

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**“FEDERICO II”**

**FACOLTÀ DI FARMACIA**

**DIPARTIMENTO DI FARMACOLOGIA SPERIMENTALE**

**TESI DI DOTTORATO IN SCIENZA DEL FARMACO**

***FARMACOLOGIA DELLE ACILETANOLAMIDI:  
DA CANNABINOMIMETICI A PPAR- $\alpha$  AGONISTI  
NELLA MODULAZIONE DEL DOLORE***

TUTOR  
Ch.<sup>mo</sup> Prof.<sup>re</sup>  
Antonio Calignano

COORDINATORE  
Ch.<sup>mo</sup> Prof.<sup>re</sup>  
Enrico Abignente

CANDIDATO  
Dott. Roberto Russo

XIX CICLO anno 2003-2006

.....**GRAZIE**

- ❖ *Al mio tutor Prof. Antonio Calignano, per i consigli le opportunità e la preziosa supervisione;*
- ❖ *Al Prof. Daniele Piomelli per la sua generosa disponibilità nell'ospitarmi presso i suoi laboratori;*
- ❖ *Alla mia cara Dott.<sup>essa</sup> Giovanna La Rana, che mi ha sostenuto e seguito durante il mio lavoro di ricerca,*
- ❖ *Ai miei validi colleghi Dott. Giuseppe D'Agostino e Dott. Oscar Sasso preziosi compagni di lavoro;*
- ❖ *Al coordinatore del dottorato di ricerca Prof. Enrico Abignente per la cordiale disponibilità;*
- ❖ *A mia moglie che mi ha sempre appoggiato ed incoraggiato alla ricerca.*

## INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. GLI ENDOCANNABINOIDI	6
▪ Meccanismo d'azione	7
▪ Biosintesi ed inattivazione	12
▪ Possibile ruolo fisiopatologico	14
3. LA PALMITOLLETANOLAMIDE (PEA)	19
4. I RECETTORI CHE ATTIVANO LA PROLIFERAZIONE PEROSSISOMIALE	24
▪ Modulazione dei fenomeni infiammatori di agonisti PPARs	27
5. IL DOLORE	30
6. SCOPO DEL LAVORO	39
7. MATERIALI	40
▪ Sostanze	40
▪ Animali	41
8. METODI	42
▪ Modelli comportamentali di dolore acuto	42
I. Test della Formalina	42
II. Edema della pinna auricolare	43
III. Writhing test	43
IV. Edema da carragenina	44
▪ Analisi statistica	44
▪ Modelli di dolore cronico	45
I. Dolore neuropatico da Legatura del nervo sciatico	45
II. Infiammazione cronica da adiuvante completo di Freund	46
1. Test comportamentali	47
I. Iperalgesia meccanica (Randall-Selitto test)	47
II. Iperalgesia termica (Plantar test)	47
2. Analisi statistica	48
9. RISULTATI	49
10. CONCLUSIONI	71
11. BIBLIOGRAFIA	79

## 1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'interesse per i lipidi come possibili mediatori fisiopatologici ha portato all'identificazione di un fine sistema di modulazione che coinvolge semplici molecole, quali gli aciliderivati, nella trasmissione di stimoli nocivi. Ciò ha contribuito alla nascita di una nuova disciplina quale la **lipidomica**, la quale studia non solo la struttura, ma anche la funzione e le variazioni dei lipidi, che vengono a determinarsi in diverse situazioni fisiologiche e patologiche, considerandoli come elementi inseriti nel complesso del metabolismo cellulare.

I lipidi sono un gruppo di sostanze organiche di origine animale o vegetale, costituita da esteri di acidi grassi superiori insolubili o poco solubili in acqua.

Sono molecole più piccole degli zuccheri e delle proteine; sono dei combustibili, infatti le cellule traggono da esse l'energia necessaria per la loro vita e per lo svolgimento delle loro funzioni. Dal punto di vista fisico sono sostanze solide o liquide ad elevata densità: i lipidi solidi vengono detti grassi, quelli liquidi oli.

Nelle cellule i lipidi hanno due funzioni energetica e strutturale: energetica perché metabolizzando una molecola di lipide si ottengono circa 9 Kcal, strutturale perché rappresentano l'unità principale delle membrane biologiche, preposta allo

svolgimento di funzioni quali protezione o sostegno. Si possono legare a zuccheri e proteine formando sostanze molto complesse che regolano l'attività biologica.

In base al grado di complessità i lipidi si possono dividere in "semplici", come ad esempio i trigliceridi (glicerolo più acidi grassi), "composti" come le lipoproteine e i fosfolipidi ed i "lipidi derivati" quale il colesterolo. Fra i derivati lipidici vi sono gli steroidi, costituiti da una struttura chimica policiclica tipica chiamata ciclopentanoperidrofenantrene e comprendono la vitamina D, i precursori del colesterolo e numerosi ormoni di fondamentale importanza, tra cui i corticosteroidi.

È ormai, ampiamente accertata l'ipotesi del ruolo dei lipidi come, modulatori diretti di funzioni proteiche o segnali intracellulari, come ligandi per recettori di membrana o nucleari, nonché come neuromodulatori.

Il neurotrasmettitore è un composto chimico, sintetizzato dalle cellule nervose (neuroni) responsabile della propagazione dell'impulso nervoso tra neuroni adiacenti, o tra la terminazione di un neurone e una fibra muscolare o una ghiandola. In base alla capacità di suscitare o di inibire la formazione di un potenziale d'azione e, quindi, la propagazione dell'impulso nervoso, i

neurotrasmettitori vengono rispettivamente distinti in eccitatori e inibitori. Nel nostro organismo esistono vari neurotrasmettitori, tra i quali ricordiamo la **serotonina**, implicata nella regolazione del tono dell'umore, del sonno e dell'apprendimento; **norepinefrina ed epinefrina**, che regolano l'attività cardiaca e respiratoria; la **dopamina**, che regola il cosiddetto "sistema della ricompensa" (e la cui carenza è alla base del morbo di Parkinson); le **endorfine**, mediatori delle sensazioni di benessere dell'organismo. A queste, infine bisogna aggiungere le ammidi, quali l'**anandamide** (AEA), connesse alla regolazione e al bilanciamento dei sistemi biochimici del corpo, che influenzano o controllano le funzioni di riproduzione, sonno, lotta-o-fuga e il ciclo dell'appetito. Negli ultimi venti anni, lo studio dei neurotrasmettitori si è basato in modo particolare sulla capacità degli endocannabinoidi di proteggere l'organismo da danni procurati da varie situazioni patologiche, esercitando un'azione anti-ossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria e, in particolare, antidolorifica.

## 2. GLI ENDOCANNABINOIDI

Prima della scoperta dell'AEA, primo endocannabinoide identificato ed isolato agli inizi degli anni novanta, l'interesse del mondo scientifico era rivolto ai molteplici effetti farmacologici delle molecole naturali estratte dalla Cannabis.

La Canapa (*Cannabis sativa*) è una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Cannabinacee. La droga ottenuta dalle sommità fiorite della pianta, è stata usata sin dall'antichità, infatti le prime testimonianze ci sono pervenute dalla Cina dove fu nominata nell'erbario pubblicato durante il regno dell'imperatore Shen Nung nel 2700 a.C., ed era consigliata per trattare casi di disordini femminili, gotta, reumatismo, debolezza mentale (1). Anche in India la pianta ha avuto larga diffusione, veniva largamente utilizzata per cerimonie sacre, ed era consigliata in caso di febbre, di insonnia, dissenteria o malattie veneree (1). Nell'antica Roma la troviamo menzionata nel libro di Nerone "*Discordie*" per le sue proprietà centrali, adoperata come anticonvulsivante e stimolante dell'appetito(1).

Benché ogni parte della pianta, sia maschile che femminile, contenga sostanze psicoattive (cannabinoidi), le più alte concentrazioni di queste le troviamo nelle

sommità fiorite delle piante femminili. Sono stati identificati oltre 400 principi attivi di cui oltre 60 sono sintetizzati dalla canapa indiana, e comprendono il cannabinolo (CBN), il cannabidiolo (CBD) e parecchi isomeri del tetraidrocannabinolo. L'isomero di maggiore interesse per le sue proprietà centrali è l'  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), un derivato idrogenato del cannabinolo (2).

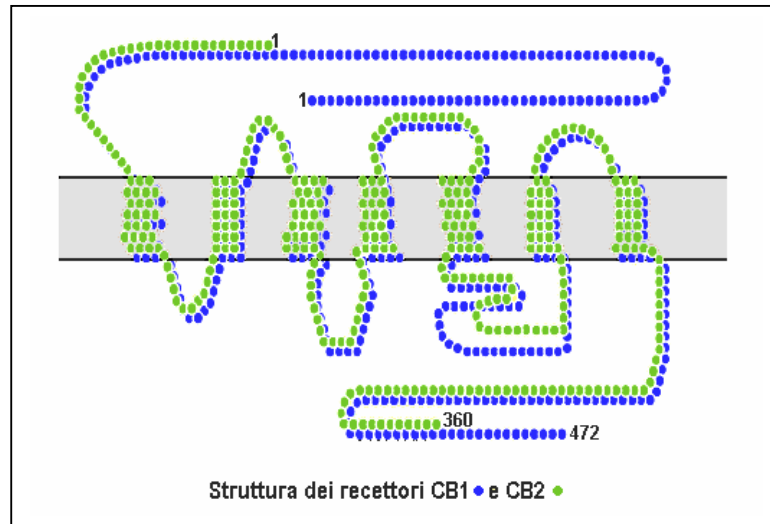
Inizialmente, la natura lipofila di questo principio attivo ha fatto presupporre un meccanismo a livello delle membrane, ma successivamente è stato identificato un sistema recettoriale cannabinoide, sui cui agiscono sostanze oggi conosciute come endocannabinoidi.

### **3. MECCANISMO D'AZIONE**

Gli endocannabinoidi sono prodotti all'interno delle cellule neuronali attraverso vie biosintetiche multiple. A differenza di altri neuromediatrici non vengono immagazzinati in vescicole ma vengono sintetizzati "*on demand*" a partire da precursori fosfolipidici di membrana. Gli studi sul possibile meccanismo d'azione dei derivati della Cannabis e, di conseguenza, sulle potenziali applicazioni



terapeutiche di questi ultimi, hanno subito un'improvvisa accelerazione con la scoperta di specifici recettori per il THC nonché di ligandi endogeni per tali proteine.



**-Figura 1-**

Sono stati caratterizzati finora due tipi di recettori per il THC ed i suoi derivati sintetici: il recettore CB1 (fig. 1 colore blu), prevalentemente espresso nel sistema nervoso ed in alcuni tessuti periferici, scoperto nel 1990 (3), ed il recettore CB2 (fig. 1 colore verde), identificato finora solo in cellule del sistema immunitario dei mammiferi, individuato per la prima volta solo nel 1993 (4). Tali recettori sono stati successivamente classificati come appartenenti alla superfamiglia delle proteine G<sub>i</sub>. Questi sono caratterizzati da un unico filamento che oltrepassa la

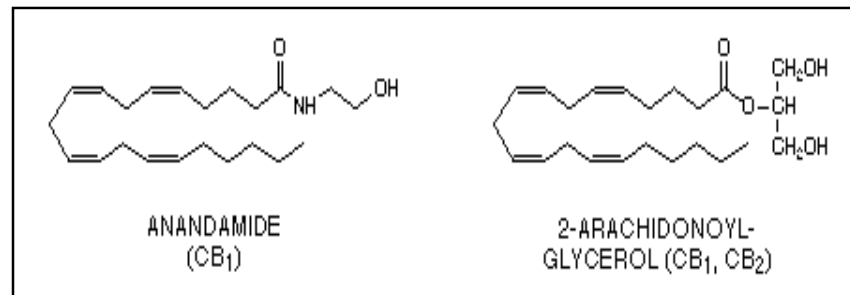
barriera cellulare sette volte, la porzione amminoacidica intracellulare è accoppiata ad un complesso trimerico che corrisponderebbe alla proteina G di tipo inibitorio.

Alla scoperta del recettore CB1 ha fatto immediato seguito, nel 1992, l'isolamento dal cervello di maiale, del primo metabolita endogeno in grado di legarsi selettivamente a tale proteina. Si trattava dell'amide tra l'acido arachidonico e l'etanolamina, due componenti ubiquitari delle membrane cellulari animali, che venne chiamata anandamide dalla parola Sanscrita “*ananda*” (stato di grazia) (5).

L'arachidonoiletanolamide (AEA) fa parte di una nuova classe di mediatori lipidici ad azione prevalentemente olocrina e paracrina.

L'AEA (fig. 2) è un neurotrasmettitore che mima gli effetti dei composti psicoattivi presenti nella cannabis. Successivamente furono isolati, sempre dal cervello di maiale, altri due analoghi strutturali dell'anandamide (6), mentre un'altro tipo di molecola, appartenente alla classe degli intermedi metabolici noti come monoacilgliceroli, fu identificata nei tessuti periferici e proposta come ligando del recettore CB2: il **2-arachidonoilglicerolo (2-AG)** (fig. 2). In seguito si è visto che mentre l'anandamide e i suoi analoghi attivano preferenzialmente il

recettore CB1 (7), il 2-AG, che è presente anche nel cervello dei mammiferi (8), può attivare indifferentemente entrambi i tipi di recettori per il THC (9).



-Figura 2-

I recettori CB1 si trovano principalmente nell'encefalo, in particolare nei gangli della base, nel globus pallidus e nella substantia nigra e, in misura minore, nel cervelletto, nell'ippocampo, nel nucleo caudato, nel putamen, nell'ipotalamo e nell'amigdala. Sono stati inoltre individuati, ma con minore densità, anche nei polmoni, nel fegato, nei reni e nelle cellule dell'apparato riproduttivo sia maschile che femminile. I recettori CB1 sono invece assenti nel midollo allungato, la parte del sistema nervoso che presiede al controllo delle funzioni respiratorie e cardiovascolari. La stimolazione dei recettori CB1 è responsabile degli effetti

euforizzanti dei cannabinoidi, ma anche della loro azione antiemetica, antiossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antinfiammatoria, analgesica, antispastica e stimolante dell'appetito.

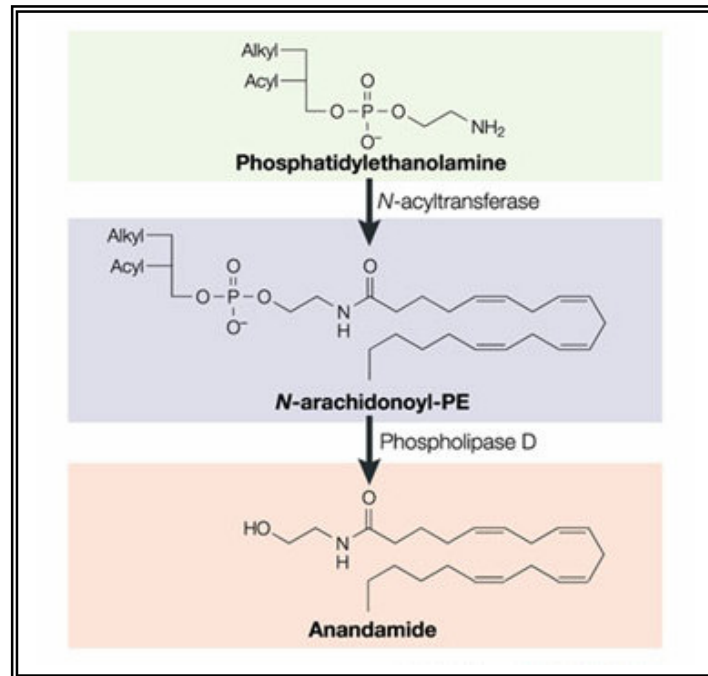
Per quanto riguarda i recettori CB2 si è al lungo ritenuto che si trovassero quasi esclusivamente sulle cellule T del sistema immunitario, con la più alta densità a livello della milza; un recente studio ha invece mostrato la loro presenza anche a livello del sistema nervoso centrale. (10). La stimolazione dei recettori CB2 sembra essere responsabile principalmente della azione infiammatoria e immunomodulatrice dei cannabinoidi.

La scoperta di recettori per il THC e di molecole endogene in grado di attivare tali proteine, simulando così in gran parte i tipici effetti psicotropi (e non) della Cannabis, dimostrava l'esistenza di un sistema cannabinoide endogeno il cui ruolo fisiologico è ancora oggetto di discussione, ed il cui studio futuro potrà portare alla comprensione dei 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 elevato potenziale terapeutico per la cura di malattie del sistema nervoso, immunitario e cardiovascolare.

#### 4. Biosintesi ed inattivazione

Le molecole endogene svolgono un ruolo di mediatori di risposte fisiologiche, quindi devono esistere nelle cellule vie biosintetiche regolabili, cioè meccanismi molecolari in grado di sintetizzare tali sostanze al momento e nel luogo opportuno. Inoltre, il segnale chimico portato da tali molecole deve poter essere terminato, qualora la sua funzione biologica si esaurisca, attraverso vie cataboliche anch'esse regolabili. Il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella modulazione di funzioni fisiologiche sia a livello del sistema nervoso che in tessuti periferici è oggi confermato dalla scoperta di specifici meccanismi biosintetici e degradativi (11). Sia l'anandamide che il 2-AG vengono prodotti a partire da precursori biosintetici fosfolipidici e inattivati mediante ricaptazione da parte delle cellule e successive reazioni di idrolisi e/o esterificazione. In particolare, l'AEA viene prodotta dall'idrolisi dell'N-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE), processo catalizzato da una fosfolipasi di tipo D (12) (fig. 3). Il NArPE, a sua volta, viene prodotto dalla N-trans-acilazione della fosfatidiletanolamina ottenuta prelevando una funzione di acido arachidonico

dalla posizione sn-1 di altri fosfolipidi (13). Quest'ultima reazione è attivata dagli ioni calcio.



-Figura 3-

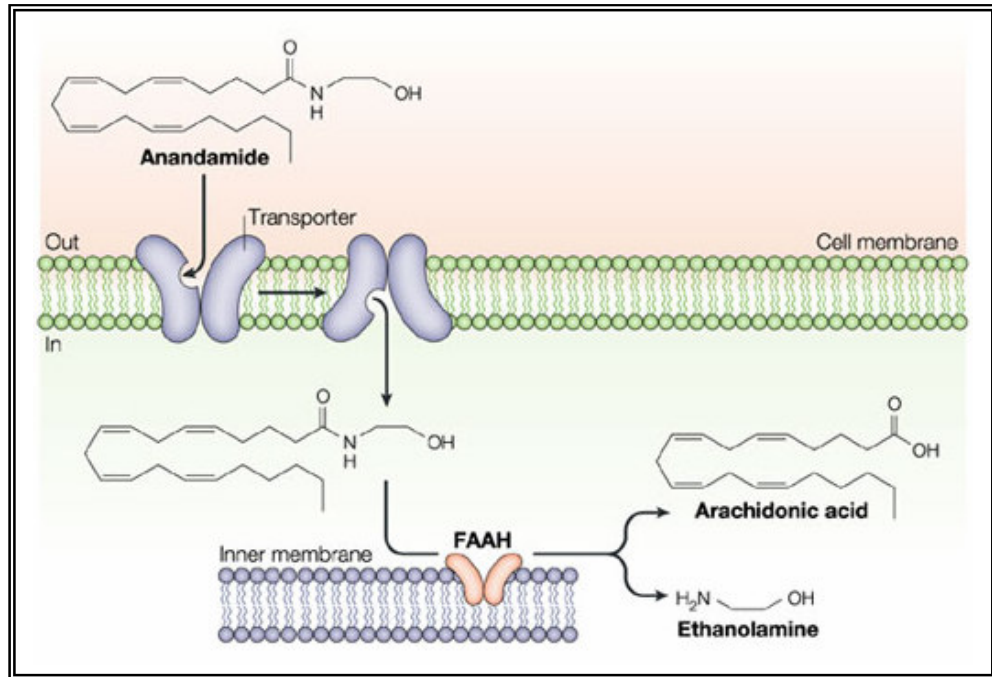
Il 2-AG è invece prodotto dall'idrolisi enzimatica ed enantioselettiva di diacilgliceroli attraverso l'enzima sn-1 diacilglicerolo lipasi (13-15). I diacilgliceroli utilizzati come precursori biosintetici del 2-AG possono essere ottenuti, a loro volta, dall'idrolisi sia del fosfatidilinositolo (15), catalizzata dalla fosfolipasi di tipo C, sia dell'acido fosfatidico (16), catalizzata da una specifica fosfolipasi. Questi meccanismi biosintetici differenziano gli endocannabinoidi

da altri neuromodulatori quali l'acetilcolina, il glutammato, la noradrenalina, che vengono pre-sintetizzati e conservati in vescicole secretorie. Tali vescicole, quando la cellula viene stimolata, rilasciano all'esterno il loro contenuto. L'AEA e il 2-AG, invece, sono sintetizzati a partire dai loro precursori fosfolipidici, contenuti presumibilmente nella membrana cellulare, solo quando la cellula è stimolata, ad esempio dall'ingresso di ioni calcio, e solo allora vengono rilasciati all'esterno della cellula. Tale meccanismo rende gli endocannabinoidi simili ad altri derivati bioattivi dell'acido arachidonico, quali le prostaglandine. Una volta sintetizzati, gli endocannabinoidi si legano ai recettori del THC presenti su cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, comportandosi così come mediatori autocrini o paracrini. Infatti, la loro natura chimica estremamente poco idrosolubile ne impedisce la facile diffusione nella matrice extracellulare o nel sangue. Il legame con i recettori CB1 o CB2, e il successivo inizio di eventi di trasduzione del segnale cannabimimetico, quali, ad esempio, l'inibizione della formazione di AMP ciclico o dell'ingresso di ioni calcio nella cellula, è alla base dell'azione biologica degli endocannabinoidi, la terminazione della quale viene effettuata mediante i seguenti meccanismi: a) ricaptazione da parte delle cellule,

che nel caso dell'anandamide viene facilitata da trasportatori di membrana, b) idrolisi enzimatica, c) riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana (12, 13, 18). Il 2-AG, inoltre, viene anche riesterificato prima della sua idrolisi enzimatica (17). L'enzima che catalizza l'idrolisi dell'anandamide è stato caratterizzato e denominato “fatty acid amide hydrolase” (FAAH) (18) (fig. 4).

In alcune condizioni tale enzima catalizza anche l'idrolisi del 2-AG (17, 19) per il quale, esistono anche altre “idrolisi” più o meno selettive. Sono stati individuati inibitori specifici dell'inattivazione degli endocannabinoidi, sia al livello dei sistemi di ricaptazione (20-22), che per quanto riguarda gli enzimi idrolitici (23-25).





-Figura 4-

Tali molecole possono servire da base per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici da utilizzare per il trattamento di quelle patologie causate o esacerbate da un'eccessiva espressione dei meccanismi di inattivazione o da un difettoso funzionamento dei meccanismi biosintetici degli endocannabinoidi.

## 5. POSSIBILE RUOLO FISIOPATOLOGICO

Benché l'attività farmacologica in vivo ed in vitro degli endocannabinoidi, e in particolare dell'AEA, sia stata oggetto, negli ultimi 10 anni, di numerosissimi

studi (10, 11, 26), solo in pochi casi si è potuto mettere in relazione la sintesi di tali composti nei tessuti con l'intervento di particolari situazioni fisiopatologiche.

Sembra ormai chiaro, tuttavia, che l'AEA è prodotta quando la cellula subisce danni più o meno gravi causati ad esempio, da un'eccessiva concentrazione intracellulare di calcio (27).

AEA e 2-AG vengono prodotte, rispettivamente da macrofagi e piastrine, durante stati ipotensivi seguenti a shock emorragico e endotossinico (28, 29). I livelli di anandamide nell'utero di topo aumentano notevolmente durante la gestazione quando l'organo è meno recettivo all'attecchimento dell'embrione (30).

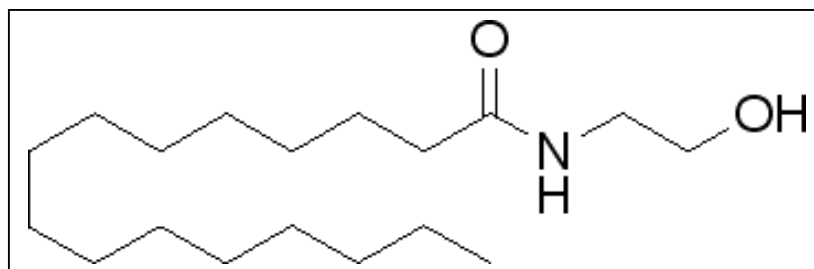
L'attivazione immunologica di mastociti porta ad una stimolazione della sintesi di AEA (31). Questi dati, assieme alle osservazioni farmacologiche che hanno rilevato per tali metaboliti un comportamento analogo a quello dei preparati della Cannabis, sembrano suggerire che gli endocannabinoidi vengono prodotti per proteggere l'organismo da danni causati da varie situazioni patologiche, esercitando azione anti-ossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria e, in particolare, antidolorifica (32). Inoltre, la distribuzione dei recettori cannabinoidi nel cervello (33) suggerisce per gli endocannabinoidi anche

un ruolo fisiologico nel controllo del movimento e della percezione, nell'inibizione dei processi di apprendimento e memoria, nel rafforzamento dell'azione degli oppioidi, nonché nella regolazione di stati emotivi quali il piacere e l'aggressività. E' possibile ipotizzare per tali molecole una funzione 'anti-stress' simile e complementare a quella esercitata dalle endorfine sia a livello centrale che periferico (11). Infine, studi più recenti stanno approfondendo il possibile coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel controllo della proliferazione di cellule tumorali (34).

Indubbiamente, saranno necessari ancora numerosi sforzi per individuare il ruolo fisiopatologico degli endocannabinoidi. Dal successo di tali sforzi dipenderà anche il possibile sviluppo di nuovi farmaci utili nel trattamento di alcuni disturbi del sistema nervoso, immunitario e cardiovascolare per i quali esistono ancora rimedi poco efficaci. Il disegno di nuove molecole con attività selettiva per il recettore CB2, o di sostanze che non siano in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica, potrebbe consentire l'ottenimento di farmaci privi degli indesiderati effetti psicotropici della Cannabis.

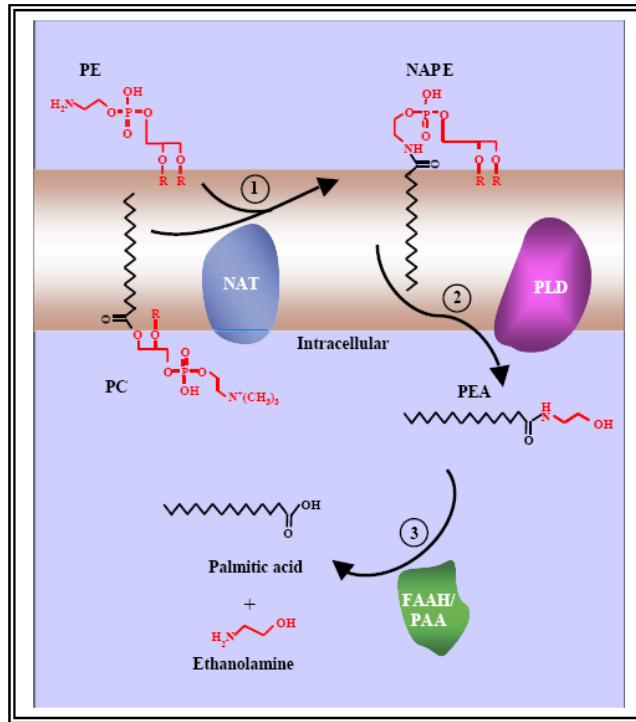
### 3 LA PALMITOILETANOLAMIDE

Nel corso degli ultimi anni diversi ed autorevoli studi hanno ampiamente dimostrato le proprietà analgesiche ed antinfiammatorie della palmitoiletanolamide (PEA), suggerendo per questa molecola di natura lipidica un importante ruolo nel controllo della genesi del dolore in periferia (35, 36) e dei fenomeni infiammatori (37). La PEA, amide tra acido palmitico ed etanolamina (38, 39), è un composto endogeno presente largamente negli organismi viventi animali e vegetali (40) (fig. 5).



-Figura 5-

La PEA, sintetizzata a partire dal precursore fosfolipidico, viene rilasciata in seguito a stimoli lesivi al fine di prevenire l'eccessiva propagazione della risposta infiammatoria o di inibire le reazioni di ipersensibilità ritardata (fig. 6).



-Figura 6-

In particolare la biosintesi della PEA avviene in due passaggi: (1) Il trasferimento AMP ciclico e calcio dipendente del acido palmitico dalla fosfatidilcolina (PC) alla fosfatidiletanolamide (PE), ad opera della N-acil-trsferasi, con formazione dell’N-acilfosfotidiletanolamima (NAPE), successivamente (2) il NAPE diviene substrato di una specifica NAPE-fosfolipasi D con formazione della PEA intracellulare. Il punto 3) della figura mostra l’inattivazione della PEA chrr avviene attraverso un idrolisi operata dalla “N-Acylethanolamine-hydrolyzing

Acid Amidase” (NAAA) per formare l'acido palmitico e l'etanolamina (fig. 6)

(41).

Oltre all'attività antiinfiammatoria, la PEA presenta tutta una serie di effetti farmacologici quali quelli antiepilettici e neuroprotettivi (42-44), inibisce la presa alimentare (45), riduce la motilità gastrointestinale (46), la proliferazione cellulare (47, 48), esplica un'attività di protezione dell'endotelio vascolare in caso di ischemia del miocardio (49) e infine modula la trasmissione del dolore in periferia (32, 35). I primi esperimenti condotti negli anni 50 ed una serie di più recenti studi, hanno dimostrato che la PEA inibisce la degranolazione delle mast cellule (50, 37) e l'infiammazione polmonare nel topo (51). Ross e collaboratori hanno mostrato la capacità della PEA nel ridurre la produzione di ossido nitrico da macrofagi (52).

Diverse proposte sono state avanzate relativamente al meccanismo d'azione: gli animali trattati con la carragenina e nei tre giorni successivi con la PEA (10 mg/kg/die os), mostravano un abbassamento significativo dei livelli di ossido nitrico sintasi (iNOS) e ciclossigenasi (COX-2), suggerendo un meccanismo genomico simile a quello dei farmaci anti-infiammatori steroidei (53); tuttavia diversi studi

dimostrano che la PEA riduce l'inflammation acuta in modo rapido (54. 55), suggerendo l'esistenza anche di un meccanismo non genomico. Poiché l'analgisia prodotta da questa aciletanolamide è veloce e precede l'azione di sostanze anti-inflammatorie, sulla base degli studi condotti da Calignano e collaboratori, è stato ipotizzato che la PEA endogena in condizioni basali sarebbe coinvolta nella regolazione della sensibilità dolorifica (32). Meno note sono le sue funzioni a livello del sistema nervosa centrale (SNC), dove è presente ad alte concentrazioni (56-80). Nonostante il suo elevato potenziale clinico, il recettore responsabile delle proprietà analgesiche ed anti-inflammatorie, rimane sconosciuto. L'analogia strutturale con l'AEA ha suggerito, in un primo momento, che entrambi i lipidi potessero avere in comune la capacità di attivare, in misura differente, i recettori periferici CB2. Diversi studi hanno anche mostrato come l'attività analgesica della PEA, ma non quella antinflammatoria, veniva bloccata dall'antagonista recettoriale CB2, SR144528. Per spiegare tale contraddizione è stato suggerito che la PEA possa agire da falso substrato ed inibire la FAAH, enzima che idrolizza l'AEA (Tiger, 2000). Secondo questa teoria, la PEA potrebbe competere con l'AEA al sito attivo dell'enzima, come falso substrato, producendo un aumento

tissutale dell'endocannabinoide e quindi un'attivazione dei recettori CB2. Nostri recenti studi hanno ampiamente mostrato come il recettore PPAR- $\alpha$  sia indispensabile per gli effetti analgesici ed antinfiammatori della PEA, suggerendo che questo recettore nucleare sia coinvolto nella regolazione delle fasi iniziali dei fenomeni algesci mediante un meccanismo non genomico Hsp90-dipendente (55, 58). Il ruolo esatto della Hsp90 nell'analgesia PPAR- $\alpha$ -mediata richiede ulteriori approfondimenti, tuttavia vi sono due possibili ipotesi: la regolazione del complesso multiproteico PPAR- $\alpha$  e/o la trasmissione rapida di eventi analoghi a quelli indotti dai recettori per gli ormoni steroidei (59). Restano ulteriori punti da chiarire, quali gli effetti degli stimoli fisiologici sui livelli di PEA ed il contributo di tali livelli all'attenuazione degli impulsi algesci nei siti di insulto ed infiammazione tissutale.



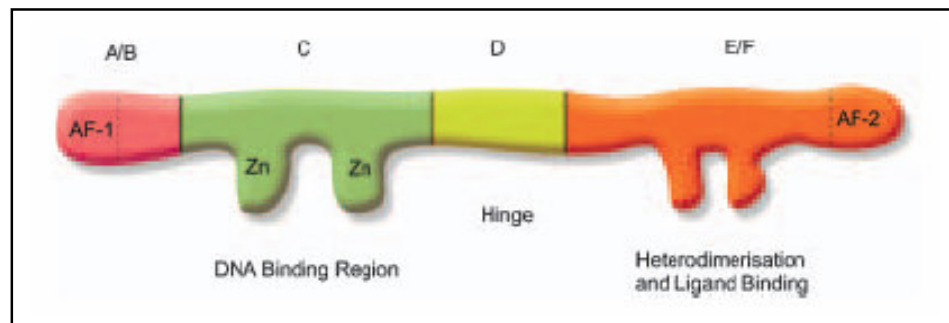
#### **4. I RECETTORI CHE ATTIVANO LA PROLIFERAZIONE**

##### **PEROSSISOMALE**

Un gruppo di recettori nucleari, detti “recettori che attivano la proliferazione perossisomale” (PPARs), è stato identificato negli ultimi dieci anni (60). Questi recettori, appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari, legano diverse molecole, quali acidi grassi, eicosanoidi e numerose sostanze xenobiotiche strutturalmente diverse, note come attivatori perossisomali (61).

Fino ad oggi sono stati identificati tre isotipi recettoriali relativi al gruppo dei recettori PPARs: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$  e PPAR- $\gamma$  (62, 63). Le tre isoforme del PPAR posseggono profili funzionali e strutturali simili. Principalmente sono stati identificati quattro domini, denominati A/B, C, D, E/F. Il dominio A/B ammino terminale, contiene, una funzione di attivazione ligando-indipendente, responsabile della fosforilazione del PPAR. Il dominio obbligatorio del DNA o dominio C promuove il legame del PPAR al PPRE nella regione promotrice dei geni bersaglio, questo è caratterizzato da due porzioni di zinco indispensabili per permettere l’aggancio al DNA. Il sito D è un dominio di aggancio per i cofattori, ed infine il dominio E o “dominio ligando-obbligatorio”(LBD) è responsabile

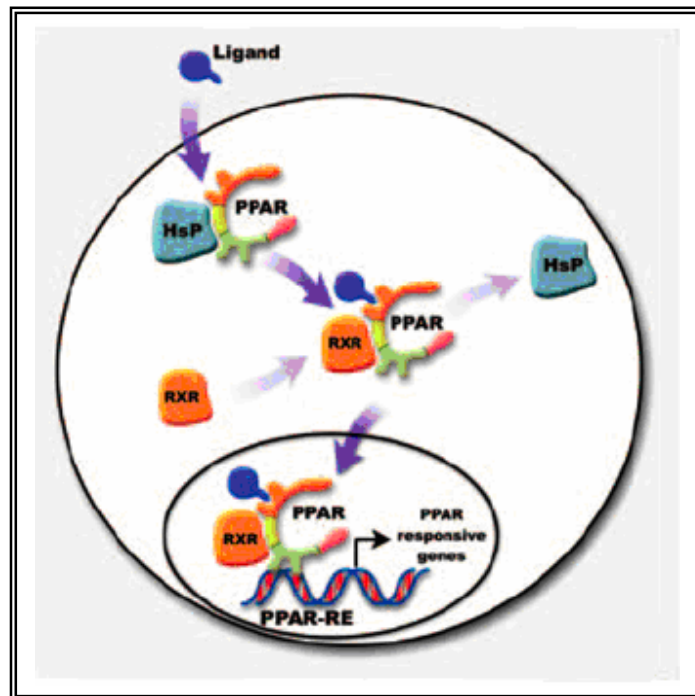
della specificità del ligando e dell'attivazione del PPAR a PPRE, che incrementa l'espressione dei geni bersaglio. L'assunzione di cofattori del PPAR per collaborare ai processi di trascrizione genetica è attuata dalla funzione di attivazione del ligando-dipendente, che è situato nel dominio E/F (fig. 7).



**-Figura 7-**

In seguito al legame con il ligando, il recettore si distacca dalla proteina Heat Shock Protein (Hsp90), ed eterodimerizza con il recettore X trans-retinoico (RXR), tale complesso, PPAR-RXR, migra nel nucleo dove si lega ad una precisa zona del DNA chiamata PPAR response element (PPAR-RE), zona promotrice del gene target. La regione PPAR-RE del DNA è costituita da una sequenza di nucleotidi ripetuta AGGTCA, intervallata da una o due sequenze di nucleotidi random, denominati DR1 e DR2. I PPARs possono sia attivare che reprimere la

trascrizione del gene target, in tale modo riescono da un lato a regolare la metabolizzazione dei lipidi e degli zuccheri e dall'altro, attraverso la trans-repressione, possono interferire negativamente con la trascrizione di proteine pro-infiammatorie (fig. 8).



-Figura 8-

La distribuzione tissutale dei recettori PPAR- $\alpha$ , nell'uomo, è molto simile a quella del ratto, essendo il PPAR- $\alpha$  particolarmente espresso nel tessuto adiposo bruno, nel muscolo scheletrico, nel fegato, nel cuore e nel rene. A livello cerebrale e polmonare si ha, invece, una bassa espressione di questo recettore sebbene

recenti lavori abbiano evidenziato una discreta presenza di questi recettori a livello centrale (64).

Il tessuto dove il PPAR- $\gamma$  è principalmente espresso è il tessuto adiposo, ma questo recettore è espresso, sebbene a bassi livelli, anche in numerosi altri tessuti e tipi di cellule, come nella retina, in parte del sistema immunitario, nell'epitelio mammario e nel colon (65). Per quanto riguarda il sottotipo recettoriale PPAR- $\delta$ , sono stati trovati livelli più elevati rispetto al PPAR- $\alpha$  e al PPAR- $\gamma$ , in quasi tutti i tessuti presi in esame, ad eccezione del tessuto adiposo (65); questo recettore è inoltre ampiamente espresso nel cervelletto, nel talamo e nella corteccia cerebellare del ratto (66).

## **6. MODULAZIONE DEI FENOMENI INFIAMMATORI DA PARTE DEGLI AGONISTI**

### **PPARs**

Diversi dati sperimentali indicano che i sottotipi recettoriali PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  sono coinvolti nella modulazione della risposta infiammatoria sia in vitro sia in vivo (67). La prima indicazione di un possibile ruolo dei PPARs nella modulazione dell'infiammazione si è avuta con la dimostrazione che il leucotriene

B4 (LTB4), un potente eicosanoide proinfiammatorio chemiotattico (68, 69), lega il recettore PPAR- $\alpha$ , attivando, mediante un meccanismo genomico, le vie della  $\omega$ - e  $\beta$ -ossidazione con la possibilità di catabolizzare l'LTB4 stesso (70). Topi PPAR- $\alpha$  knock-out (PPAR- $\alpha^{-/-}$ ) hanno mostrato risposte infiammatorie prolungate quando stimolati con LTB4 o con un suo precursore, l'acido arachidonico, proprio per l'assenza di stimolazione su questi processi catabolici. Inoltre, il trattamento con sostanze in grado di legare il recettore PPAR- $\alpha$ , quali gli acidi grassi  $\omega$ -3 ed il clofibrato ha evidenziato un incremento del catabolismo dell' LTB4 nei macrofagi e nei granulociti (71). Si può ritenere, pertanto, che l'attivazione del recettore PPAR- $\alpha$  da parte di agenti antinfiammatori non steroidei contribuisca alle proprietà antinfiammatorie ed analgesiche di queste sostanze, attraverso la stimolazione delle vie ossidative cataboliche di cui gli eicosanoidi sono substrato.

La riduzione della sintesi di molecole proinfiammatorie, come l'interleuchina-6 (IL-6) e le prostaglandine, sembra esser parte del controllo dell'infiammazione PPAR- $\alpha$  dipendente, attraverso una ridotta attività del fattore nucleare NF- $\kappa$ B (72). PPAR- $\alpha$  agonisti regolano anche la produzione della IL-4, citochina importante nella differenziazione delle cellule Th2 implicate nella protezione

contro lo sviluppo dell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) (73).

Inoltre i ligandi PPAR- $\alpha$ , possono limitare, meccanicamente, il fenomeno infiammatorio anche aumentando l'espressione del I $\kappa$ B- $\alpha$ , il quale blocca la migrazione del NF- $\kappa$ B a livello genomico, fattore, questo, cruciale per la produzione di varie molecole pro-infiammatorie (74).

## 5. IL DOLORE

Il dolore è un'esperienza sensitiva ed emotiva spiacevole, che può derivare dall'alterazione anatomico-funzionale di un organo (ad esempio, a causa di un trauma o di una infiammazione). Da un punto di vista fisiologico, la comparsa di una sintomatologia dolorosa ha un ruolo di protezione dell'organismo, in quanto permette la percezione di una lesione in atto e scatena l'eventuale risposta.

Il dolore non può essere descritto solo come un fenomeno sensoriale, bensì deve essere visto come la composizione di una parte percettiva (la nocicezione), che costituisce la modalità sensoriale che permette la ricezione ed il trasporto al sistema nervoso centrale di stimoli potenzialmente lesivi per l'organismo, e di una parte personale (quindi del tutto privata, la vera e propria esperienza del dolore) che è lo stato psichico collegato alla percezione di una sensazione spiacevole.

L'esperienza del dolore è quindi determinata dalla dimensione affettiva e cognitiva, dalle "conoscenze" passate, dalla struttura psichica e da fattori socio-culturali.

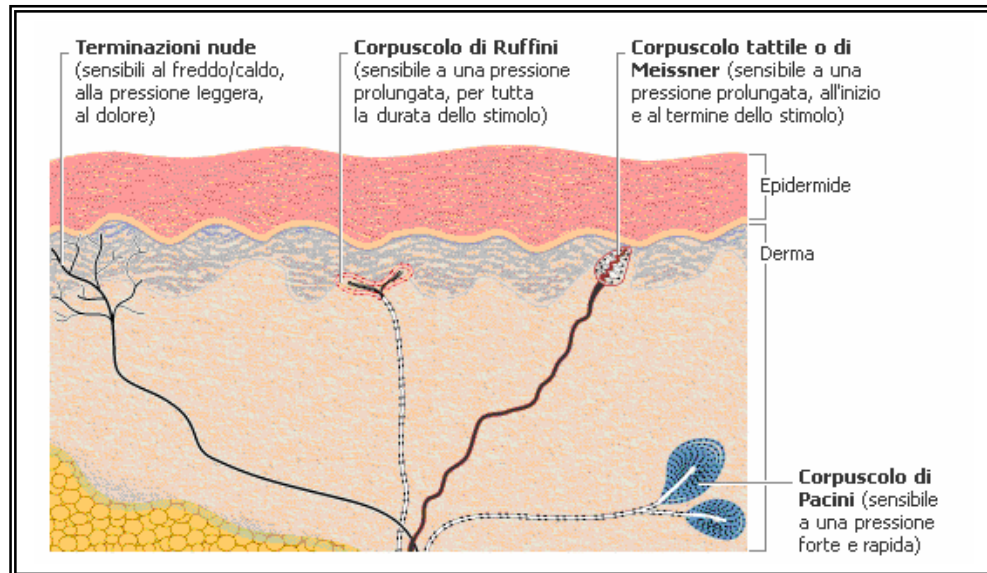
Il dolore viene definito fisiologico quando rappresenta un segnale d'allarme per una lesione tissutale, essenziale per evitare un danno. Diventa patologico quando

persiste per tempi molto lunghi, perdendo il significato iniziale e diventando a sua volta una malattia (sindrome dolorosa)

Nello spessore del derma, lo strato più interno della pelle, si trovano tipi differenti di recettori che permettono di percepire la sensazione dolorosa di diversa natura.

Essi sono formati da sottili fibre nervose che si ramificano e hanno terminazione libera (sensibili alla temperatura, a sensazioni di pressione lievi, come quelle dovute al solletico, o al prurito), oppure protetta da particolari strutture connettivali che, deformandosi in presenza di uno stimolo meccanico (pressione), producono un potenziale di ricezione. La distribuzione dei diversi recettori (termocettori e meccanocettori) non è uniforme in tutto il corpo: sui polpastrelli ve ne sono decine per ogni cm<sup>2</sup>, sulla schiena meno di uno per cm<sup>2</sup> (fig. 9)





-Figura 9-

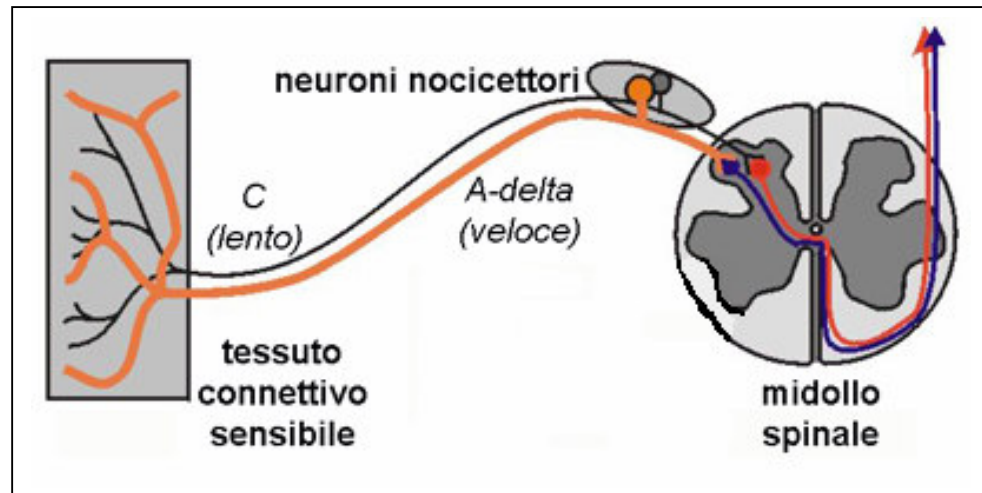
Prima di giungere alla corteccia cerebrale, ed essere in tal modo percepito, lo stimolo muta in tre principali eventi: trasduzione, trasmissione e modulazione.

La **trasduzione** è la conversione, effettuata dai recettori nervosi periferici, di stimoli chimici, meccanici e termici in eccesso in impulsi elettrici che viaggiano lungo le fibre nervose. Il tipo di stimolo è codificato dalla frequenza degli impulsi.

La trasmissione dello stimolo doloroso avviene attraverso vie nervose contenute dapprima nei tronchi (nervi propriamente detti), poi nelle radici e quindi nel midollo spinale, costituendo il fascio spino-talamico. Il talamo, punto di arrivo di queste vie, è un importante centro di smistamento degli input nocicettivi e

sensitivi in generale, soprattutto alla corteccia cerebrale dei lobi frontali e parietali

(fig.10).



-Figura 10-

La **trasmissione** è influenzata da due importanti fenomeni: la cosiddetta sensibilizzazione ed il "gate(cancello) control". La prima, causante l'iperalgisia cioè l'esagerata percezione dello stimolo, è la facilitazione della trasmissione dello stimolo doloroso quando si protrae nel tempo. La teoria del gate control si fonda sull'evidenza che gli altri input sensitivi non dolorifici possono "chiudere il cancello" ed impedire la trasmissione degli input nocicettivi. Poiché le vie nervose che conducono gli stimoli sensitivi periferici verso la corteccia cerebrale hanno

una capacità di conduzione quantitativamente limitata, l'aumento degli input non nocicettivi riduce la trasmissione di quelli dolorifici. Su questo principio si basano tecniche analgesiche come l'agopuntura.

La **modulazione**: alla corteccia cerebrale non giunge lo stimolo esattamente come era partito dal recettore periferico. Infatti durante il suo decorso esso subisce un processo di modulazione: esistono strutture cerebrali, come la zona grigia periacqueduttale e quella del nucleo del rafe magno, da cui originano vie nervose discendenti che vanno ad influenzare, soprattutto a livello del midollo spinale, le vie ascendenti del dolore, riducendo la trasmissione degli stimoli elettrici nocicettivi. I mediatori chimici coinvolti in questi processi sono la serotonina, la noradrenalina ed i cosiddetti oppioidi endogeni, o endorfine, analgesici veri e propri prodotti nel nostro organismo.

Dal punto di vista della durata temporale, il dolore può essere classificato in acuto e cronico.

Il dolore acuto inizia con la stimolazione di uno o più recettori sensoriali, chiamati nocicettori, localizzati nella cute o nelle viscere. Questi recettori ricevono informazioni su stimoli quali il caldo intenso, una forte pressione, punture, tagli e

altri eventi che possono causare danni all'organismo. Il trasporto di queste informazioni dai nocicettori al midollo spinale è affidato a due tipi di fibre nervose: le fibre A- $\delta$ , che trasmettono le informazioni velocemente e le fibre C, che trasmettono gli impulsi più lentamente e causano, probabilmente, la percezione del dolore persistente.

Il dolore acuto può avere eziologie differenti ed inizia con una offesa alle strutture intertegumentali di qualche sistema o organo. In tal caso il danno tissutale provoca la liberazione di sostanze come gli ioni potassio, bradichinina (BK ) e serotonina (5-HT) (75). La BK provoca l'attivazione dei recettori (meccanici-termici) delle fibre C. La 5-HT è responsabile delle reazioni di vasodilatazione ed edema, della risposta tripla descritta da Lewis. La BK attiva la cascata delle fosfolipasiA2/cicloossigenasi che sintetizza numerosi eicosanoidi (prostaglandine, prostaciline, leucotrieni) responsabili dell'amplificazione del dolore.

Il dolore cronico è associato a profonde modificazioni della personalità e dello stile di vita del paziente, esso è caratterizzato da fattori di mantenimento indipendenti dall'azione dei nocicettori. In questa condizioni i pazienti possono lamentare dolore per anni, senza presentare alcuna lesione organica che possa

causarlo. I ricercatori suggeriscono che il dolore cronico sia uno stato comportamentale, avviato da una lesione reale, in cui il dolore è durato così a lungo da diventare esso stesso la malattia. Molti di questi pazienti finiscono per dipendere da forti analgesici e in genere cadono in un ciclo di dolore, depressione e inattività.

Il dolore cronico può essere causato da un'inflammatione persistente, come l'artrite, o da una lesione primaria o disfunzione del sistema nevoso come quello di tipo neuropatico.

L'**artrite** è un'inflammatione a carico dei tessuti molli delle articolazioni del corpo umano dovuta a diverse cause (infezioni, un attacco di gotta, problemi nel sistema immunitario ecc.). Quando l'artrite è causata dall'azione di microrganismi, questi possono introdursi dall'esterno, attraverso ferite, oppure possono giungere all'articolazione colpita per via circolatoria sanguigna provenendo da un altro punto di infezione. Le artriti possono essere suddivise in *artriti acute* e *artriti croniche*. Le prime, assai diffuse, sono per lo più causate da batteri piogeni e provocano gonfiore e rigidità di movimento; le seconde includono forme

aspecifiche degenerative che costituiscono il processo evolutivo dell'artrite acuta, e forme specifiche, più frequenti, quali quelle da brucellosi, tubercolosi, sifilide

L'Artrite reumatoide è una infiammazione cronica a carico del tessuto connettivo, di causa ancora poco conosciuta, che può interessare anche il sistema nervoso, l'apparato respiratorio (pleurite), l'apparato cardiocircolatorio (pericardite e miocardite) e il sangue (anemia). Alla base c'è un errore del sistema immunitario che attacca i tessuti articolari, producendo infiammazioni che li danneggiano.

L'infiammazione parte dalla membrana sinoviale che muta le sue forme fino a diventare il cosiddetto *panno sinoviale* che invade lo spazio circostante impedendo i movimenti e danneggiando la cartilagine, attaccata anche dagli enzimi prodotti durante l'infiammazione. Le articolazioni si presentano tumefatte, arrossate, calde e dolenti. Con il tempo i sintomi peggiorano, arrivando anche a deformazioni e a un coinvolgimento diretto delle ossa (osteoporosi). Sono possibili anche tendiniti e comparsa di noduli sottocutanei.

Il **dolore neuropatico** è un caso a sé stante, in cui il danno spesso irreversibile colpisce proprio il sistema di percezione del dolore; il “campanello d'allarme” in questi casi risulta bloccato e suona in continuazione senza che sia possibile fare

nulla. Le caratteristiche di questo dolore variano da paziente a paziente, ma in genere si hanno sensazioni di bruciore continuo o di scosse elettriche. Stati caratteristici sono l’**“iperalgnesia”**, ovvero quando una leggera stimolazione dolorifica crea un dolore molto spiccato, e l’**“allodinia”** quando una stimolazione non dolorifica viene avvertita come dolore. Spesso sono presenti parestesie, cioè sensazioni anomale anche nelle zone circostanti la sede primaria del dolore.

## 6. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del mio dottorato di ricerca è stato quello di valutare il potenziale terapeutico dell'AEA, sostanza di già documentate attività analgesica (15) nella modulazione del dolore neuropatico, successivamente con l'impiego di un'altro acilderivato la PEA, si è voluto investigare non sono sulle sue proprietà analgesiche ed antiinfaimmatorie, ma in particolar modo sulla individuazione del target molecolare responsabile di tali effetti. La scoperta che l'oleoiletanolamide (OEA), un'amide lipidica strutturalmente correlata alla PEA, prenda parte alla regolazione del senso di sazietà e del peso corporeo attraverso l'attivazione del recettore PPAR- $\alpha$  (76)e le diverse evidenze sperimentali sul coinvolgimento degli agonisti PPAR- $\alpha$  nel controllo dei processi di tipo infiammatorio, ci hanno suggerito l'ipotesi che anche la PEA potesse agire su questo recettore nucleare innescando i suoi tipici effetti analgesici ed antinfiammatori.



## **7. MATERIALI**

### **7. SOSTANZE**

La PEA è stata preparata sinteticamente. L'acido palmitico è stato acquistato presso la Nu-Check Prep (Elysian, Minnesota), l'SR141716A e l'SR144528 sono stati forniti dal RBI (Natick, Massachusetts) sulla base del Chemical Synthesis Program del National Institutes of Health. Il GW501516 e la geldanamicina sono stati gentilmente donati, rispettivamente, dal Prof. G. Tarzia e dal Dr. B. Di Giacomo dell'università di Urbino e dal Dr. R. Schultz (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland).

Tutti gli altri composti utilizzati in questo lavoro sono stati acquistati presso la Tocris (Avonmouth, United Kingdom) e presso la Sigma (St. Louis, Minnesota).

Le soluzioni da somministrare sono state preparate immediatamente prima di ogni esperimento, utilizzando una soluzione salina sterile (0.9% NaCl), contenente il 5% di Polietilenglicole (Peg) e 5% di Tween 80.

## 8. ANIMALI

Per i nostri esperimenti abbiamo utilizzato ratti maschi del ceppo Wistar (200-250g), topi maschi del ceppo C57BL6 wild type e C57BL6 PPAR- $\alpha^{-/-}$  knock-out (20-25g) e topi maschi del ceppo Swiss (20-25g). Gli animali hanno stabulato in gabbie di plexiglas con accesso ad acqua e cibo *ad libitum*, e con cicli alternanti di 12 ore di luce artificiale e 12 ore di buio. Tutte le procedure sperimentali utilizzate in questo lavoro sono in accordo con le direttive del Ministero Italiano Della Salute (D.L.116/92).

## **8. METODI**

### **▪ MODELLI COMPORTAMENTALI DI DOLORE ACUTO**

#### **I) TEST DELLA FORMALINA**

Il test consiste nell'iniettare formalina al 5% nella zampa posteriore del topo così da indurre un comportamento nocifensivo che porta l'animale a leccarsi la zampa sottoposta al trattamento. Il test della formalina consta di due distinte fasi. La prima, di tipo sensoriale, ha inizio immediatamente dopo l'iniezione di formalina ed è caratterizzata proprio dall'attivazione delle fibre sensoriali C ed A $\delta$ ; la seconda fase del test viene definita di tipo infiammatorio in quanto associata alla liberazione dei mediatori dell'infiammazione (76) ed ad una sensibilizzazione centrale (77). La prima fase viene monitorata per i primi 15 minuti immediatamente successivi all'iniezione di formalina, la seconda per i successivi 30 minuti.

## **II) EDEMA DELLA PINNA AURICOLARE**

Il 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (0.03% peso-volume) è stato sciolto in acetone ed applicato topicamente sulla superficie esterna della pinna auricolare del topo (78). Tale applicazione produce, col tempo, un'inflammatione localizzata con aumento della permeabilità vascolare e richiamo di cellule pro infiammatorie. La sostanza da testare è stata somministrata 45 minuti e 4 ore dopo l'applicazione del TPA; 18 ore dopo gli animali sono stati sacrificati e sono state asportate e pesate delle parti della pinna auricolare per la misurazione dell'edema.

## **III) WRITHING TEST**

E' stata effettuata un'iniezione di magnesio solfato ( $\text{MgSO}_4$ ) intraperitoneale ( $120\text{mg/kg}^{-1}$  in 0.5 ml. i.p.) in topi tenuti a digiuno per 12 ore (79). La somministrazione di tale sostanza produce un acuto dolore viscerale visibile e riconoscibile dagli stiramenti (writhing) che i topi fanno subito dopo l'iniezione. Il test dura un tempo di 5 minuti e le sostanze sono state somministrate 30 minuti prima dell'esperimento.

#### **IV) EDEMA DA CARRAGENINA**

E' stata somministrata  $\lambda$ -carragenina (2% peso-volume in 20 $\mu$ l di sol. Fis.) nella zampa posteriore del topo mediante un ago da 27 gauge (80). Anche in questo caso successivamente l'intraplantare di carragenina si avrà aumento della permeabilità vascolare con formazione di edema. La sostanza da testare è stata somministrata 30 minuti dopo la carragenina per via intraperitoneale. Gli animali sono stati sacrificati e sono state asportate e pesate le zampe per la misurazione dell'edema.

#### **9. ANALISI STATISTICA**

I risultati sono espressi come media  $\pm$  s.e.m. di  $n$  esperimenti. I valori sono stati confrontati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via seguita dal Dunnett's test ed i risultati considerati significativi per  $P < 0.05$ .

## 10. MODELLI SPERIMENTALI DI DOLORE CRONICO

### I) DOLORE NEUROPATICO DA LEGATURA DEL NERVO SCIATICO

La legatura monolaterale del nervo sciatico nel ratto è stata eseguita secondo la metodica descritta da Bennett e Xie (81). L'animale viene anestetizzato con Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (5mg/kg), si procede depilando la zona da operare e si pratica una incisione nella parte posteriore laterale sopra la coscia, mettendo in evidenza il nervo sciatico sinistro; all'altezza del bicipite femorale in prossimità della triforcazione dello sciatico, circa 12 mm del nervo è esposto e sottoposto a quattro legature lasse, con filo di seta 3.0, distanti 2 mm l'una dall'altra, al fine di preservare la circolazione epineuronale. La ferita viene disinfettata con streptomina in polvere e chiusa con un punto di sutura interno e tre esterni. Con il gruppo *Sham*, si procede similmente, quindi esponendo il nervo sciatico, ma senza operare alcuna legatura.

Inoltre, il modello ampiamente utilizzato di dolore neuropatico nel ratto, è stato da noi modificato per poter sviluppare la neuropatia anche nel topo. Questa nuova procedura prevede alcune varianti rispetto alla precedente metodica; successivamente all'anestesia si pratica un'incisione all'altezza del bicipite

femorale esponendo il nervo sciatico sinistro su quale, si praticano due legature lasse distanziate di circa 3 mm l'una dall'altra utilizzano un filo di seta 7.0. Infine la ferita dopo essere stata disinfettata, viene chiusa con un punto di sutura interno e due esterni.

## **II) INFIAMMAZIONE CRONICA DA ADIUVANTE COMPLETO DI FREUND**

### **(CFA)**

Nella zampa dell'animale si somministra un volume di 0.1ml, l'adiuvante completo di Freund (CFA) (82). Il CFA, miscela di un olio non metabolizzabile (olio minerale), un agente tensioattivo ed un microbatterio (*tuberculosis o butyricum*) è stato usato per molti anni per aumentare le risposte immunologiche agli antigeni; perfino oggi è considerato come uno degli adiuvanti più efficaci. È preparato come emulsione dell'acqua-in-olio unendo un volume di CFA con un eguale volume di soluzione acquosa dell'antigene (Ag).

Dopo l'iniezione, l'CFA causa una risposta infiammatoria cronica che può essere severa e dolorosa per l'animale secondo il luogo così come la quantità e la qualità di adiuvante iniettato. La risposta infiammatoria può provocare la formazione dei

granulomi cronici, degli ascessi sterili, e/o necrosi ulcerative del tessuto, uno stato comportamentale simili all'artrite .

I test comportamentali utilizzati per valutare lo sviluppo dello stato neuropatico e dell'insorgenza dell'infiammazione da CFA sono il Randall-Selitto test, per l'iperalgia meccanica e il Plantar test, per l'iperalgia termica.



## **TEST COMPORTAMENTALI**

### **I) IPERALGESIA MECCANICA (RANDALL-SELITTO)**

La stimolazione meccanica viene eseguita nel ratto attraverso l'utilizzo del Randall-Selitto Apparatus (Ugo Basile), strumento costituito da un pistone collegato ad una peso (g) azionato tramite un pedale. Il pistone viene applicato sulla zampa dell'arto che ha subito la legatura (ipsilaterale) sia sulla controlaterale, avviando con il pedale il peso, si valuterà il grado di resistenza allo stimolo meccanico espresso in grammi di latenza di ritiro della zampa.

Il cut-off è fissato a 30 grammi.

Per il topo invece si applica sulla pianta della zampe un peso costante (12 g) e si valuterà il tempo di resistenza allo stimolo pressorio espresso in secondi.

Il cut-off è fissato a 60 secondi.

### **II) IPERALGESIA TERMICA (PLANTAR TEST APPARATUS)**

L'iperalgia termica è misurata mediante la registrazione del tempo di resistenza all'irradiazione di calore, per mezzo di un raggio infrarosso, al livello della zampa, usando il Plantar Test Apparatus (PTA, Ugo Basile). Gli animali sono

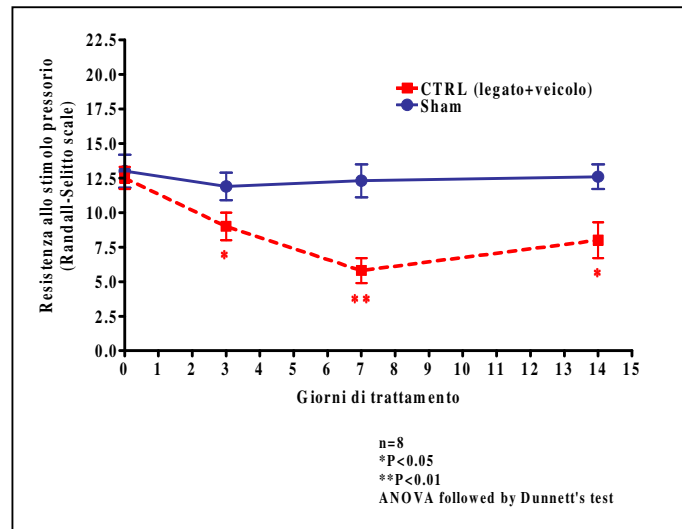
posti in una camera di plexiglass costituita da un pavimento di vetro e fatti ambientare per 10-15 minuti. Il cut-off, per questo test è fissato a 30 secondi.

## **11. ANALISI STATISTICA**

I risultati sono espressi come media  $\pm$  s.e.m. di  $n$  esperimenti. I valori sono stati confrontati utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie seguita dal Bonferroni post test ed i risultati considerati significativi per  $P < 0.05$ .

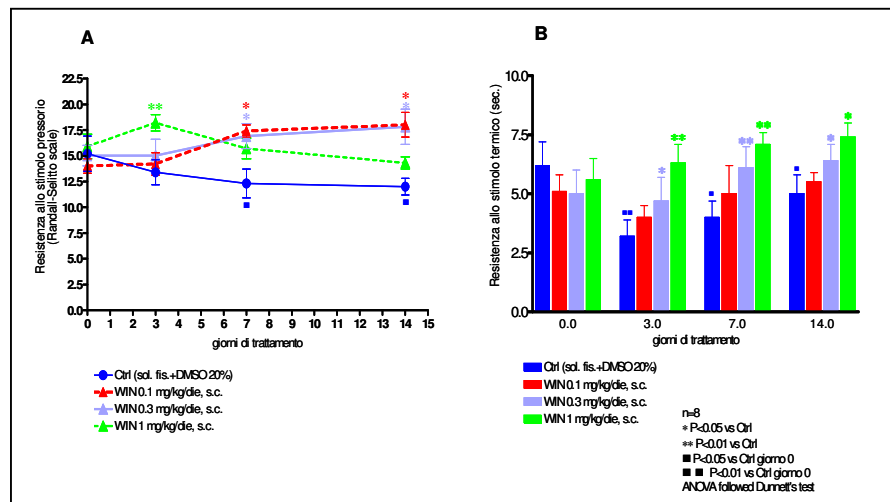
## 9. RISULTATI

Nel corso del primo anno di dottorato lo scopo del mio lavoro è stato quello di valutare come il sistema cannabinergico potesse influenzare il dolore neuropatico. La metodica messa a punto da Bennett e Xie (81), sviluppa, nell'animale legato, un marcato stato iperalgesico (linea tratteggiata rossa) rispetto agli animali falsamente operati (sham, linea continua blue) (fig. 11); su tale iperalgesia abbiamo testato due sostanze cannabinomimetiche l'agonista endogeno anandamide (AEA 1-20 mg/kg) e l'agonista sintetico WIN55,212-2 (0.1-1 mg/kg).



-Figura 11-

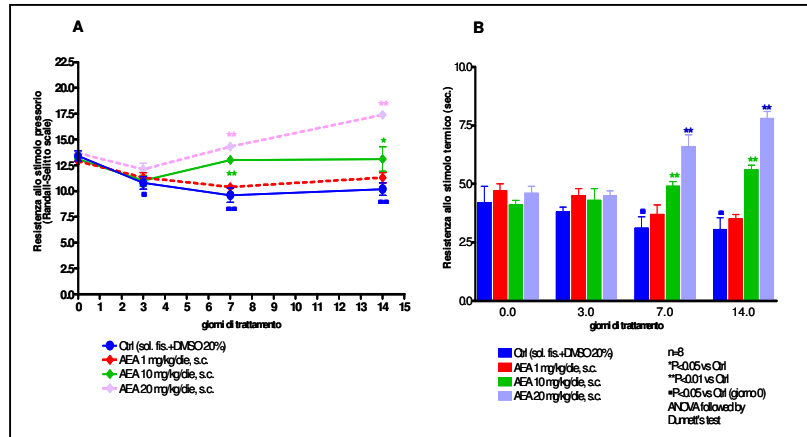
La somministrazione sistemica cronica del agonista CB sintetico riduceva significativamente la soglia di percezione sia allo stimolo pressorio (fig. 12 A), sia a quello termico (fig. 12 B); l'effetto analgesico massimale si osservava nel Randall-Selitto test con la dose di 1 mg/kg al 3° giorno e si riduce al 7° e 14°, mentre con la dose di 0.1 e 0.3 mg/kg si osservava una analgesia significativa solo al 7° e 14° giorno (fig. 12 A). Nel plantar test, la dose di 0.3 e 1mg/kg sono risultate essere significative a tutti i tempi sperimentali (fig. 12 B).



-Figura 12-

Lo stesso effetto antiiperalgessico, ma con un più chiaro andamento dose-dipendente, si osserva con l'impiego dell'AEA. In questo caso la dose intermedia (10 mg/kg) e quella più alta (20 mg/kg) si sono dimostrate inefficaci al 3° giorno

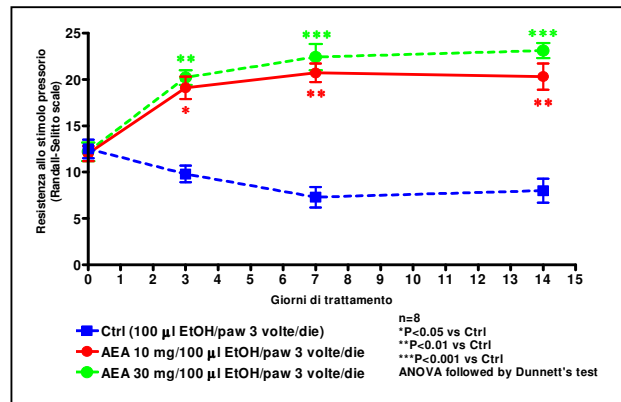
mentre al 7° ed al 14°, il trattamento cronico aumentava il tempo di latenza sia nella stimolazione meccanica (fig. 13 A) che in quella termica (fig. 13 B). La dose di 1 mg/kg è risultata inefficace in entrambi i test a tutti i tempi sperimentali.



-Figura 13-

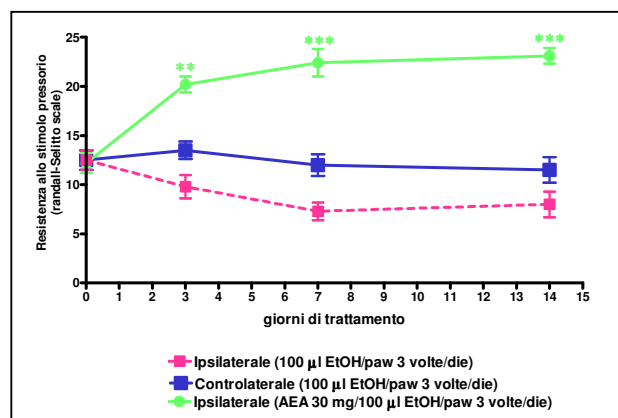
A causa dei marcati effetti centrali abbiamo voluto verificare se l'applicazione topica dell'endocannabinoide sulla zampa dell'arto legato producesse un minore assorbimento sistemico, ed un miglioramento della condizione iperalgesica. L'applicazione topica di AEA (10-30 mg/100 µl EtOH-3 volte/giorno) è risultata efficace quanto la somministrazione sistemica nella stimolazione meccanica (fig. 14) ed anche in quella termica, con il vantaggio che l'attività del cannabinoide si

localizzava unicamente sulla zampa dell'arto trattato, con un effetto *periferico e locale*.



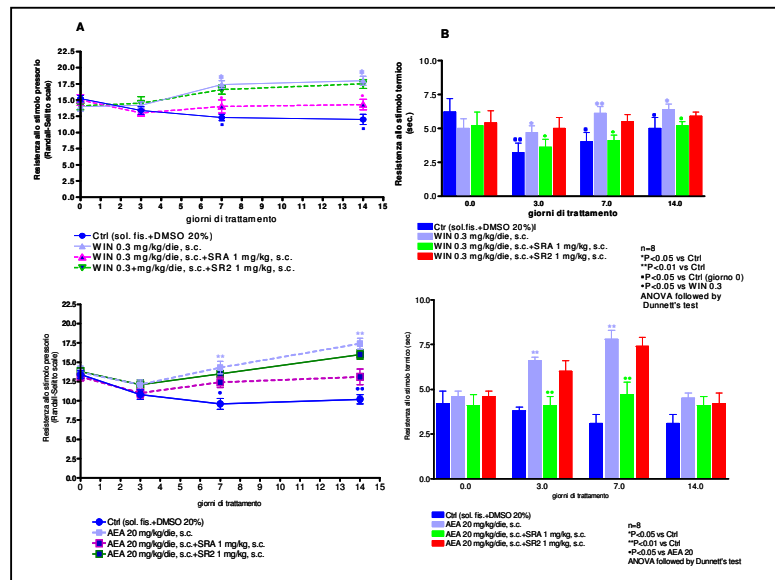
-Figura 14-

Tale ipotesi è stata confermata dai risultati ottenuti dalla controlaterale che successivamente all'applicazione topica di AEA alla dose di 30 mg/100 µl EtOH-3 volte/giorno, non mostrava, ai tempi sperimentali, nessuna alterazione alla percezione del dolore (fig. 15).



-Figura 15-

L'analgisia prodotta dal WIN e dall'AEA su entrambi i test è stata revertita significativamente dalla somministrazione in acuto dell'antagonista CB1, SR141716A (1 mg/kg, s.c.), ma non dall'antagonista CB2, SR144528 (1 mg/kg, s.c.). Tale risultato suggerisce chiaramente che l'azione è mediata prevalentemente dal recettore CB1 (fig. 16).



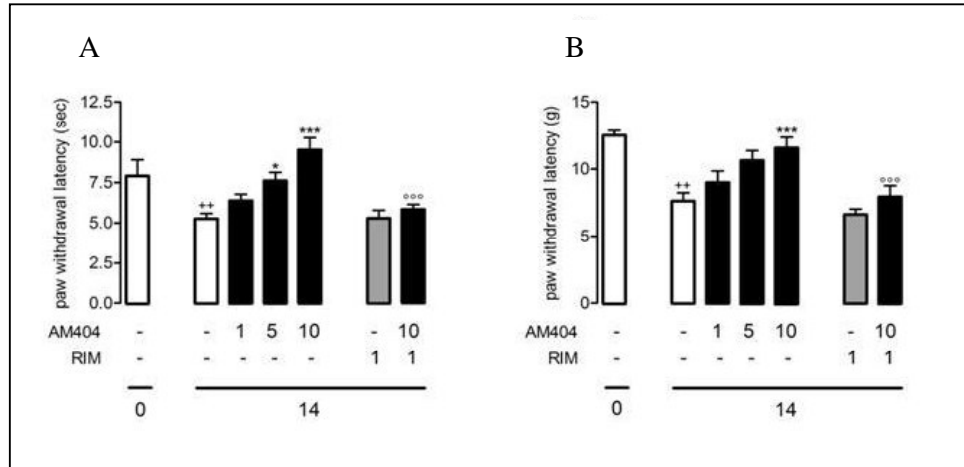
-Figura 16-

Durante il secondo anno abbiamo valutato l'attività analgesica dell'AM404, un inibitore del trasportatore del cannabinoide endogeno, nello stesso modello sperimentale. Tale sostanza si è rivelata una valida alternativa alle già note

molecole cannabino mimetiche, suggerendo un nuovo target quale quello del sistema di trasporto dell'AEA (83).

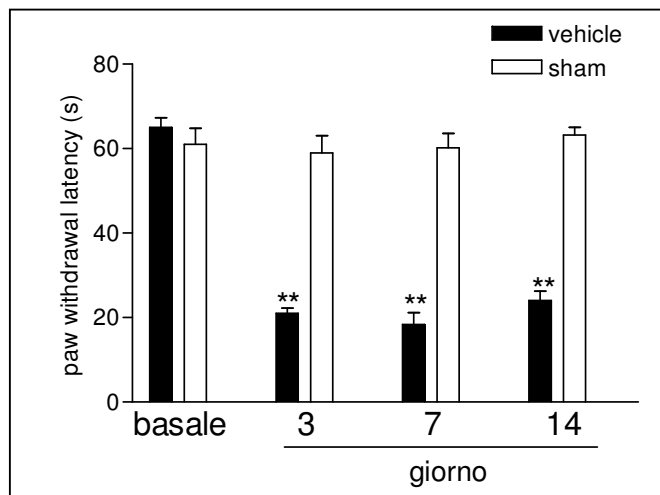
Il trattamento cronico con AM404 ha prodotto una riduzione dose-effetto sia dipendenti dell'iperalgia termica (fig. 17 A) che in quella meccanica (fig. 17 B); in figura è riportato solo l'effetto al 14° giorno ma un'efficacia simile si è anche osservata al 3 e 7° giorno. La colonna che apre le due figure rappresenta il giorno 0, ossia il valore basale della misurazione prima della legatura del nervo, mentre le quattro colonne successive rappresentano rispettivamente il veicolo (colore bianco) e l'AM404 nelle tre dosi utilizzate (1-10 mg/kg); infine le ultime due colonne rappresentano l'uso dell'antagonista recettoriale CB1, Rimonabant, da solo (colore grigio), e in presenza dell'AM404. Si nota come l'AM404 risulti significativo già alla dose di 5 mg/kg solo nel plantar test, mentre alla dose di 10 mg/kg mostrava in entrambi i test, una maggiore efficacia nell'aumentare la latenza di ritrazione della zampa. L'utilizzo del Rimonabant (1 mg/kg), somministrato in acuto, ha revertito in maniera significativa sia l'analgesia termica che meccanica, confermando, il possibile coinvolgimento del recettore CB1.





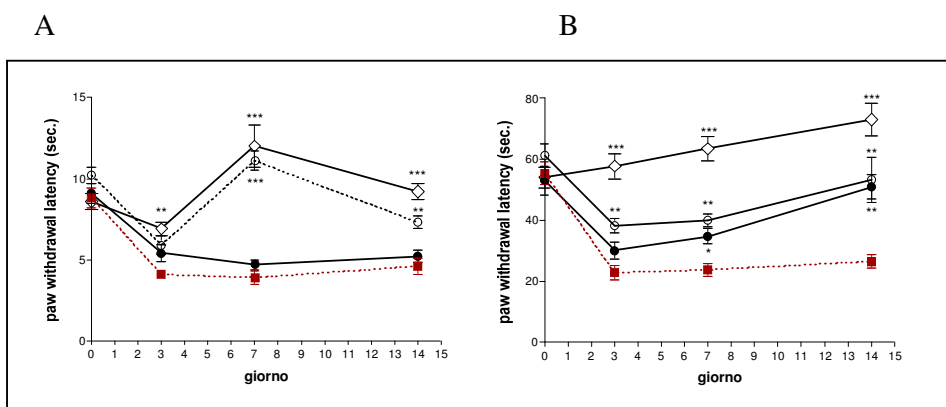
-Figura 17-

Infine nel corso del terzo anno ci siamo interessati dell'altra aciletanolamide endogena, la palmitoiletanolamide e degli effetti analgesici che questa, ed altri PPAR- $\alpha$  agonisti, mostrano in diversi modelli sperimentali. Uno dei primi test utilizzati è stato quello della legatura del nervo sciatico nel topo; questo metodo riproduce, così come nel ratto, un chiaro stato iperalgesico rispetto agli animali a cui si è praticata il solo intervento chirurgico (sham) (fig. 18).



-Figura 18-

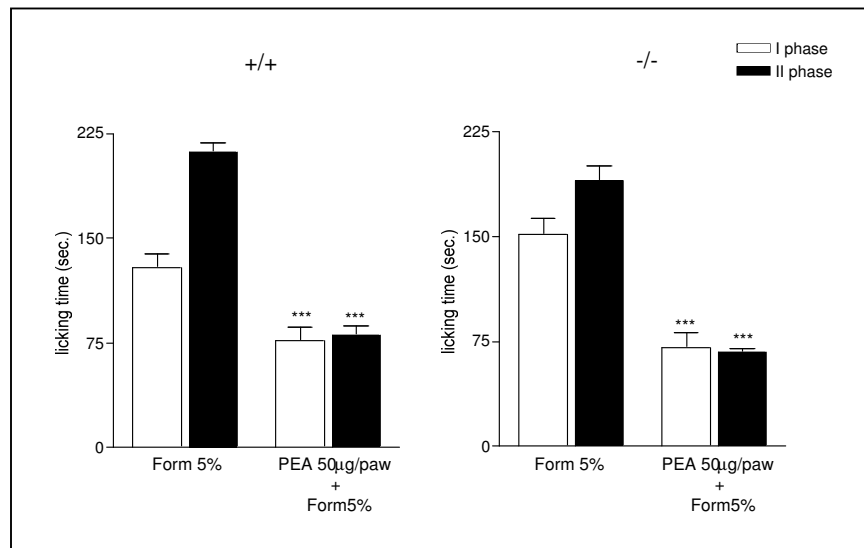
Nell'iperalgeisa termica, la somministrazione di PEA alla dose più di 30 mg/kg (◆) risultava essere attiva ai giorni 3°, 7° e 14°, la dose di 15 mg/kg (○) mostrava un'efficacia solo ai giorni 7° e 14°, mentre con quella di 5 mg/kg (●) non si osserva alcuna variazione significativa rispetto alla somministrazione del solo veicolo (■) (fig. 19A). Sulla stimolazione meccanica la PEA alla dose di 5 mg/kg (●) è risultata significativamente efficace ai giorni 7° e 14°, mentre con le dosi di 15 mg/kg (○) e 30 mg/kg (◆) l'efficacia compariva già al 3° giorno e si mantiene significativa fino al 14° (fig. 19B).



**-Figura 19-**

Alla luce delle controversie sorte in riferimento al meccanismo della PEA, ed in particolare per chiarire se i suoi effetti analgesici sono mediati dal recettore CB2, abbiamo utilizzato topi wild-type (+/+) e knock-out (-/-) per tale recettore in un modello di dolore acuto quale il paw licking test. Come già descritto in precedenza la formalina provoca un dolore sensoriale immediato (primi 15 minuti) per l'attivazione delle fibre C ed A $\delta$ , ed un dolore ritardato di tipo infiammatorio (15-45 minuti); la somministrazione della sola formaldeide al 5% nella zampa, produceva un intenso dolore sia in prima (colonna bianca) che in seconda (colonna nera) fase. La PEA somministrata insieme alla formaldeide 5%, alla dose di 50  $\mu$ g, riduceva in maniera significativa lo stimolo dolorifico, sia nei topi wild-type (+/+), che in quelli knock-out (-/-) (fig. 20). Ciò suggerisce che

l'effetto analgesico della PEA non era attribuibile all'interazione con il recettore CB2, ma che il meccanismo prevede l'attivazione di un altro recettore non ancora identificato.

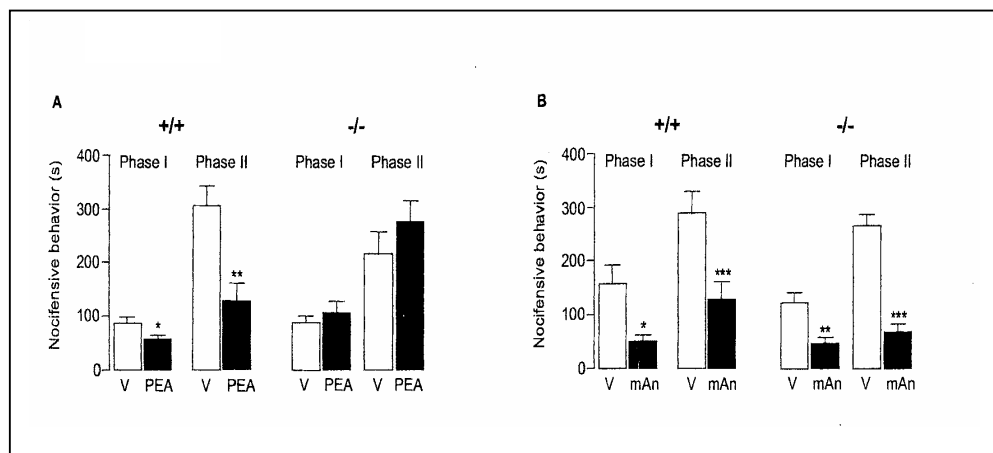


-Figura 20-

Sulla base di questo presupposto e del fatto che esiste una affinità strutturale tra la PEA e OEA agonista PPAR- $\alpha$ , abbiamo valutato la possibilità che la PEA potesse attivare questo recettore.

Per confermare tale possibilità, sono stati eseguiti diversi test comportamentali, utilizzando topi in cui mancasse il recettore PPAR- $\alpha$ .

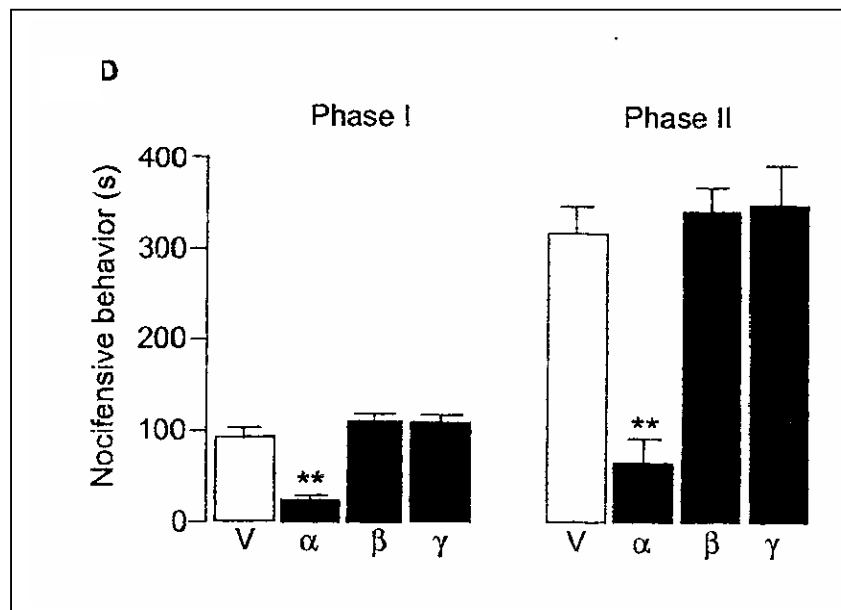
Nel paw licking test, l'iniezione intraplantare (i.pl.) di formalina ha indotto un comportamento nocifensivo simile sia nei topi wild-type (+/+) sia in quelli PPAR- $\alpha$  knock-out (-/-) (fig. 9A colonna bianca). La PEA (50  $\mu$ g, i.pl.), somministrata insieme alla formalina, ha ridotto lo stimolo algogeno soltanto nel ceppo wild-type, risultando inefficace nel gruppo PPAR- $\alpha$ <sup>-/-</sup> (fig. 21A).



**-Figura 21-**

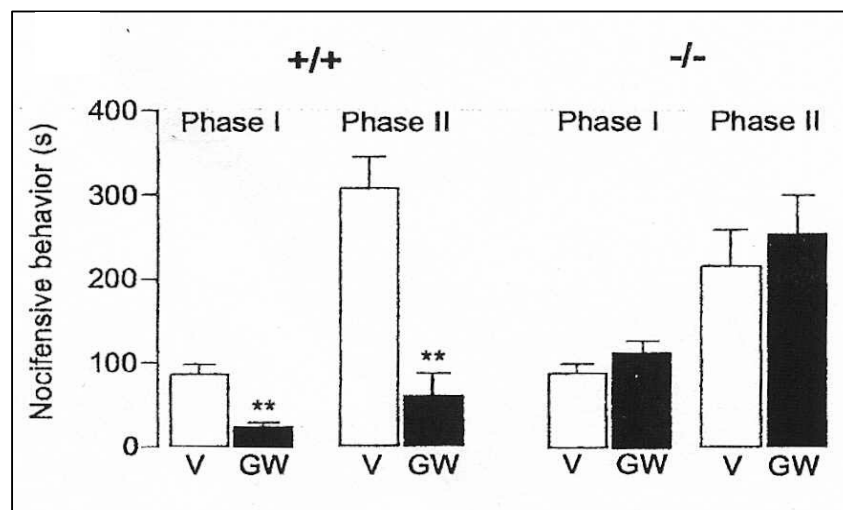
Di contro, l'agonista cannabinergico metanandamide (50 $\mu$ g, i.pl.) ha inibito il dolore indotto dalla formalina in entrambi i ceppi (fig. 21 B), suggerendo che l'attivazione del recettore PPAR- $\alpha$  sia specificamente richiesta per gli effetti analgesici della PEA, e che non esiste una correlazione tra questo sistema e quello

cannabinergico. Per verificare se l'effetto analgesico fosse prerogativa dei soli recettori PPAR- $\alpha$ , e che non ci fosse attività degli altri PPARs recettori, abbiamo utilizzato agonisti del PPAR- $\beta/\delta$  (GW501516) o del PPAR- $\gamma$  (ciclitazione) (a dosi di 50 $\mu$ g, i.pl.), i quali, in condizioni sperimentali analoghi a quelli utilizzate per i PPAR- $\alpha$  agonisti, non hanno mostrato alcun effetto nella modulazione del dolore (fig. 22).



-Figura 22-

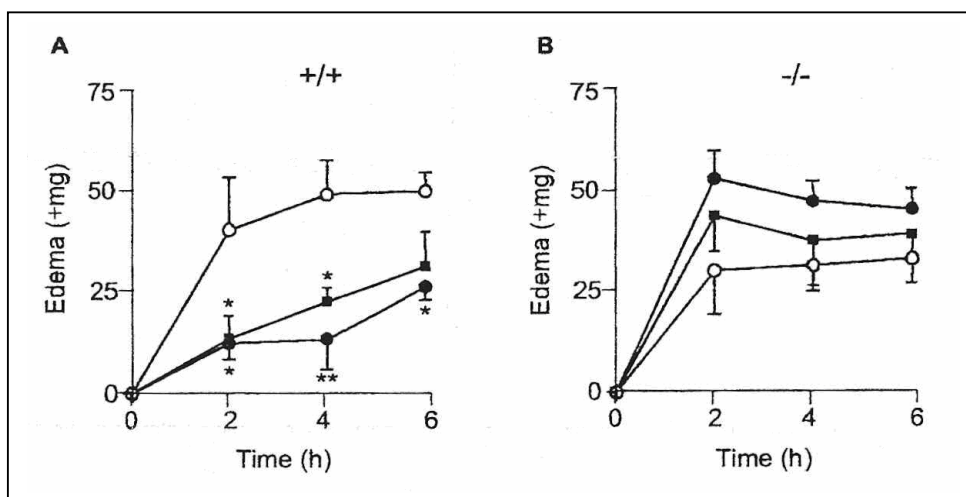
Analogamente alla PEA, anche il GW7647, agonista sintetico dei PPAR- $\alpha$ , ha indotto analgesia solo nei topi di tipo wild-type C57BL6 (+/+), ma non nei knock-out PPAR- $\alpha$  (-/-) (fig. 23), confermando l'importanza di questo recettore nella trasmissione periferica del dolore.



-Figura 23-

Successivamente abbiamo cercato di capire se anche gli effetti antinfiammatori della PEA fossero PPAR- $\alpha$  mediati. Abbiamo quindi, indotto l'edema nella zampa di topi C57BL6 mediante iniezione locale di  $\lambda$ -carragenina. Il trattamento con la PEA (10mg-kg<sup>-1</sup>, i.p., ●) o con il WY14643 (20mg-kg<sup>-1</sup>, i.p., ■), agonista di

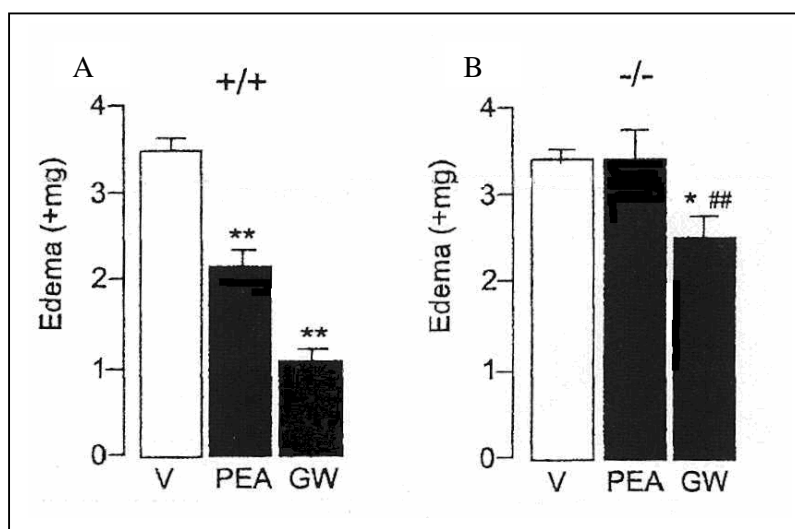
sintesi, ha ridotto l'edema prodotto dalla carragenina (veicolo, ○) nei topi di tipo wild-type (+/+) (fig. 24 A), ma non in quelli knock-out PPAR- $\alpha$  (-/-) (fig. 24 B).



-Figura 24-

Con l'applicazione topica dell'estere del forbolo 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) abbiamo utilizzato un altro modello di infiammazione acuta quale quello dell'edema della pinna auricolare. La somministrazione topica di PEA o di GW7647 (entrambi a 300 nmol-cm<sup>2</sup>, due volte in 4h) ha ridotto la formazione dell'edema negli animali del ceppo wild-type (+/+) (fig. 25. A), ma non in quelli PPAR- $\alpha$  knock-out (-/-) (fig. 25 B).



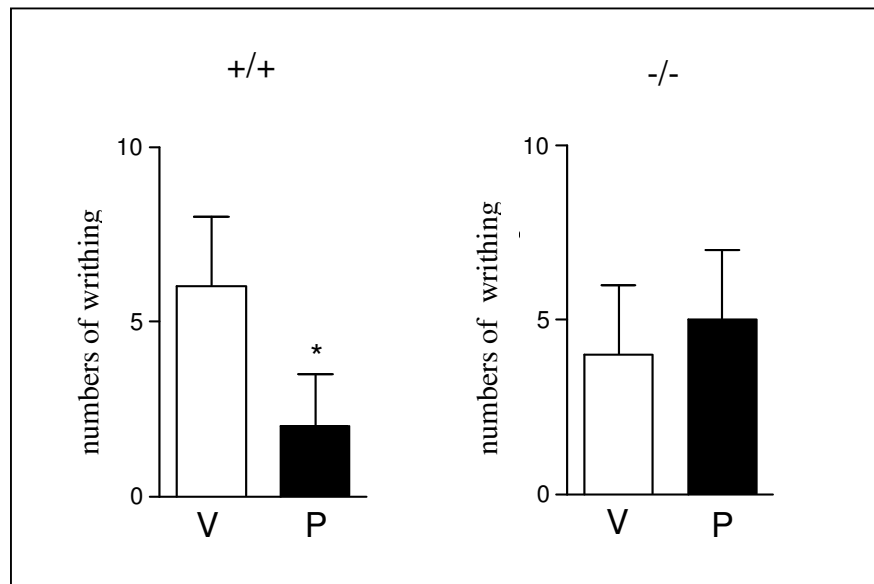


-Figura 25-

Risulta interessante il dato che nei topi PPAR- $\alpha$ <sup>-/-</sup> il GW7647 conserva una debole attività antinfiammatoria (fig. 25 B): ciò potrebbe essere dovuto ad una possibile affinità di questa molecola con il recettore PPAR- $\gamma$ , di cui è noto il ruolo nella soppressione dei fenomeni infiammatori (84).

Per confermare ulteriormente il ruolo della PEA, e quindi dei PPAR- $\alpha$ , nella modulazione della trasmissione dolorifica, abbiamo utilizzato un altro test di dolore acuto, il writhing test. La somministrazione intraperitoneale di MgSO<sub>4</sub> produceva un dolore viscerale, causando lo stiramento (writhing) del topo sia nel ceppo wild-type (+/+) che in quello knock-out (-/-) (fig. 26 colonna bianca). La pre-somministrazione di PEA 30 mg/kg riduce significativamente tale

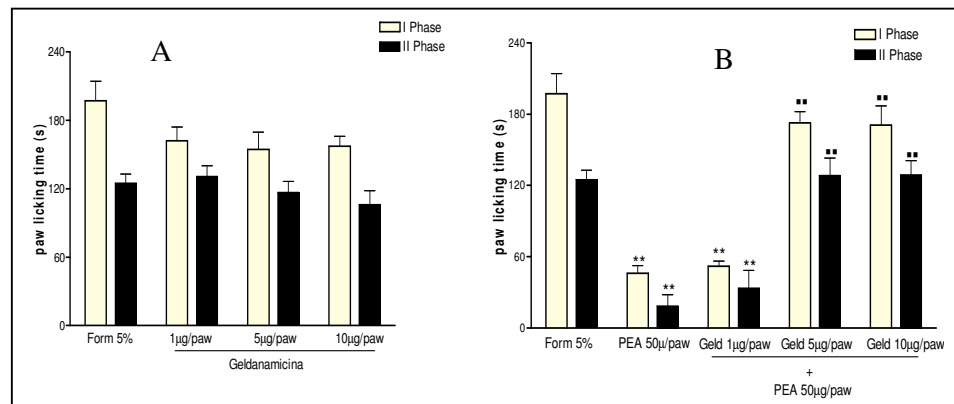
comportamento nocifensivo solo nei topi wild-type (+/+) ma non modifica lo stato dolorifico in quelli knock-out (-/-) (fig. 26 colonna nera).



-Figura 26-

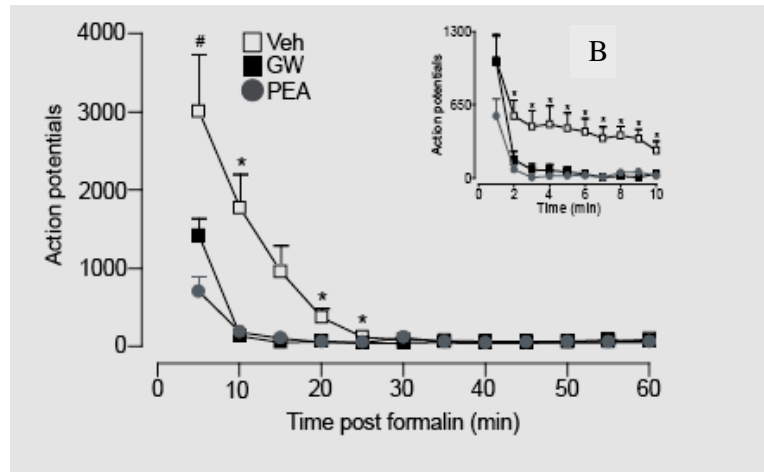
Abbiamo quindi voluto studiare il meccanismo attraverso il quale la PEA esplica il suo effetto analgesico. Il complesso PPAR- $\alpha$  contiene una Hsp90 necessaria a mantenere il braccio libero nella conformazione adatta a legare gli agonisti. Abbiamo voluto verificare se bloccando Hsp90 con la geldanamicina, potevamo modulare l'attività analgesica della PEA. La geldanamicina (1-10  $\mu$ g/zampa) iniettata nella zampa con la formalina, non modificava il comportamento di questa ultima (fig. 27 A). La coosomministrazione di PEA (50  $\mu$ g/zampa) con la dose più

bassa di geldanamicina (1  $\mu\text{g}/\text{zampa}$ ) non modificava sostanzialmente l'effetto analgesico dell'aciletanolamide, laddove dosi crescenti dell'inibitore della Hsp90 (5-10  $\mu\text{g}/\text{zampa}$ ) mostravano un marcato effetto di reversioni (fig. 27 B).



-Figura 27-

Gli effetti antinocicettivi dei PPAR- $\alpha$  agonisti, sebbene dipendenti dal un recettore nucleare, sono troppo rapidi per essere mediati da un espressione genica. Come è possibile vedere dalla figura 28 la PEA (■) ed il GW7647 (●), riducevano il firing neuronale prodotto dalla somministrazione della formalina (□) entro i primi cinque minuti (riquadro B), tempo troppo breve per permettere la regolazione della trascrizione genica (fig. 28)

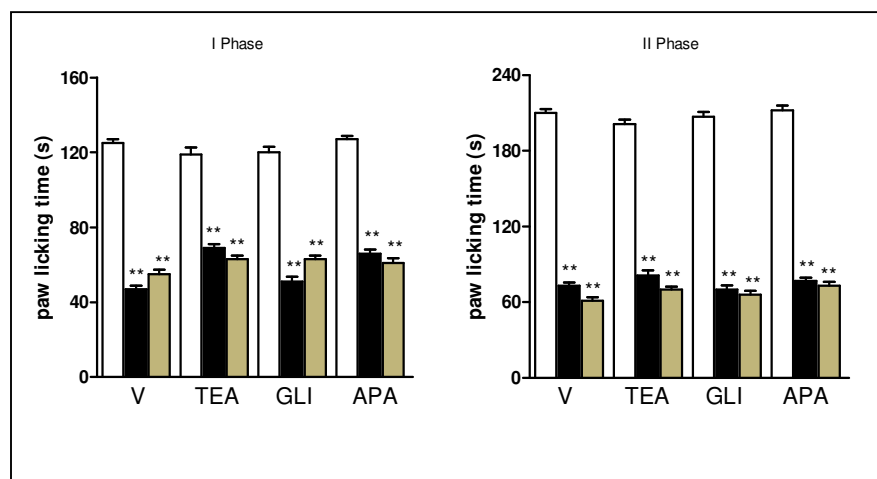


-Figura 28-

Ci siamo chiesti pertanto, se i recettori PPAR- $\alpha$  attivati dalla PEA potessero avere un meccanismo correlato all'analgesia di tipo non genomico come la modulazione dei canali ionici del potassio ( $K^+$ ). Esistono diverse famiglie dei canali del  $K^+$  tra le quali quelli voltaggio-dipendente, quelli ATP sensibili, e quelli  $Ca^{2+}$ -attivati. Il protocollo sperimentale prevedeva la pre-somministrazione dell'inibitore del canale del potassio nella zampa del topo, dopo 10 minuti, nella medesima zampa, si somministrava la formalina, il veicolo (colonna bianca) oppure l'agonista PPAR- $\alpha$  GW7647 (colonna nera) o PEA (colonna grigia). L'analgesia prodotta dal GW e dalla PEA si conservava in entrambe le fasi, quando l'animale veniva pre-trattato con l'inibitore del canale del potassio ATP-dipendente (tetraetilammonio, TEA 10 $\mu$ l/paw), o con

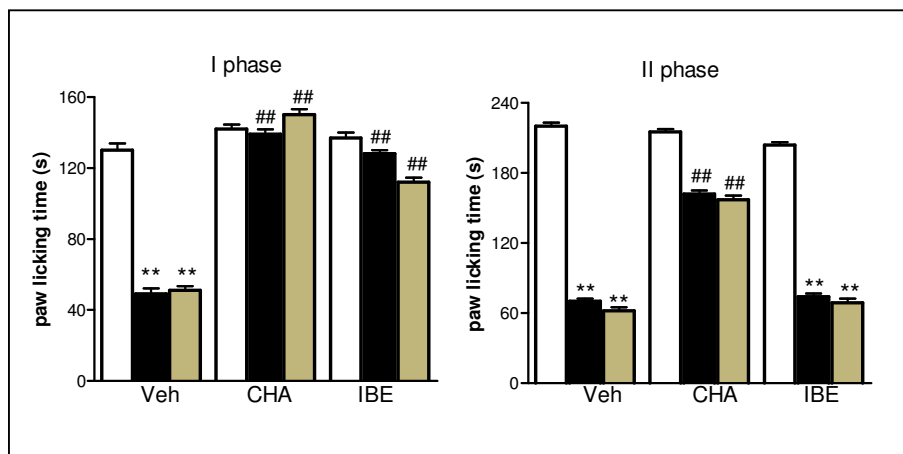
quello voltaggio dipendente (glibencamide, GLI 10 $\mu$ l/paw) o con i canali del potassio Ca<sup>2+</sup>-attivati a bassa conduttanza (SK-Ca<sup>2+</sup> apamina, APA 10 $\mu$ l/paw)

(fig. 29)



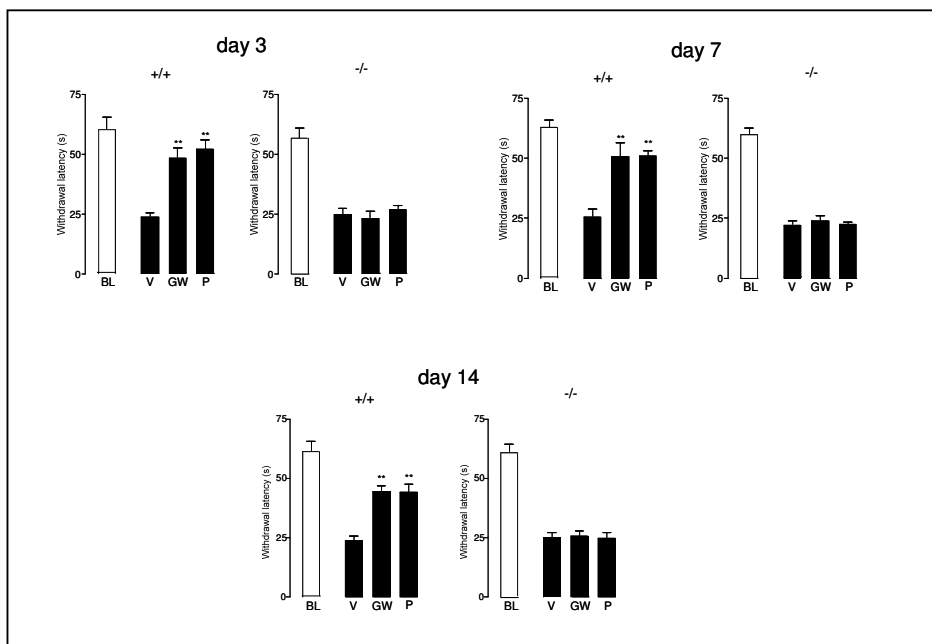
-Figura 29-

Di contro, l'utilizzo degli inibitori del canale del K<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup>-attivati a media (IK-Ca<sup>2+</sup> caribdotossina, CHA 10 $\mu$ l/paw) e ampia conduttanza (BK-Ca<sup>2+</sup> iberiotossina, IBE 10 $\mu$ l/paw), producevano una perdita dell'effetto analgesico degli agonisti PPAR- $\alpha$ . In particolare, la caribdotossina revertiva entrambe le fasi, mentre l'iberiotossina, agiva solo in prima fase lasciando inalterata la seconda (fig. 30).



-Figura 30-

Abbiamo infine voluto, verificare se i PPAR- $\alpha$  siano in grado di attenuare l'iperalgia persistente associata a lesioni nervose, causata dalla legatura del nervo sciatico nel topo. Nei giorni successivi all'intervento chirurgico, i topi di ceppo C57BL6 legati, che hanno ricevuto il solo veicolo (V), mostrano un chiaro stato iperalgesico da stimolazione meccanica rispetto a quello osservato prima della legatura (BL bifore ligation) (fig. 31). Su tale modello comportamentale, abbiamo valutato il GW7647 (GW 30 mg/kg-ip) e la PEA (P 30 mg/kg-ip) somministrati in acuto. Come si osserva dalla figura 31, i due PPAR- $\alpha$  agonisti, aumentano, in modo significativo, il tempo di resistenza alla stimolazione meccanica, al 3° 7° e 14° giorno solo nei topi wild-type (+/+) (fig. 31).

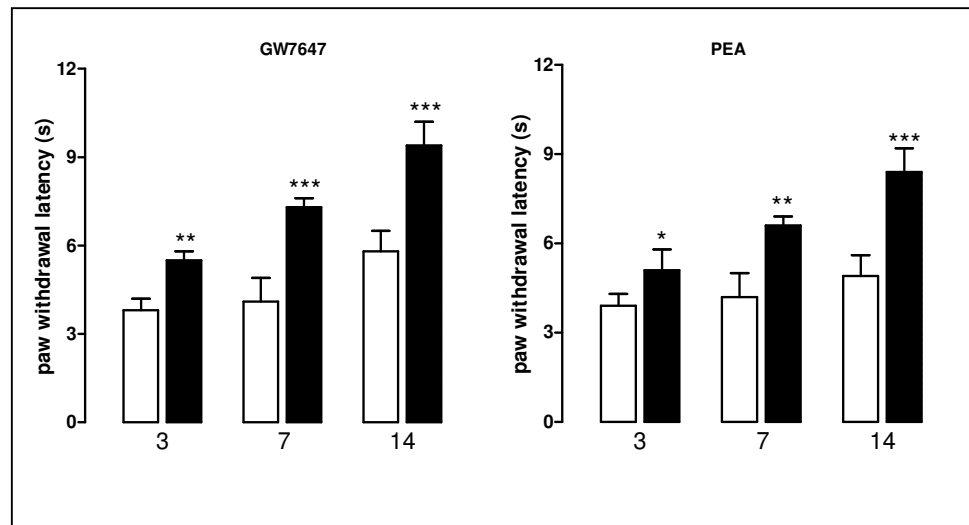


-Figura 31-

La conferma dell'influenza di tale recettore nella modulazione dello stato iperalgesico, è data dal risultato ottenuto con i topi k/o (-/-) nei quali, negli stessi tempi sperimentali (3°, 7°, 14°), non è stata osservata alcuna differenza significativa tra il gruppo veicolo e il gruppo trattato con il PPAR- $\alpha$  agonista (fig. 31).

Gli effetti antiiperalgesici degli agonisti di PPAR- $\alpha$  in questo modello erano paragonabili a quelli evocati dalla gabapentina e non erano accompagnati da variazioni nell'attività motoria (85). Anche nel plantar test, la PEA 30 mg/kg e GW7647 30 mg/kg, somministrati in acuto, aumentavano in modo significativo, il

tempo di latenza alla stimolazione termica, mostrando un chiaro effetto antiiperalgico (fig. 32)



-Figura 32-

Abbiamo, infine sperimentato la capacità degli agonisti del PPAR- $\alpha$  ad alleviare l'iperalgia in un modello di infiammazione cronica. La somministrazione intraplantare (i.pl.) dell'adiuvante completo di Freund (CFA) sviluppa, in modo crescente e tempo-dipendente, uno stato artritico con evidenti segni di sconforto e stati dolorifici. L'utilizzo dei PPAR- $\alpha$  agonisti (GW7647 e PEA, colonna nera), in tale patologia cronica, produceva un aumento significativo della latenza allo



stimolo termico a tutti i tempi sperimentali, cosa che non si verifica con l'utilizzo del solo veicolo (colonna bianca) (fig. 33)

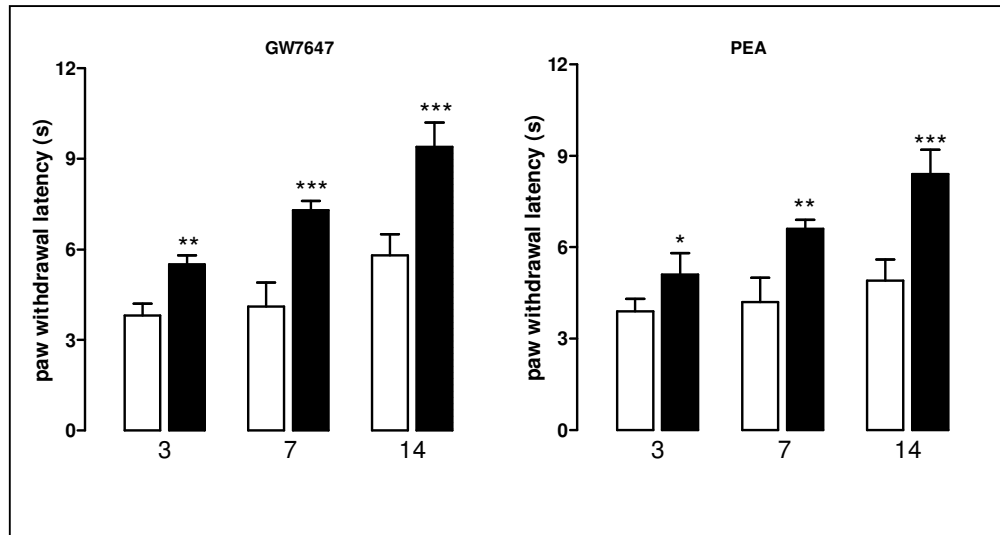


Figura 33

## 10. CONCLUSIONI

I nostri risultati dimostrano l'importanza delle molecole di origine lipidica nel controllo della trasmissione dolorifica.

In particolare, da un lato confermiamo la tesi che sostiene l'importanza del sistema cannabinergico, e dell'anandamide, nei processi analgesici, di come l'attivazione dei recettori CB regoli la percezione del dolore sia esso di tipo acuto che cronico, e come tale regolazione sia mediata in modo particolare dai recettori CB1 e marginalmente da quelli CB2. Dall'altro ipotizziamo una fine regolazione, con un meccanismo della palmitoiletanolamide e dei PPAR- $\alpha$  ancora da chiarire, che vede il coinvolgimento sia dei canali  $K^+$ , per un analgesia immediata, sia la regolazione della trascrizione genica per un meccanismo che regola la produzione di citochine o/e la metabolizzazione di agenti proinfiammatori.

Il dolore neuropatico può essere il risultato di un trauma o di una lesione cronica delle vie somato-sensitive periferiche o centrali; i sintomi sensitivi del dolore possono essere sia focali sia generalizzati. Il trauma o l'irritazione al nervo periferico, può determinare una nevralgia spesso accompagnata da perdita di sensibilità o ipostenia dei muscoli innervati dallo stesso nervo. Frequentemente il

dolore consiste in una sensazione spontanea di bruciore o d'indolenzimento; nonostante un'elevata soglia di percezione sensitiva, i pazienti manifestano una risposta esagerata allo stimolo nocicettivo (*iperalgisia*) o al tatto (*iperestesia*) oppure percepiscono come doloroso uno stimolo non alogeno (*allodinia*). Alcuni studi hanno già suggerito il coinvolgimento dei recettori CB periferici, responsabili della modulazione di stati neuropatici associati all'infiammazione. Infatti, è stato dimostrato che sostanze cannabinomimetiche, riducono l'iperalgisia indotta da carragenina (86) attraverso un meccanismo che coinvolge l'inibizione della degranulazione mastocitaria e la produzione di serotonina e istamina responsabili dello stravasamento plasmatico (87), dell'edema, e della stimolazione delle fibre nocicettive.

Nel nostro studio abbiamo voluto verificare il comportamento di queste sostanze nella neuropatia da legatura del nervo sciatico. Con l'impiego del agonista sintetico WIN55,212-2 e di quello di tipo endogeno, l'AEA, mostriamo come il sistema cannabinergico sia coinvolto nel alleviare stati di dolore associati alla neuropatia periferica, ed inoltre, la reversione di tale attività antiiperalgisica ad opera dell'antagonista recettoriale CB1, rafforza e conferma questa nostra ipotesi.

L'utilizzo poi dell'applicazione topica dell'anandamide incoraggia l'impiego di tali sostanze per due importanti motivi: 1) aumentare la compliance del paziente e 2) la mancata comparsa di effetti secondari a livello del sistema nervoso centrale, sia quelli a breve termine come disorientamento spazio-temporale, ansia generalizzata e somatizzata, disforia, attacchi di panico aumento dell'appetito, sia quelli a lungo termine come, astenia, abulia, instabilità dell'umore, bassa produttività, lentezza nei movimenti, deficit di memoria ed attenzione.

Una strategia alternativa per evitare gli effetti centrali dei cannabinoidi, e ricavarne unicamente il solo effetto analgesico, è quella di inibire la metabolizzazione del AEA permettendo, a quest'ultima, di aumentare la concentrazione endogena e poter in tal modo, attivare per un tempo più lungo i suoi recettori. I nostri risultati confermano che la somministrazione sistemica di un inibitore del reup-take cellulare dell'AEA, l'AM404, riesce a modulare l'iperalgia sia essa di natura meccanica che termica (83).

Le azioni analgesiche dell'AM404 non possono essere attribuite alla sedazione, poiché sono accompagnate da un miglioramento piuttosto che da un danno di attività motoria nel rotarod test e sono associati con una profonda riduzione

dell'espressione di Cox-2 e di iNOS, due proteine che sono coinvolte nella patogenesi dell'infiammazione e del dolore (87, 88).

Nel panorama dei lipidi e di composti che presentano un elevato potenziale terapeutico nelle sintomatologie del dolore neuropatico, particolare interesse riveste la PEA che, come detto in precedenza, esplica una marcata attività analgesica ed antinfiammatoria con un meccanismo ancora da definire (53-55).

I nostri risultati hanno sostanzialmente confermato tale efficacia sia nei test di dolore acuto, come quello sensoriale da formalina, viscerale da MgSO<sub>4</sub>, o infiammatorio da carragenina, che di dolore cronico come quello neuropatico, ma il dato che sembra avere un'importanza maggiore è che la PEA sembra esplicare i suoi effetti attraverso l'attivazione del recettore PPAR- $\alpha$ . Benché la PEA non si leghi al recettore cannabinoide CB<sub>2</sub>, le sue azioni antinocicettive sono antagonizzate dal SR144528, antagonista del CB<sub>2</sub> (32); i nostri esperimenti confermano tali risultati ed inoltre mostrano che l'SR144528 antagonizza anche gli effetti del GW7647 e WY14643 che, come la PEA, non si legano attivamente al CB<sub>2</sub> (85). A rafforzare ulteriormente la nostra ipotesi della correlazione non stretta tra PEA e CB<sub>2</sub>, abbiamo riscontrato che la PEA manteneva le sue proprietà

nocicettive anche nei topi CB2 knock-out (figura 20), ed inoltre l'antagonista CB2 di AM630, chimicamente differente al SR144528, non modifica la risposta alla PEA (89, 90). Probabilmente l'SR144528 esplica tale attività, integrando con un sito diverso da quello del CB2 (84). Tale sito resta non identificato, ma potrebbe essere localizzato a valle del PPAR- $\alpha$  poiché l'SR144528 non si contrappone significativamente all'attivazione in vitro della PEA indotta dal PPAR- $\alpha$ .

Alla luce di questi nuovi risultati ci siamo dedicati ad approfondire il ruolo dei PPARs nella modulazione del dolore. In seguito ad un primo screening, abbiamo dimostrato che l'unico PPARs a possedere un'attività analgesica è il PPAR- $\alpha$  (fig. 22). Questo recettore produce profondi e rapidi effetti in modelli di dolore acuto, infiammazione persistente e dolore neuropatico (60). Questi effetti sono comparabili a quelli di analgesici impiegati in clinica ma non sono associati con sviluppo di tolleranza. I PPAR- $\alpha$  regolano l'infiammazione sistemica inducendo l'espressione di proteine antiinfiammatorie, così come KB- $\alpha$  (I $\kappa$ B- $\alpha$ ), reprimendo l'espressione di agenti proinfiammatori, quali il TNF- $\alpha$ , e limitando il reclutamento di cellule immunitarie ai siti d'infiammazione (91).

Poiché questi meccanismi richiederebbero un periodo di ore o anche di giorni, non possono rappresentare le azioni inibitorie “veloci” del PPAR- $\alpha$  sul comportamento nocifensivo e l’attivazione del neurone, che si manifesta entro pochi minuti dalla somministrazione del farmaco (fig.28).

I nostri esperimenti farmacologici con gli inibitori del canale del  $K^+$  sostengono questa ipotesi e identificano i canali  $Ca^{2+}$ -attivati a media,  $IK-Ca^{2+}$ , e ampia conduttanza,  $BK-Ca^{2+}$ , come componenti a valle del segnale della via non genetica del PPAR- $\alpha$  implicata nella regolazione nocicettiva. Sebbene gli steps molecolari inerenti l’attivazione dei PPAR- $\alpha$  e l’apertura dei canali  $IK-Ca^{2+}$  e  $BK-Ca^{2+}$  restino da definire in modo più dettagliato, i nostri risultati mostrano la possibilità che il PPAR- $\alpha$  possa regolare due aspetti complementari della risposta fisiopatologia ad un “insulto”, da una parte l’inibizione della nocicezione attraverso un meccanismo non-genetico ad insorgenza rapida e dall’altra la riparazione del tessuto, con diminuzione dell’infiammazione attraverso un meccanismo genetico ad inizio lento.

Presi insieme, i nostri risultati mostrano l’alto potenziale terapeutico del sistema cannabinergico nella modulazione della trasmissione nocicettiva, sia con agonisti

diretti ma ancora meglio con l'ausilio di molecole che inibendo il metabolismo dell'AEA, ne aumentano il tono endogeno e limitano gli effetti centrali.

Inoltre abbiamo dimostrato come la PEA, molecola endogena che lega ed attiva i PPAR- $\alpha$ , e gli altri PPAR- $\alpha$  agonisti possono attenuare la percezione del dolore e ridurre stati infiammatori e neuropatici, senza provocare effetti disforici e di possibile abuso.

L'ampia efficacia dimostrata dai due sistemi presi in esame in questo studio, quello cannabinergico e quello PPAR- $\alpha$  mediato, apportano ulteriori conoscenze nella farmacologia delle aciletanolamidi e sottolineano l'importanza per lo sviluppo di nuove molecole come possibili modulatori del dolore.



## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Mechoulam R., in *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, R. Mechoulam (Ed.), CRC Press, Boca Raton, 1 (1986);
2. Evans F.J., The separation of central from peripheral effects on structural basis. *Planta Med.* 57:1, 60-67(1991);
3. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC and Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, (1990) 346:561-564.
4. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, (1993) 365:61-65.
5. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, (1992) 258:1946-1949.
6. Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem*, (1993) 36:3032-3034
7. Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett*, (1995) 375:143-147.
8. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Comm*, (1995) 215:89-97.
9. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, (1995) 50:83-90.
10. Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfiz L, Uhl GR. Discovery of the Presence and Functional Expression of Cannabinoid CB2 Receptors in Brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1074:514-536.
11. Di Marzo V. 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta*, (1998) 1392:153-175.
12. Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, (1994) 372:686-691.
13. Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biphys Res Comm*, (1996) 227:281-288.
14. Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*, (1997) 322:671-677.
15. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, (1997) 388:773-778.
16. Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells. *J Neurochem*, (1999) in press
17. Di Marzo V, Bisogno T, Sugiura T, Melck D, De Petrocellis L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J*, (1998) 331:15-19.
18. Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, (1996) 84:83-87.
19. Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*, (1998) 422:69-73.
20. Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, (1997) 277:1094-1097.
21. Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol

- esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*, (1998) 353:23-31.
22. Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee R, De Petrocellis L. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett*, (1998) 436:449-454.
  23. De Petrocellis L, Melck D, Ueda N, Maurelli S, Kurahashi Y, Yamamoto S, Marino G, Di Marzo V. Novel inhibitors of brain, neuronal and basophilic anandamide aminohydrolase. *Biochem Biophys Res Commun*, (1997) 231:82-88.
  24. Deutsch DG, Lin S, Hill WA, Morse KL, Salehani D, Arreaza G, Omeir RL, Makriyannis A. Fatty acid sulfonyl fluorides inhibit anandamide metabolism and bind to the cannabinoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, (1997) 231:217-221.
  25. Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, Sitachitta N, Gerwick WH, Di Marzo V. Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun*, (1998) 248:515-522.
  26. Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol*, (1998) 359:1-18.
  27. Hansen HS, Lauritzen L, Moesgaard B, Strand AM, Hansen HH. Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acetyethanolamines: proposed role in neurotoxicity. *Biochem Pharmacol*, (1998) 55:719-725.
  28. Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature*, (1997) 390:518-521.
  29. Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J*, (1998) 12:1035-1044.
  30. Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK. Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, (1997) 94:4188-4192.
  31. Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem*, (1997) 272:3315-3323.
  32. Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, (1998) 394:277-281.
  33. Herkenham M. *Cannabinoid Receptors* (Pertwee RG, ed. Academic Press) (1995) 145-166.
  34. De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1998) 95:8375-8380.
  35. Jaggar, S.I., Hasnie, F.S., Sellaturay, S. & Rice, A.S. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 76, 189- 99 (1998).
  36. Calignano, A., La Rana, G. & Piomelli, D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol* 419, 191-8.
  37. Aloe, L., Leon, A. & Levi-Montalcini, R. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions* 39, C145- 7 (1993).
  38. Kuehl, F.A., Jacob, T.A., Ganley, O.H., Onnond, R.E. & Meisinger, M.A.P. The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J Am. Chem. Soc.* 79, 5577 - 5578 (1957).
  39. Bachur, N.R., Masek, K., Mehnon, K.L. & Udenfriend, S. Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem* 240, 1019-1024 (1965).
  40. Di Marzo V., De Petrocellis L. The endogenous cannabinoid signalling system: chemistry, biochemistry and physiology, *Internet Journal of Science* 1997.
  41. Puffenbarger RA. Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005 Dec;4(6):625-31
  42. Franklin, A., Parmentier-Batteur, S., Walter, L., Greenberg, D.A., Stella, N., 2003. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *Journal of Neuroscience* 23 (21), 7767-7775.
  43. Sheerin, A.H., Zhang, X., Saucier, D.M., Corcoran, M.E., 2004. Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia* 45 (10), 1184-1188.
  44. Skaper, S.D., Buriani, A., Dal Toso, R., Petrelli, L., Romanello, S., Facci, L., Leon, A., 1996. The aliamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93 (9), 3984–3989.
45. Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Pomelli D. (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* ;414(6860):209-12.
  46. Capasso, R., Izzo, A.A., Fezza, F., Pinto, A., Capasso, F., Mascolo, N., Di Marzo, V., 2001. Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *British Journal of Pharmacology* 134 (5), 945–950.
  47. De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ligresti, A., Bifulco, M., Melck, D., Di Marzo, V., 2002. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 16 (4), 297–302.
  48. Di Marzo, V., Melck, D., Orlando, P., Bisogno, T., Zagoory, O., Bifulco, M., Vogel, Z., De Petrocellis, L., 2001. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochemical Journal* 358 (Pt. 1), 249–255.
  49. Bouchard, J.F., Lepicier, P., Lamontagne, D., 2003. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sciences* 72 (16), 1859–1870.
  50. Mazzari, S., Canella, R., Petrelli, L., Marcolongo, G., Leon, A., 1996. N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *European Journal of Pharmacology* 300 (3), 227–236.
  51. Berdyshev, E., Boichot, E., Corbel, M., Germain, N., Lagente, V., 1998. Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS induced pulmonary inflammation in mice. *Life Sciences* 63 (8), L125–L129.
  52. Ross, R.A., Brockie, H.C., Pertwee, R.G., 2000. Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *European Journal of Pharmacology* 401 (2), 121–130.
  53. Costa, B., Conti, S., Giagnoni, G., Colleoni, M., 2002. Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *British Journal of Pharmacology* 137 (4), 413–420.
  54. Conti, S., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., Giagnoni, G., 2002. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *British Journal of Pharmacology* 135 (1), 181–187.
  55. LoVerme, J.L., Fu, J., Astarita, G., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Piomelli, D., 2005. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Molecular Pharmacology* 67 (1), 15–19.
  56. Cadas, H., di Tomaso, E., Piomelli, D., 1997. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, Narachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *Journal of Neuroscience* 17 (4), 1226–1242.
  57. Losel, R.M. et al. Nongenomic steroid action: controversie s, questions, and answers. *Physiol Rev* 83, 965-10 16 (2003).
  58. Isseman I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990; **347**(6294):645-650.
  59. Youssef J, Badr M. Peroxisome proliferator-activated receptors: from orphanage to fame in a decade. *Saudi Pharm J*. 2002; **9**:1-13.
  60. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999; **20**(5):649-688.
  61. Willson T, Brown P, Sternbach D, Henke B. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*. 2000; **43**(4):527-550.
  62. Su JL, Simmons C, Wisely B, Ellis B, Winegar D. Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific Mabs. *Hybridoma*. 1998; **17**(1):47-53.
  63. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*. 1998; **1**(3):465-470.
  64. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol*. 1999; **10**(6):564-570.

65. Cullingford T, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin C, Patel R, Clark J. Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem.* 1998; **70**(4):1366-1375.
66. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 2001; **169**(3):453-459.
67. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature.* 1997; **387**(6633):620-624.
68. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* 2000; **49**(10):497-505.
69. Devchand P, Keller H, Peters J, Vazquez M, Gonzalez F, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 1996; **384**(6604):39-43.
70. Von Schacky C, Kiefl R, Marcus A, Broekman M, Kaminski W. Dietary n-3 fatty acids accelerate catabolism of leukotriene B4 in human granulocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1993; **1166**(1):20-24.
71. Couve A, Koenig C, Santos M. Induction of peroxisomal enzyme and a 64-Kda peptide in cultured mouse macrophages treated with clofibrate. *ExpCell Res.* 1992; **202**(2):541-544.
72. Poynter M, Daynes R. Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998; **67**(7):3488-3493.
73. Cunard R, Di Campli D, Archer DC, Stevenson JL, Ricote M, Glass CK, Kelly CJ. (2002). WY14,643, a PPAR alpha ligand, has profound effects on immune responses in vivo. *J Immunol.* 169(12):6806-12.
74. Delerive P, Gervois P, Fruchart JC, Staels B (2000). Induction of Ikappa B alpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators. *J Biol Chem.* ;275(47):36703-7.
75. Rosland, J.H., Tjelsen, A., Mrehle, B. & Hole, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain* 42, 235-42 (1990).
76. Coderre, T.J. & Melzack, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 12, 3665-70 (1992).
77. Sheu, M. et al. Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J Invest Dermatol.*, 94-101. (2002).
78. Gyires K, Torma Z. (1984). The use of the writhing test in mice for screening different types of analgesics. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*; 267(1):131-40.
79. Inmaculada Posadas, Mariarosaria Bucci, Fiorentina Roviezzo, Antonietta Rossi, Luca Parente, Lidia Sautebin Giuseppe Cirino. (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacol* 142, 331-338.
80. Bennett GJ and Xie Yk (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33**:87-107
81. Cook CD, Nickerson MD. (2005). Nociceptive sensitivity and opioid antinociception and antihyperalgesia in Freund's adjuvant-induced arthritic male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther.* Apr;313(1):449-59.
82. La Rana G, Russo R, Campolongo P, Bortolato M, Mangieri RA, Cuomo V, Iacono A, Raso GM, Meli R, Piomelli D, Calignano A. (2006) Modulation of neuropathic and inflammatory pain by the endocannabinoid transport inhibitor AM404 [N-(4-hydroxyphenyl)-eicosa-5,8,11,14-tetraenamide]. *J Pharmacol Exp Ther.* 317(3):1365-71.
83. Brown, P.J. et al. Identification of a subtype selective human PPAR alpha agonist through parallel-array synthesis. *Bioorg Med Chem Lett* 12, 1225-7 (2001).
84. Lo Verme J, Russo R., La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D. Rapid Broad-Spectrum Analgesia through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 319(3):1051-61.
85. De Vry J, Denzer D, Reissmueller E, Eijckenboom M, Heil M, Meier, Mauler F. 3-[2-cyano-3-(trifluoromethyl)phenoxy]phenyl-4,4,4-trifluoro-1-butan-1-ylsulfonate (BAY 59-3074): a novel cannabinoid Cb1/Cb2 receptor partial agonist with antihyperalgesic and antiallodynic effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 310(2):620-32.
86. Levy D, Hoke A, Zochodne DW (1999). Local expression of inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci Lett.* 260: 207-209.

87. De Alba J, Clayton NM, Collins SD, Colthup P, Chessell I, Knowles RG (2005). GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, in the press.
88. Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F and Makriyannis A(2001) CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93:239-245.
89. Ibrahim MM, Deng H, Zvonok A, Cockayne DA, Knawn J, Matha HP, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Makriyannis A and Malan TP,Jr. (2003) Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241 inhibits experimental neuropathic pain : pain inhibition by receptors not present in the CNS.*Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10529-10533
90. Quarthilho A,Mata HP,Ibrahim MM,Vanderah TW,Porreca F,Markiyannis A and Malan TP,Jr (2003). Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99:955-960.
91. Kostadinova R, Wahli W, Michalik L. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem.* (2005); 12(25):2995-3009.