(1):137-45
 143. SIROHI S, DIGHE SV, WALKER EA, YOBURN BC (2008) The analgesic effect of fentanyl: relationship to tolerance and μ -opioid receptor regulation. *Pharmacol. Biochem.y and Behav*. **91**:115-120
 144. YOSHIKAWA M, NAKAYAMA H, UEMO S, HIRANO M, HATANAKA H, FURUYA H (2000) Chronic fentanyl treatments induce the up-regulation of μ -opioid receptor mRNA in rat pheochromocytoma cells. *Brain Research*. **859**:217-223
 145. ZUO Z (2005) The role of opioid receptor internalization and β -arrestins in the development of opioid tolerance. *Anesth Analg*. **101**:728-734
 146. HASHIMOTO T, YAMADA K, HARA N, KIRIHARA Y, TSUCHIYA M (2006) Enhancement of morphine analgesic effect with induction of mu-opioid receptor endocytosis in rats. *Anesthesiology*. **105**:574-580
 147. HARRISON LM, GRANDY DK (2000) Opiate modulating properties of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides* **21**:151-172
 148. MORGAN MM, GRISEL JE, ROBBINS CS, GRANDY DK (1997) Antinociception mediated by the periaqueductal gray is attenuated by orphanin FQ. *Neuroreport* **8**: 3431-3434.
 149. CHUNG S, POHL S, ZENG J, CIVELLI O, REINSCHEID RK (2006) Endogenous orphanin FQ/nociceptin is involved in the development of morphine tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:262-267
 150. Scoto GM, Aricò G, Ronsisvalle S, Parenti C (2007) Blockade of the nociceptin/orphanin FQ/NOP receptor system in the rat ventrolateral periaqueductal gray potentiates DAMGO analgesia. *Peptides*. **28**(7):1441-6
 151. CHEN X, GELLER EB, ADLER MW (2007) Nociceptin/orphanin FQ blocks the antinociception induced by mu, kappa and delta opioid agonists on the cold water tail-flick test. *Eur J Pharmacol*. **557**(1):32-6
 152. TAKAYAMA N, UEDA H (2005) Morphine-induced overexpression of prepro-nociceptin/orphanin FQ in cultured astrocytes. *Peptides*. **26**(12):2513-7
 153. MOGIL JS, GRISEL JE, REINSCHEID RK, CIVELLI O, BELKNAP JK, GRANDY DK (1996) Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience* **75**: 333-337.

154. CHIN JH, Goldstein DB (1981) Membrane-disordering action of ethanol. Variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe. *Mol. Pharmacol.* **19**:425–431
155. HARRIS RA (1999) Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **23**:1563–1570
156. DAVIES M (2003) The role of GABA A receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J. Psychiatry Neurosci.* **28**:263–274
157. SIGGINS GR, ROBERTO M, NIE Z (2005) The tipsy terminal: presynaptic effects of ethanol. *Pharmacol. Ther.* **107**:80–98
158. FAINGOLD CL, N'GOUEMO P, RIAZ A (1998) Ethanol and neurotransmitter interaction- from molecular to integrative effects. *Prog Neurobiol.* **55**:509-535
159. NIE Z, MADAMBA SG, SIGGINS GR (1994) Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**:1566–1573
160. COSTA ET, SOTO EE, CARDOSO RA, OLIVERA DS, VALENZUELA CF (2000) Acute effects of ethanol on kainate receptors in cultured hippocampal neurons. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **24**:220–225
161. KRYSTAL JH, PETRAKIS IL, MASON G, TREVISAN L, D'SOUZA DC (2003) N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol. Ther.* **99**:79–94
162. LOVINGER DM, WHITE G, WEIGHT FF (1989) Ethanol inhibits NMDA activated ion current in hippocampal neurons. *Science* **243**:1721–1724
163. WANG X, WANG G, LEMOS JR, TREISTMAN SN (1994) Ethanol directly modulates gating of a dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channel in neurohypophysial terminals. *J Neurosci* **14**:5453-5460
164. KOBAYASHI T, IKEDA K, KOJIMA H, NIKI H, YANO R, YOSHIOKA T, KUMANISHI T (1999) Ethanol opens G-protein activated inwardly rectifying k⁺ channels. *Nat Neurosci* **2**:1091-1097
165. LEWOHL JM, WILSON WR, MVAYFIELD RD, BROZOWSKI SJ, MORRISETT RA, HARRIS RA (1999). G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol addiction. *Nat Neurosc* **2**:1084-1090
166. Lovinger DM, Zhou Q (1999) Alcohols potentiate ion current mediated by recombinant 5-HT₃RA receptors expressed in a mammalian cell line. *Neuropharmacology* **33**:1567-1572

167. NARAHASHI T, AISTRUP GL, MARSZALEC W, NAGATA K (1999). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: a new target site of ethanol. *Neurochem Int* **35**:131-141
168. AISTRUP GL, MARSZALEC W, NARAGASHI T (1999) Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol* **55**:39-49
169. MIHIC SJ (1999) Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function *Neurochem Int* **35**:115-123
170. SIGGINS GR, ROBERTO M, NIE Z (2005) The tipsy terminal:presynaptic effects of ethanol. *Pharmacol Ther* **107**:80-98
171. DI CHIARA G, BASSAREO V, FENU S, DE LUCA MA, SPINA L, CADONI C, ACQUAS E, CARBONI E, VALENTINI V, LECCA D (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* **47**:227-241
172. NESTLER EJ (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci.* **8**:1445–1449
173. PIERCE RC, KUMARESAN V (2006) The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* **30**:215–238
174. MARINELLI PW, QUIRION R, GIANOUULAKIS C (2004) An in vivo profile of B-endorphin in the arcuate nucleus and nucleus accumbens following exposure to stress or alcohol. *Neurosci* **127**:777-784
175. SPANAGEL R, WEISS F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* **22**(11):521-7
176. LIU X, WEISS F (2002) Additive effect of stress and drug cues on reinstatement of ethanol seeking: exacerbation by history of dependence and the role of concurrent activation of corticotropin-releasing-factor and opioid mechanisms. *J Neurosci* **22**:7856-7861
177. HEILIG M, KOOB GF (2007) A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci* **30**:399-406).
178. GOLOVKO AI, GOLOVKO SI, LEONTIEVA LV, ZEFIROV SY (2002) The influence of ethanol on functional status of GABA (A) receptors. *Biochemistry.* **67**:719-29
179. NOVAK KL, MCBRIDE WJ, LUMENG L, LI TK, MURPHY JM (1998) Blocking GABA(A) receptors in the anterior ventral tegmental area attenuates ethanol intake of the alcohol-preferring P rat. *Psychopharmacol* **139**:108-116

180. JUNE HL, TORRES L, CASON CR, HWANG BH, BRAUN MR, MURPHY JM (1998) The novel benzodiazepine inverse agonist RO19-4603 antagonizes ethanol motivated behaviours: neuropharmacological studies. *Brain* **784**:256-275)
181. SHELTON KL, BALSTER RL (1997) Effects of gamma-aminobutyric acid agonist and N-methyl-D-aspartate antagonists on multiple schedule of ethanol and saccharin self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **280**:1250-1260
182. BIENKOWSKI P, KOROS E, KOSTOWSKI W, DANYSZ W (1999). Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist on reinforced and non reinforced responding for ethanol in rats. *Alcohol* **18**:131-137
183. RASSNICK S, STINUS L, KOOB GF (1993) The effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens and the mesolimbic dopamine system on oral self-administration of ethanol in rat. *Brain Res* **623**:16-24
184. ZUO L, KRANZLER HR, LUO X, COVAULT J, GELERNTER J (2007) CNR1 variation modulates risk for drug and alcohol dependence. *Biol Psychiatry* **62**: 616-626
185. LE AD, FUNK R (2005) Serotonergic compounds: preclinical data. In: Spanagel R, Mann K (eds). *Drugs for Relapse Prevention of Alcoholism. Birkhauser: Basel.* pp 95-106
186. CICCOCIOPPO R, ECONOMIDOU D, CIPPITELLI A, CUCCULELLI M, UBALDI M, SOVERCHIA L et al. (2006) Genetically selected Marchigian Sardinian alcohol-preferring (msP) rats: an animal model to study the neurobiology of alcoholism. *Addict Biol.* **11**:339-355
187. OVERSTREET DH, REZVANI AH, COWEN M, CHEN F, LAWRENCE AJ (2006). Modulation of high alcohol drinking in the inbred Fawn-Hooded (FH/Wjd) rat strain: implications for treatment. *Addict Biol.* **11**:356–373
188. ROBERTS AJ, MCDONALD JS, HEYSER CJ, KIEFFER BL, MATTHES HW, KOOB GF et al. (2000) mu-Opioid receptor knock-out mice do not self administer alcohol. *J Pharmacol Exp Ther.* **293**:1002–1008
189. KOVACS KM, SZAKALL I, O'BRIEN D, WANG R, VINOD KY, SAITO M ET AL. (2005) Decreased oral self-administration of alcohol in kappa opioid receptor knock-out mice. *Alcohol Clin Exp Res.* **29**:730–738.
190. MCBRIDE WJ, LI TK (1998) Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Crit Rev Neurobiol.* **12**:339-369
191. WALKER BM, KOOB GF (2008) Pharmacological evidence for a motivational role of kappa-opioid systems in ethanol dependence. *Neuropsychopharmacol.* **33**:643–652

192. SINCLAIR JD, SENTER RJ (1967) Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation. *Psychon Sci.* **8**:11-12
193. SINCLAIR JD (1971) The alcohol-deprivation effect in monkeys. *Psychon Sci* **25**:21–22
194. SALIMOV RM, SALIMOVA NB (1993) The alcohol deprivation effect in hybrid mice. *Drug Alcohol Depend.* **32**:187–191
195. SPANAGEL R, HOLTER S, ALLINGHAM K, LANDGRAF R, ZIEGLGANSBERGER W (1996) Acamprosate and alcohol: effects on alcohol intake following alcohol deprivation in the rat. *Eur J Pharmacol.* **305**:39–44
196. HOLTER SM, SPANAGEL R (1999) Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacol.* **145**:360–369
197. TSAI G, COYLE JT (1998) The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med.* **49**:173–184
198. GASS JT, OLIVE MF (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol.* **75**:218–265
199. SPANAGEL R, HEILIG M (2005) Addiction and its brain science. *Addiction* **100**:1813–1822
200. HOLTER SM, LANDGRAF R, ZIEGLGANSBERGER W, SPANAGEL R (1997) Time course of acamprosate action on operant ethanol self administration after ethanol deprivation. *Alcohol Clin Exp Res.* **2**:862–868
201. HEYSER CJ, SCHULTEIS G, DURBIN P, KOOB GF (1998) Chronic acamprosate treatment eliminates the alcohol deprivation effect while having limited effects on baseline responding for ethanol in rats. *Neuropsychopharmacol.* **18**: 125–133
202. HOLTER SM, DANYSZ W, SPANAGEL R (2000) Novel un competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist MRZ 2/579 suppresses ethanol intake in long-term ethanol experienced rats and generalizes to ethanol cue in drug discrimination procedure. *J Pharmacol Exp Ther.* **292**:545–552
203. SCHMITT U, WALDHOFER S, WEIGELT T, HIEMKE C (2002) Free-choice ethanol consumption under the influence of GABAergic drugs in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* **26**:457–462
204. COLOMBO G, SERRA S, BRUNETTI G, VACCA G, CARAI MA, GESSA GL (2003) Suppression by baclofen of alcohol deprivation effect in Sardinian alcohol-preferring (sP) rats. *Drug Alcohol Depend.* **70**:105–108

205. THIELEN RJ, ENGLEMAN EA, RODD ZA, MURPHY JM, LUMENG L, LI TK ET AL. (2004) Ethanol drinking and deprivation alter dopaminergic and serotonergic function in the nucleus accumbens of alcohol preferring rats. *J Pharmacol Exp Ther* **309**:216–225
206. HOLTER SM, SPANAGEL R (1999) Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacol.* **145**: 360–369
207. MORMEDE P, COLAS A, JONES BC (2004) High ethanol preferring rats fail to show dependence following short- or long-term ethanol exposure. *Alcohol.* 39: 183–189
208. HOLTER SM, HENNIGER MS, LIPKOWSKI AW, SPANAGEL R (2000) Kappa-opioid receptors and relapse-like drinking in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacol.* **153**:93–102
209. XUEI X, DICK D, FLURY-WETHERILL L, TIAN HJ, AGRAWAL A, BIERUT L ET AL. (2006) Association of the kappa-opioid system with alcohol dependence. *Mol Psychiatry.* **11**:1016–1024
210. CICCOCIOPPO R, PANOCKA I, POLIDORI C, REGOLI D, MASSI M (1999) Effect of nociceptin on alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacol.* **141**:220–224
211. CICCOCIOPPO R, ECONOMIDOU D, FEDELI A, ANGELETTI S, WEISS F, HEILIG M, MASSI M (2004) Attenuation of ethanol self-administration and of conditioned reinstatement of alcohol-seeking behaviour by the antiopioid peptide nociceptin/orphanin FQ in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology.* **172**:170–178
212. ROBERTO M, SIGGINS GR (2006) Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**:9715–9720
213. KUZMIN A, KREEK MJ, BAKALKIN G, LILJEQUIST S (2007) The nociceptin/orphanin FQ receptor agonist Ro 64-6198 reduces alcohol self-administration and prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology.* **32**:902–910
214. CICCOCIOPPO R, PANOCKA I, POLIDORI C, REGOLI D, MASSI M (1999) Effect of nociceptin on alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacol.* **141**:220–224
215. CICCOCIOPPO R, ANGELETTI S, PANOCKA I, MASSI M (2000) Nociceptin/orphanin FQ and drugs of abuse. *Peptides.* **21**:1071–1080

216. MARTIN-FARDON R, CICCOCIOPPO R, MASSI M, WEISS F (2000) Nociceptin prevents stress-induced ethanol but not cocaine-seeking behavior in rats. *Neuroreport*. **11**:1939–1943
217. DI GIANNUARIO A, PIERETTI S, CATALANI A, LOIZZO A (1999) Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release from the nucleus accumbens and nucleus caudate in rats. *Peptides*. **21**:1125-1130
218. LUFFY K, DO T, MAIDMENT NT (2001) Orphanin FQ/nociceptin attenuates motor stimulation and changes in nucleus accumbens extracellular dopamine induced by cocaine in rats. *Psychopharmacol*. **154**:1-7
219. MURPHY NP, MAIDMENT NT (1999) Orphanin FQ/nociceptin modulation of mesolimbic dopamine transmission determined by microdialysis. *J Neurochem*. **73**:179-186
220. KOOB GF, ROBERTS AJ, SCHULTEIS G, PARSONS LH, HEYSER CJ, HYYTIA P, et al. (1998) Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. **22**:3–9
221. HYYTIA P, KOOB GF (1995): GABAA receptor antagonism in the extended amygdala decreases ethanol self-administration in rats. *Eur J Pharmacol*. **283**:151–159
222. ROBERTS AJ, COLE M, KOOB GF (1996) Intra-amygdala muscimol decreases operant ethanol self-administration in dependent rats. *Alcohol Clin Exp Res*. **20**:1289 – 1298
223. ROBERTO M, MADAMBA SG, MOORE SD, TALLENT MK, SIGGINS GR (2003) Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Neuroscience*. **4**:2053–2058
224. WAGNER EJ, RONNEKLEIV OK, GRANDY DK, KELLY MJ (1998) The peptide orphanin FQ inhibits beta-endorphin neurons and neurosecretory cells in the Hypothalamic arcuate nucleus by activating an inwardly rectifying k⁺ conductance. *Neuroendocrinol*. **67**:73-82
225. ESEL E (2006) Neurobiology of Alcohol Withdrawal: Inhibitory and Excitatory Neurotransmitters. *Turk Psikiyatri Derg*, **17(2)**:129-37
226. MEIS S, PAPE HC (2001) Control of glutamate and GABA release by nociceptin/orphanin FQ in the rat lateral amygdala. *Jour. of Physiol*. **532**:701-712