

Università della Calabria

---

Dottorato di Ricerca

in

“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare”-XIX ciclo

SSD prevalente BIO/14-Farmacologia

**Caratterizzazione fisiopatologica e farmacologica di un  
modello sperimentale di dolore neuropatico da legatura del  
nervo spinale L5 nel topo**

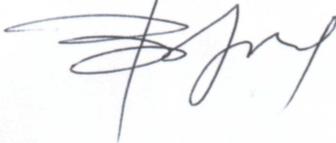
Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta



Relatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta



Candidata

Dott.ssa Alessandra Levato



---

Anno Accademico 2007-2008

Verbale n° 32

In data 21 Ottobre, 2008, alle ore 9.00, nei locali della Facoltà di Farmacia dell'Università di Catanzaro "Magna Graecia", si è riunito il Collegio dei Docenti del Dottorato di Ricerca in "Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare" per discutere e deliberare sul seguente ordine del giorno:

- 1) Approvazione relazione attività anno 2008 e passaggio anni successivi Dottorandi di ricerca afferenti al XXI, XXII e XXIII ciclo (art. 46, comma I Regolamento Dottorato);
- 2) Valutazione e giudizio finale Dottorandi XIX e XX ciclo;
- 3) Proposta Commissione esame finale XIX e XX ciclo;
- 4) Varie ed eventuali.

Sono presenti il Coordinatore, Prof. G. Bagetta, i Proff. M.T. Corasaniti, P.L. Nicotera, D. Rotiroti, e per consultazione telematica, ai sensi del Regolamento didattico, i Proff. D. Borgese, G. Genchi, N. Mercuri, L.A. Morrone e R.G. Nisticò, i Dott.ri D. Amantea, L. Berliocchi, M.C. Caroleo, R. Curcio, G. Lauria, C. Nucci, L. Rombolà, R. Russo.

Risulta assente giustificata la Dott.ssa E. Cione.

Sono assenti i Proff. E. Clementi, G. Melino, V. Mollace.



Svolge le funzioni di Presidente il Prof. G. Bagetta e di Segretario il Prof. D. Rotiroti.

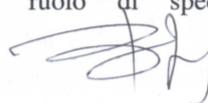
## OMISSIS

### 2) Valutazione e giudizio finale dottorandi XIX ciclo

Valutazione finale della candidata **Dott.ssa Alessandra Levato**

Tesi: **Caratterizzazione fisiopatologica e farmacologica di un modello sperimentale di dolore neuropatico da legatura del nervo spinale L5 nel topo**

Il Collegio dei Docenti ha esaminato il percorso formativo e di ricerca condotto dalla candidata, che risulta essere stato indirizzato verso tematiche di grande attualità della ricerca di base nel campo delle neuroscienze. In particolare, l'attività della candidata è stata inizialmente orientata allo studio della letteratura corrente circa la fisiopatologia e le basi farmacologiche della terapia del dolore neuropatico. Successivamente, la candidata ha dedicato la sua attività all'apprendimento, anche mediante uno stage presso il Department of Biology dell'University College of London, delle tecniche comportamentali per la riproduzione in laboratorio di modelli sperimentali di dolore neuropatico. Successivamente, identificato il modello murino da legatura del quinto nervo lombare (L5) la candidata ha orientato il suo interesse 1) alla caratterizzazione del ruolo di specifiche famiglie di canali ionici overespressi dalla membrana citoplasmatica del neurone dei gangli delle radici dorsali e, 2) successivamente, allo caratterizzazione del ruolo di specifici mediatori



dell'infiammazione e della sopravvivenza neuronale a livello del midollo spinale. In una terza fase, la candidata ha esteso il suo interesse alla definizione dell'attività antinocicettiva di prodotti di origine naturale e di loro principi attivi nel modello di dolore neuropatico sopra descritto, mai impiegato prima per lo studio di tali prodotti. Lo studio è stato svolto impiegando un approccio multidisciplinare per quanto attiene alle tecniche sperimentali impiegate. In particolare, l'accurato impiego di tecniche comportamentali, biochimiche e di biologia cellulare ha consentito alla candidata di apportare un contributo significativo alla comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base del dolore neuropatico indotto dalla legatura di L5 nel topo ed ha aperto un nuovo filone di studio per la caratterizzazione di fitocomplessi e farmaci per il suo trattamento. Benchè in parte anche di natura negativa, i risultati ottenuti risultano interessanti e vengono presentati in maniera pienamente soddisfacente sotto il profilo della loro consequenzialità razionale e temporale e risultano essere criticamente discussi dalla candidata alla luce della più aggiornata letteratura scientifica.

Il Collegio dei Docenti valuta, nel complesso, positivamente il lavoro svolto dalla candidata che, durante i quattro anni di corso, ha partecipato attivamente alle iniziative didattiche organizzate sotto forma di workshop e seminari.

Pertanto, il Collegio dei Docenti ritiene la candidata idonea a sostenere l'esame finale di Dottorato.



OMISSIS



Alle ore 19.00 la seduta è tolta.

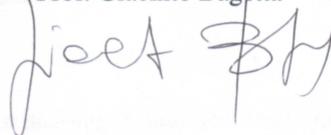
Letto, approvato e sottoscritto

Il Segretario

Il Presidente

Prof. Domenicantonio Rotiroti

Prof. Giacinto Bagetta



## INDICE

<b>SOMMARIO.....</b>	<b>i-ii</b>
<b>1.INTRODUZIONE.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Il dolore neuropatico.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Generalità.....	1
1.1.2 La fisiopatologia del dolore neuropatico.....	4
<b>1.2 I canali del sodio ed il dolore.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3 Il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) ed il dolore.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 La protein chinasi B (Akt) ed il dolore.....</b>	<b>13</b>
<b>1.5 I modelli sperimentali di dolore.....</b>	<b>15</b>
1.5.1 I modelli sperimentali di dolore infiammatorio.....	15
1.5.2 I modelli sperimentali di dolore neuropatico.....	17
1.5.3 Il modello di dolore neuropatico della legatura del nervo spinale L5 (SNL).....	18
<b>1.6 I tests comportamentali per lo studio della risposta dolorifica.....</b>	<b>20</b>
<b>1.7 Approccio fitoterapico al controllo del dolore.....</b>	<b>21</b>
1.7.1 Gli olii essenziali ed il dolore.....	21
1.7.2 L'olio essenziale (OE) di bergamotto.....	22
1.7.2.1 Il bergamotto.....	22
1.7.2.2 L'olio essenziale (OE) di bergamotto.....	23

1.7.3 Il linalolo.....	26
1.7.3.1 Generalità.....	26
1.7.3.2 Profilo farmacologico del linalolo.....	26
<b>1.8 Scopo della tesi.....</b>	<b>28</b>
<b>2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Animali.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Procedura chirurgica per la legatura del nervo spinale L5.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Topi <i>knock-out</i> del tipo nocicettore-specifico, globale e NFH-Cre per i geni di interesse.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Tests comportamentali.....</b>	<b>35</b>
2.4.1 Test di Von Frey.....	35
2.4.2 Test di Haregreaves'.....	36
2.4.3 Test di Rotarod.....	36
<b>2.5 Formalin test.....</b>	<b>37</b>
<b>2.6 Studio <i>ex-vivo</i>: isolamento e prelievo della porzione lombare di midollo spinale.....</b>	<b>38</b>
<b>2.7 Western blotting.....</b>	<b>38</b>
<b>2.8 Trattamenti farmacologici.....</b>	<b>40</b>

<b>2.9 Analisi statistica.....</b>	<b>41</b>
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 La legatura del nervo spinale L5 induce allodinia meccanica, ma non determina variazioni della sensibilità termica nel topo.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 L'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 si sviluppa normalmente in topi con delezione del gene che codifica per il canale Nav1.3.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3 La legatura del nervo spinale L5 induce allodinia anche in topi <i>knock-out</i> per i canali Nav1.7 e Nav1.8.....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 L'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 si sviluppa normalmente anche in topi con delezione tessuto-specifica del gene che codifica per il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF).....</b>	<b>50</b>
<b>3.5 La legatura del nervo spinale L5 non determina variazioni dei livelli di Akt 1, 3 e 7 giorni dopo la lesione.....</b>	<b>52</b>
<b>3.6 Effetto della somministrazione subcronica di olio essenziale (OE) di bergamotto sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo.....</b>	<b>56</b>
<b>3.7 Il pretrattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto determina una riduzione del comportamento dolorifico indotto dalla formalina.....</b>	<b>59</b>
<b>3.8 La somministrazione subcronica, ma non acuta, di (-)-linalolo attenua l'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo.....</b>	<b>63</b>
<b>3.9 Il trattamento subcronico con (-)- linalolo non determina variazioni dei livelli di Akt 1, 3 e 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5.....</b>	<b>65</b>
<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>70</b>

<b>Conclusioni.....</b>	<b>80</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>82</b>
<b>PRODUZIONE SCIENTIFICA.....</b>	<b>109</b>

## SOMMARIO

Il dolore neuropatico determina una drastica riduzione della qualità della vita dei pazienti che ne sono colpiti e, purtroppo, i trattamenti farmacologici attualmente utilizzati sono spesso poco efficaci. Pertanto, al fine di imparare a riprodurre diversi modelli animali di dolore, ma soprattutto il modello di dolore neuropatico da legatura del nervo spinale L5 (SNL) ed i tests comportamentali per lo studio della risposta dolorifica è stato necessario svolgere un periodo di esperienza formativa all'estero presso un gruppo di Ricerca esperto nel settore. Utilizzando il modello SNL è stato studiato, con approccio comportamentale, il coinvolgimento di diversi sottotipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti (Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8) e del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) nello sviluppo dei fenomeni di ipersensibilità che accompagnano il dolore neuropatico in topi sottoposti a delezione genica sia globale che nocicettore-specifica del gene di interesse. Gli studi comportamentali hanno mostrato che l'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 si sviluppa normalmente sia in topi *knock-out* per i canali Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8 che per il fattore neurotrofico BDNF. Nonostante i risultati ottenuti siano negativi hanno permesso non solo di chiarire che i canali Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8 ed il BDNF rilasciato dai neuroni sensitivi non sono necessari per lo sviluppo del dolore neuropatico indotto da SNL, ma che il modello sperimentale utilizzato rappresenta un valido strumento per lo studio del dolore neuropatico. Infatti, dal momento che la legatura del nervo spinale L5 induce una severa allodinia meccanica che persiste almeno fino a 30 giorni ed è facilmente determinabile in maniera quantitativa, permette sia di studiare i meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo del dolore neuropatico che di valutare il profilo analgesico di nuovi potenziali agenti farmacologici per il suo trattamento. In seguito alla messa a punto del modello SNL nelle nuove condizioni sperimentali, è stato effettuato lo studio del profilo farmacologico di sostanze di origine naturale ed in particolare dell'olio essenziale (OE) di bergamotto. Sebbene il trattamento subcronico con il fitocomplesso non abbia determinato una riduzione significativa dell'allodinia meccanica indotta da SNL, è stata riscontrata una tendenza alla riduzione 7 giorni dopo SNL suggerendo che il fitocomplesso possa interferire con i meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico.

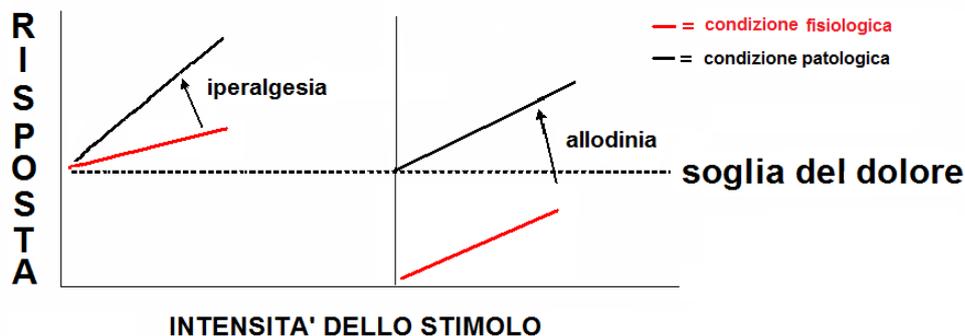
Successivamente, è stato caratterizzato anche il profilo farmacologico del linalolo, uno dei componenti presenti in maggiore quantità (6-18%) nella frazione volatile dell'OE di bergamotto. I risultati ottenuti hanno mostrato che il trattamento subcronico, ma non acuto, con il monoterpene determina una riduzione statisticamente significativa dell'allodinia meccanica indotta da SNL a 7 giorni, stesso tempo in cui era stata riscontrata una tendenza alla riduzione dopo trattamento subcronico con OE di bergamotto. Inoltre, al fine di studiare il coinvolgimento della serina/treonina protein chinasi B o Akt nello sviluppo del dolore neuropatico e nei meccanismi responsabili dell'azione analgesica del linalolo sono stati studiati i livelli di espressione di pAkt e Akt totale a livello del tratto lombare del midollo spinale 1, 3 e 7 giorni dopo SNL, mediante la metodica del western blotting. I risultati ottenuti hanno mostrato che i livelli di Akt non subiscono variazioni significative ai tempi studiati in seguito a legatura del nervo spinale L5 nel topo, né in assenza di trattamenti farmacologici né dopo trattamento subcronico con linalolo. Pertanto, è possibile escludere il coinvolgimento di tale chinasi nello sviluppo del dolore neuropatico indotto da SNL e nel meccanismo responsabile dell'azione antinocicettiva del linalolo. Tuttavia i meccanismi alla base dell'azione antiallodinica del linalolo rimangono da chiarire e necessitano di ulteriori studi.

# 1 INTRODUZIONE

## 1. 1 Il dolore neuropatico

### 1.1.1 Generalità

Il dolore neuropatico è un tipo di dolore cronico associato tipicamente ad un danno a carico dei nervi o comunque del sistema nervoso, periferico o centrale. Si distingue pertanto dal dolore cronico di tipo infiammatorio che origina a partire da un evento flogistico che può derivare, per esempio, da un danno tissutale. Tuttavia tale distinzione non è così netta in quanto anche nel dolore neuropatico è spesso presente una importante componente infiammatoria (see Myers *et al.*, 2006). La causa scatenante il dolore neuropatico può essere di origine traumatica oppure può essere associata a patologie dismetaboliche, quale per esempio il diabete (Veves *et al.*, 2008), a tumori (see Allen, 1998) oppure a patologie immunoinfettive (vedi per esempio, la sindrome da immunodeficienza acquisita, HIV) soprattutto in fase terminale (Hewitt *et al.*, 1997; Luciano *et al.*, 2003). Il dolore neuropatico è una condizione patologica invalidante che determina uno scadimento della qualità della vita (Andersen & Worm-Pedersen, 1989; Becker *et al.*, 1997). Esso infatti è caratterizzato dalla presenza di allodinia ed iperalgesia che rendono difficoltosi attività semplici della vita quotidiana (un gentile tocco o anche il solo contatto con i vestiti può indurre dolore rendendo impossibile lo svolgimento delle normali azioni quotidiane). L'allodinia consiste nella risposta dolorifica in seguito all'applicazione di uno stimolo che in condizioni fisiologiche non dovrebbe essere interpretato come doloroso in quanto sottoliminare (fig. 1.1). L'iperalgesia consiste, invece, in una risposta esagerata ad uno stimolo che comunque indurrebbe dolore cioè sovraliminare (fig. 1.1).



**Fig. 1.1. Rappresentazione schematica dei concetti di iperalgesia e allodinia.**

Inoltre esso colpisce circa il 2-3 % della popolazione mondiale (Campbell & Meyer, 2006) e dallo 0.6 all'1.5% della popolazione USA (Warfield & Fausett, 2002; Schmader, 2002). Tale invalidante condizione patologica ha quindi un enorme impatto sia clinico che socio-economico. Il primo studio sul dolore neuropatico è stato compiuto da Mitchell (1872) prendendo spunto dagli individui che avevano subito danno ai nervi durante la Guerra Civile Americana. Nei primi anni '60, Melzack & Wall (1965) proposero la “*gate control theory*”, suggerendo l'esistenza di un sorta di cancello, a livello del Sistema Nervoso Centrale, in grado di aprirsi e chiudersi per lasciare passare o bloccare i messaggi dolorifici dalla periferia al cervello. A partire dall'ipotesi dell'esistenza di tale sistema di regolazione della trasmissione nocicettiva a livello spinale, ma soprattutto con la comparsa dei primi modelli animali di dolore neuropatico (Bennett & Xie, 1988; Seltzer *et al.*, 1990 ; Kim & Chung, 1992) lo studio del dolore ed, in particolare, di quello neuropatico, ha rappresentato un'area di intensa ricerca. Tra i diversi tipi di dolore cronico, il dolore neuropatico resta sicuramente il più difficile da trattare. Infatti, gli approcci farmacologici classicamente utilizzati per il trattamento del dolore, quali farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e oppioidi, risultano spesso poco efficaci (Koltzenburg, 1998; Sindrup, 1999; Woolf & Mannion, 1999; DelleMijn, 1999). Dalla consapevolezza di tali problematiche e, soprattutto, dalla carenza di trattamenti farmacologici efficaci su tutta la popolazione sofferente, nasce la necessità di sviluppare nuove strategie terapeutiche in grado di alleviare il dolore neuropatico. La mancanza di agenti farmacologici validi è ascrivibile, almeno in parte, alla scarsa

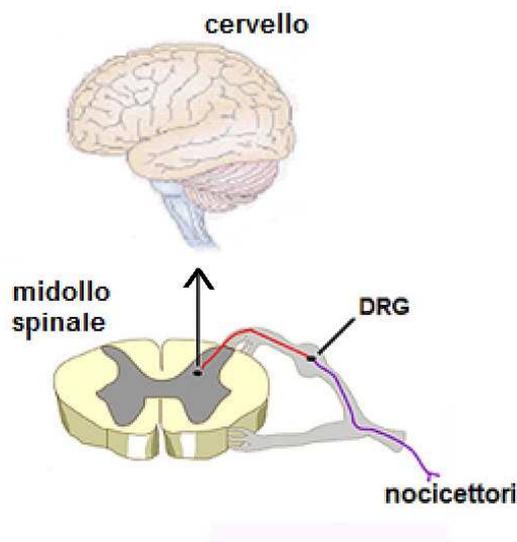
comprensione dei meccanismi alla base dello sviluppo del dolore neuropatico. Pertanto, la maggiore conoscenza dei meccanismi che sottendono ai fenomeni di sensibilizzazione potrebbe permettere di individuare nuovi target farmacologici per la progettazione di farmaci maggiormente efficaci e con minori effetti collaterali. Recentemente, farmaci antiepilettici (gabapentin o carbamazepina) ed antidepressivi (amitriptilina, desimipramina) rappresentano un'ulteriore opportunità terapeutica (see Gordon & Love, 2004) per il dolore neuropatico resistente al trattamento con analgesici ed oppioidi. Tuttavia, anche tali farmaci risultano spesso inefficaci e possiedono un valore di N.N.T. (numero necessario da trattare) >2.5 cioè determinano una riduzione di almeno il 50% del dolore nel 40 % di pazienti trattati. Diverse evidenze sperimentali chiariscono, almeno in parte, i meccanismi alla base della ridotta efficacia degli oppioidi nel trattamento del dolore neuropatico. Per esempio, in seguito a danno ai nervi periferici è stata riportata la *down-regulation* dei recettori oppioidi (Ji *et al.*, 1995; Zhang *et al.* 1998), l'aumentata espressione del peptide colecistochinina (CCK) che antagonizza l'azione degli oppioidi e la *up-regulation* del suo recettore CCK-B nei neuroni dei gangli delle radici dorsali (DRGs) (Hokfelt *et al.*, 1994). Tuttavia, spesso sono poco noti i meccanismi alla base dell'azione analgesica dei farmaci utilizzati in terapia, anche di nuova introduzione. Per esempio, non si conosce il meccanismo responsabile dell'azione analgesica degli antidepressivi triciclici (TCAD) che rappresentano farmaci di prima scelta per il trattamento del dolore neuropatico. Tuttavia esso sembra essere indipendente dall'azione antidepressiva, in quanto la comparsa di analgesia è spesso più rapida (3-7 giorni) della comparsa dell'azione antidepressiva (14-21 giorni) (Mc Quay *et al.*, 1996). Per quanto riguarda il gabapentin, pur essendo strutturalmente correlato con il neurotrasmettitore a carattere inibitorio GABA non viene convertito metabolicamente in GABA o in un suo agonista e, pertanto, agisce con un meccanismo del tutto indipendente da tale neurotrasmettitore. Il gabapentin è stato oggetto di numerosi studi che ne hanno caratterizzato le proprietà farmacologiche e ne hanno dimostrato l'efficacia nell'alleviare il dolore neuropatico (Rosner *et al.*, 1996; Mellick & Mellick, 1997; Rosenberg *et al.*, 1997; Rowbotham *et al.*, 1998, Taylor *et al.*, 1998; Laird & Gidal, 2000) anche in condizioni patologiche quali le neuropatie diabetiche e la neuralgia postherpetica (Segal & Rordorf, 1996; Backonja *et al.*, 1998), Inoltre, sebbene il meccanismo alla base della sua azione

analgesica rimanga ancora da chiarire, studi *in vitro* hanno dimostrato che il gabapentin lega con alta affinità la subunità alfa2delta1 (Gee *et al.*, 1996), ma non le subunità alfa2delta2 e alfa2delta3 (Marais *et al.*, 2001), dei canali del calcio voltaggio-dipendenti. L'interazione del gabapentin con la subunità accessoria alfa2delta1 sembra essere la base molecolare per spiegarne gli effetti antiallodinici (Luo *et al.*, 2001, 2002). Inoltre, è stato suggerito che essa possa determinare una riduzione dell'influsso di calcio a livello dei terminali nervosi presinaptici e, quindi, una riduzione del rilascio di amminoacidi eccitatori (Gee *et al.*, 1996, Marais *et al.*, 2001; Maneuf *et al.*, 2001). A supporto di tale ipotesi, composti sintetizzati sul modello del gabapentin mostrano una potenza antinocicettiva che correla con la loro affinità di legame e la stereospecificità per la subunità alfa2delta (Suman-Chauhan *et al.*, 1993; Dissanayake *et al.*, 1997; Hwang & Yaksh, 1997). Diverse evidenze sperimentali suggeriscono, inoltre, che la subunità alfa2delta1 sia coinvolta nei meccanismi alla base del dolore neuropatico (Luo *et al.*, 2001; Newton *et al.*, 2001; Cole *et al.*, 2005). Tuttavia, ancora è necessario investigare meglio il ruolo di diversi sistemi neurotrasmettitoriali e mediatori per poter sviluppare nuove strategie farmacologiche per il trattamento del dolore neuropatico. Per esempio, un recente studio condotto da Knabl e collaboratori (2008) ha riportato che l'L-838,417, un ligando del sito delle benzodiazepine privo di azione sedativa ( $\alpha 1$  sparing) esplica un'azione antinocicettiva nel dolore neuropatico indotto dal danno da costrizione cronica (CCI) nel ratto suggerendo il possibile uso di ligandi del sito delle benzodiazepine ad azione non sedativa per il trattamento del dolore neuropatico.

### **1.1.2 La fisiopatologia del dolore neuropatico**

L'elaborazione del messaggio dolorifico prevede quattro fasi: la conversione dello stimolo dolorifico in segnale elettrico a livello del terminale periferico (trasduzione), il passaggio del segnale dalla periferia alla corteccia passando attraverso le corna dorsali del midollo spinale (trasmissione), l'inibizione del segnale da parte del sistema nervoso (modulazione) e l'interpretazione dello stimolo a livello corticale (percezione). La via dolorifica coinvolge

numerose strutture sia a livello periferico che centrale (fig. 1.2), tuttavia gli elementi chiave sono: i nocicettori presenti a livello del terminale periferico del primo neurone della via che vengono attivati dallo stimolo dolorifico; i gangli delle radici dorsali (DRGs) che contengono i corpi cellulari del primo neurone; le corna dorsali del midollo spinale in cui si forma la prima sinapsi e che rappresentano il centro di integrazione dei segnali afferenti ed efferenti; la via ascendente e quella discendente che mediano la comunicazione tra il cervello ed il midollo spinale; i centri encefalici superiori (talamo, grigio periacqueduttale o PAG, corteccia, ecc.) che integrano il messaggio. I segnali provenienti dalla corteccia, dal talamo e dal PAG convergono a livello della medulla rostroventromediale (RVM) che invia sia messaggi a carattere inibitorio che eccitatorio a livello delle corna dorsali determinando la modulazione dell'eccitabilità del midollo spinale (see Vanegas & Schaible, 2004). In particolare, il PAG esercita un ruolo determinante nella modulazione inibitoria del dolore che è stato documentato per la prima volta da Reynolds e collaboratori (1969) mediante la dimostrazione che la stimolazione elettrica focale nel PAG di ratto possa permettere la chirurgia addominale in assenza di anestesia generale.



**Fig. 1.2. Principali strutture coinvolte nell'elaborazione del messaggio dolorifico.**

I meccanismi neurochimici e fisiopatologici che sottendono allo sviluppo del dolore neuropatico sono complessi e coinvolgono un ampio range di mediatori che possono sensibilizzare direttamente i terminali afferenti primari o agire a diversi livelli della via dolorifica. Tra i mediatori (see Julius & Basbaum, 2001) le prostaglandine (Nathan, 1987), le specie reattive all'ossigeno (ROS) (Faurischou & Borregaard, 2003), il nitrossido, l'istamina, i leucotrieni, le proteasi e diverse citochine (Metcalf *et al.*, 1997; Galli *et al.*, 2005) come il fattore di necrosi tumorale (TNF) (Sommer *et al.*, 1998), l'interleuchina-1 $\beta$  e l'interleuchina-6 (Sommer & Kress, 2004) possono essere liberate, per esempio, in seguito all'attivazione di cellule del sistema immune. Infatti, il danno ai nervi induce una cascata di eventi neuroinfiammatori che sembra prendere inizio dalla degranolazione dei mastociti (Olsson, 1968; Olsson, 1967; Zuo *et al.*, 2003) residenti nel nervo periferico ma coinvolge anche altre cellule quali i linfociti T, le cellule *natural killer* (Cui *et al.*, 2000), i macrofagi (Liu *et al.*, 2000b), i neutrofili (Perry *et al.*, 1987; Clatworthy *et al.*, 1995; Perkins & Tracey, 2000). Inoltre, mediatori quali l'ATP, la bradichinina, la sostanza P (Nichols *et al.*, 1999) e le prostaglandine (Hosli & Hosli, 1993; Watkins *et al.*, 2001) possono attivare la glia che allo stato attivato può rilasciare altri mediatori come le citochine proinfiammatorie (Piehl & Lidman, 2001) innescando un processo che si autoalimenta (see Moalem & Tracey, 2006). Numerosi studi documentano il coinvolgimento delle cellule gliali (Watkins *et al.*, 2001; McMahon *et al.*, 2005; Tsuda *et al.*, 2005) sia nell'induzione che nel mantenimento del dolore neuropatico (Garrison *et al.*, 1991; Colburn *et al.*, 1999; Stuesse *et al.*, 2001; Raghavendra *et al.*, 2003; Tanga *et al.*, 2004). Recenti evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo chiave per la fractalkina (Milligan *et al.*, 2004) ed il recettore del tipo *Toll-like 4* (TLR4) (Tanga *et al.*, 2005) nell'attivazione della microglia e nei meccanismi di iniziazione del dolore neuropatico. La fractalkina è una chemochina espressa sulla superficie dei neuroni spinali (Asensio & Campbell, 1999) che attiva il suo unico recettore CX3CR1 espresso prevalentemente sulla microglia (Verge *et al.*, 2004), pertanto rappresenta un importante strumento di comunicazione tra neuroni e cellule gliali. Inoltre, l'attivazione ATP-mediata dei recettori del tipo P2X4, espressi selettivamente dalla glia attivata a livello del Sistema Nervoso Centrale sembra essere richiesta per lo sviluppo del dolore neuropatico (Tsuda *et al.*, 2005). Diverse protein chinasi possono essere attivate dai mediatori

precedentemente descritti, per esempio la protein chinasi A può essere attivata dalla PGE2 (Gold *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2004), mentre la protein chinasi C dalla bradichinina. Inoltre, la protein chinasi C può determinare la fosforilazione del recettore per la capsaicina (Caterina *et al.*, 1997) (TRPV1, transient receptor potential ion channel o VR1, vanilloid receptor 1) e quindi la riduzione della sua soglia di attivazione dai 43 gradi centigradi alla temperatura corporea (see Julius & Basbaum, 2001). In seguito a danno ai nervi nei neuroni dei DRG si determina anche l'aumentata fosforilazione (Kenney & Kocris, 1998; Obata, 2004) di tre importanti membri della famiglia delle MAP chinasi: ERK, p38 (Jin *et al.*, 2003) e JNK (c-Jun N-terminal Kinase) che possono fosforilare direttamente alcuni canali del calcio, del sodio ed il canale TRPV1 determinando un aumento della loro attività (Bonnington & Mc Naughton, 2003; Bhave *et al.*, 2002; Bhave & Gereau, 2003). Inoltre, le MAP chinasi possono indurre la trascrizione genica agendo su fattori di trascrizione come per esempio CREB (cyclic AMP response element binding protein) la cui attivazione risulta aumentata nei neuroni delle corna dorsali dopo lesione ai nervi (Miletic *et al.*, 2002). CREB può determinare un aumento della trascrizione di geni codificanti (Ji *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2003) per diverse molecole coinvolte nello sviluppo del dolore neuropatico come c-fos, la ciclossigenasi del tipo 2 (COX-2), le prodinorfine ed il recettore TrkB. In seguito a lesioni ai nervi periferici, anche a livello dei DRG si verificano cambiamenti nell'espressione di centinaia di geni (Costigan *et al.*, 2002) che codificano per proteine quali per esempio il peptide galanina, il neuropeptide Y e la colecistochinina (Hokfelt *et al.*, 1994). Inoltre, alla base dello sviluppo dei fenomeni di sensibilizzazione vi sono alterazioni strutturali come il fenomeno dello *sprouting* delle fibre A: fibre mielinizzate a conduzione rapida che normalmente terminano nelle lamine più interne del midollo spinale (lamine III o IV) ed in seguito alla lesione nervosa subiscono riarrangiamenti anatomici e riorganizzano i loro terminali in modo da raggiungere la lamina II delle corna dorsali (Woolf *et al.*, 1992; Ji & Woolf, 2001). Inoltre, variazioni dei livelli di neurotrasmettitori a carattere eccitatorio come il glutammato (Kawamata & Omote, 1996; Doubell *et al.*, 1999; Hudson *et al.*, 2002) ed inibitorio come il GABA (Lever *et al.*, 2003) partecipano all'aumentata eccitabilità neuronale (sensibilizzazione centrale) alla base dello sviluppo del dolore neuropatico (Scholz & Woolf, 2002; see Woolf, 2004). I meccanismi di plasticità che accompagnano il

dolore neuropatico coinvolgono anche alcuni canali del sodio voltaggio-dipendenti e fattori neurotrofici come per esempio il BDNF il cui ruolo sarà trattato in dettaglio successivamente. Tuttavia, questi sono solo alcuni esempi di mediatori e meccanismi neurochimici che partecipano ai fenomeni di sensibilizzazione alla base del dolore neuropatico.

## **1.2 I canali del sodio ed il dolore**

I canali del sodio voltaggio-dipendenti (VGSCs) sono indispensabili per l'insorgenza e la propagazione dei potenziali d'azione nei neuroni, di conseguenza alterazioni delle loro proprietà biofisiche e del loro *pattern* di espressione hanno un profondo impatto sull'eccitabilità neuronale (Cantrell & Catterall, 2001). E' noto che cambiamenti dell'attività dei canali del sodio e dell'eccitabilità neuronale, soprattutto dei neuroni sensitivi, contribuiscono al dolore neuropatico. I nocicettori, una sottopopolazione di neuroni sensitivi che rispondono a stimoli di tipo meccanico, termico e chimico, esprimono molti sottotipi di VGSCs (Felts *et al.*, 1997), sia sensibili (TTX-S) che resistenti (TTX-R) al blocco indotto da concentrazioni nanomolari di tetrodotossina (TTX), una tossina isolata dal pesce palla che si lega al poro di selettività di alcuni canali. Possiamo distinguere nove tipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti, ognuno con un peculiare schema di espressione nei nervi e nei muscoli di mammifero suggerendo che ciascuna isoforma abbia una funzione specifica nei diversi sistemi fisiologici e patologici. I neuroni dei gangli delle radici dorsali (DRG) contengono i trascritti di sette canali del sodio ed esprimono sottotipi di conduttanze generate dall'attività di canali del sodio (Baker & Wood, 2001). E' importante sottolineare che le correnti TTX-S sono presenti nei neuroni sensitivi dei DRG di largo e medio diametro, mentre quelle TTX-R sono presenti selettivamente nei neuroni dei DRG di piccolo diametro (Akopian *et al.*, 1996), tipicamente con funzione nocicettiva. Inoltre, tra le correnti del tipo TTX-R, le correnti persistenti, che sembrano giocare un ruolo chiave nel determinare la soglia di attivazione, sono probabilmente dovute ai canali del tipo Nav1.9, mentre le correnti transienti sembrano dovute al sottotipo Nav1.8. Tuttavia l'espressione dei canali del sodio risulta notevolmente alterata in seguito a lesione del nervo e tali

cambiamenti, che influenzano fortemente l'eccitabilità neuronale, sono associati allo sviluppo del dolore neuropatico (Kim *et al.*, 2001, Sleeper *et al.*, 2000). In particolare, è stato riportato che in seguito a lesione dei nervi periferici, risulta ridotta l'espressione dei canali Nav1.8 e Nav1.9 (Sleeper *et al.*, 2000) e anche di altri sottotipi di VGSC, quali Nav1.1, Nav1.2, Nav1.6 e Nav1.7 laddove, l'espressione del canale Nav1.3 (TTX-S), normalmente espresso solo nei neuroni sensitivi in via di sviluppo, risulta aumentata (Waxman *et al.*, 1994, Iwahashi *et al.*, 1994, Cummins & Waxman, 1997, Black *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2001, 2002). In condizioni fisiologiche, tale canale del sodio, localizzato principalmente a livello del SNC, risulta determinabile nei neuroni del midollo spinale a partire dal diciassettesimo giorno della vita embrionale ed espresso a livelli relativamente alti nei neuroni dei DRGs embrionali, mentre raggiunge livelli di espressione molto bassi, anche a livello del midollo spinale e del resto del SNC, a partire dal trentesimo giorno post-natale (Felts *et al.*, 1997). Il fatto che la sua espressione risulti aumentata in seguito a danno dei nervi periferici suggerisce che possa giocare un ruolo nella patogenesi del dolore neuropatico. Inoltre, l'evidenza che il fattore neurotrofico di derivazione gliale (GDNF) sia in grado di revertire sia i cambiamenti di espressione dei canali Nav1.3, Nav1.8 e Nav1.9, indotti dal danno ai nervi che il dolore neuropatico (Boucher *et al.*, 2000) supporta l'ipotesi che tale canale abbia un ruolo chiave nel dolore neuropatico. Alterazioni dei livelli di espressione di Nav1.3 sono state documentate in diversi modelli animali di dolore neuropatico. In particolare, l'aumentata espressione sia dei livelli proteici che di mRNA di Nav1.3 è stata riscontrata, nei neuroni dei DRGs, in seguito a legatura serrata del nervo spinale (Kim *et al.*, 2001) e a danno da costrizione cronica (Dib-Hajj *et al.*, 1999). Inoltre, aumentati livelli dell'mRNA di Nav1.3 sono stati riscontrati anche nei neuroni delle corna dorsali dopo danno da contusione spinale (Hains *et al.*, 2003). E' stato dimostrato che la somministrazione di oligonucleotidi antisense diretti contro l'mRNA per Nav1.3 attenua l'allodinia meccanica e riporta a valori normali la cinetica di attivazione di tali correnti che a livello dei neuroni danneggiati risulta quattro volte più veloce rispetto ai neuroni non danneggiati (Hains *et al.*, 2004). Pertanto, sebbene sia presente in letteratura un recente studio in contrasto con tale ipotesi (Lindia *et al.*, 2005a), diverse evidenze sperimentali suggeriscono che la ri-espressione del canale Nav1.3 che è noto recuperare rapidamente

dall'inattivazione (Cummins *et al.*, 2001) permettendo un *firing* neuronale a frequenze più alte del normale (Cummins & Waxman, 1997), possa contribuire in maniera importante alla ipereccitabilità dei neuroni danneggiati (Kim *et al.*, 2001). La selettività di espressione dei canali Nav1.7 e Nav1.8 a livello dei neuroni di piccolo calibro suggerisce un loro coinvolgimento nella modulazione della trasmissione dolorifica. L'espressione del canale Nav1.7 a livello dei neuroni periferici, principalmente di piccolo diametro, sensitivi e simpatici (Djourhri *et al.*, 2003) risulta regolata dall'NGF (Wada *et al.*, 2004) ed è caratterizzata da un livello di espressione molto basso nel SNC (Toledo-Aral *et al.*, 1997). E' stato dimostrato che il gene SCN9A, che codifica per Nav1.7, è il sito di mutazioni che portano alla sindrome da dolore rettale familiare con eritemalgia primaria (Yang *et al.*, 2004). Il fatto che questa patologia cronica, caratterizzata da bruciore alle estremità, dolore evocato dalla posizione eretta e con un generalizzato fenotipo infiammatorio, sia correlata con mutazioni a carico di tale gene suggerisce che questo canale possa avere un importante ruolo nel dolore infiammatorio. Infatti, a supporto di un ruolo guida per tale canale negli stati dolorosi infiammatori, topi *knock-out* nocicettore-specifici per Nav1.7 hanno mostrato un forte deficit nello sviluppo del comportamento dolorifico in modelli di dolore infiammatorio. In particolare, tali topi *knock-out* hanno mostrato una riduzione nella prima fase del comportamento dolorifico indotto dalla somministrazione intraplantare di formalina, ed una riduzione ancora più accentuata, accompagnata da una ritardata insorgenza, nella seconda fase (Nassar *et al.*, 2004). Inoltre, nei topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per Nav1.7 la somministrazione di carragenina e di NGF non ha indotto l'iperalgia termica tipicamente presente ed anche la somministrazione dell'adiuvante completo di Freund (CFA) non ha determinato iperalgia termica o meccanica (Nassar *et al.*, 2004). Sebbene tali topi ingegnerizzati avessero mostrato un chiaro fenotipo in modelli animali di dolore infiammatorio, nessuna informazione era disponibile riguardo l'effetto di tale delezione genica nel dolore neuropatico. La caratterizzazione funzionale dei neuroni positivi per Nav1.8 ha rivelato che più del 85% sono nocicettori (Djohri *et al.*, 2003) suggerendo un ruolo funzionale per tale canale nella conduzione dolorifica. Inoltre, è stato riportato che tale canale contribuisce alla fase depolarizzante del potenziale d'azione nelle cellule in cui è presente (Renganathan *et al.*, 2001). Esperimenti comportamentali hanno

documentato che Nav1.8 è un substrato necessario per la piena espressione dell'iperalgia termica indotta da NGF (Kerr *et al.*, 2001) ma non da PGE2. Tuttavia, Nav1.8 non sembra contribuire alla comparsa del comportamento nocicettivo che accompagna il dolore neuropatico indotto da danno parziale del nervo sciatico (Kerr *et al.*, 2001), anche se tali risultati sono in contrasto con quelli ottenuti da Lai e collaboratori (2002) che hanno riportato la completa reversione del comportamento nocicettivo neuropatico in seguito a somministrazione intratecale di oligonucleotidi antisenso per Nav1.8. Tuttavia, questa discrepanza potrebbe essere dovuta all'aumento dell'espressione di Nav1.7 riscontrata nei topi *knock-out* per Nav1.8 (Akopian *et al.*, 1999) che potrebbe mascherare l'eventuale ruolo di Nav1.8 nel dolore neuropatico. A supporto del coinvolgimento di tale canale nel dolore neuropatico, è stato riportato come in seguito a legatura del nervo spinale L5, l'espressione di Nav1.8 aumenta sia a livello dei gangli danneggiati che non (Porreca *et al.*, 1999); tuttavia, in altri modelli di dolore neuropatico tale canale presenta una ridotta espressione (Cummins & Waxman, 1997, Dib-Hajj *et al.*, 1999). Inoltre, i topi *knock-out* per Nav1.8 esibiscono un fenotipo resistente alla sensibilità meccanica misurata con il test di Randall-Selitto (Akopian *et al.*, 1999), mentre non mostrano alcuna differenza rispetto ai topi controllo, per quanto riguarda la sensibilità meccanica determinata con il test di Von Frey.

### **1.3 Il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) ed il dolore**

Il BDNF è un membro della famiglia delle neurotrofine (Huang & Reichardt, 2003) sintetizzato nei corpi cellulari dei neuroni sensitivi primari e costitutivamente espresso in una sotto-popolazione di neuroni nocicettivi dei gangli delle radici dorsali (DRG) con assoni amielinici che terminano nelle lamine superficiali delle corna dorsali (Emfors *et al.*, 1990). Tale fattore neurotrofico assume un importante ruolo non solo nella sopravvivenza dei neuroni (Jones *et al.*, 1994) e nei meccanismi di plasticità sinaptica (per es. *long-term potentiation*, LTP) (Lu & Figurov, 1997; Rivera *et al.*, 2004), ma anche come regolatore dell'eccitabilità neuronale. Inoltre, recentemente è stato suggerito che il BDNF agisce anche come neuromodulatore della prima sinapsi della via dolorifica ed è necessario per la piena

attivazione del neurone di secondo ordine (see Pezet *et al.*, 2002). I livelli di espressione del BDNF risultano alterati in diversi modelli di dolore, sia infiammatorio (Cho *et al.*, 1997a,b) che neuropatico (Fukuoka *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). Per esempio, nel modello di dolore infiammatorio dell'adiuvante completo di Freund (CFA), sia i livelli proteici di BDNF (Cho *et al.*, 1997a) che di mRNA (Cho *et al.*, 1997b) risultano drammaticamente aumentati nei neuroni dei DRGs. Inoltre, è stato riportato che in seguito a transezione del nervo sciatico la sintesi del fattore neurotrofico non avviene più nei neuroni di piccolo diametro dei gangli delle radici dorsali, dove avviene in condizioni fisiologiche, ma nei neuroni di grande diametro suggerendo che tale cambiamento possa contribuire allo sviluppo del dolore neuropatico indotto da danno ai nervi (Zhou *et al.*, 1999). E' stato anche suggerito che il BDNF è in grado di attivare la cascata delle MAP chinasi di tipo ERK (Kaplan & Miller, 2000) che media l'iperalgia associata a processi flogistici (Ji *et al.*, 1999, Ji *et al.*, 2002). Inoltre, è stato riscontrato che il BDNF è capace di indurre la fosforilazione della subunità NR1 del recettore NMDA nel midollo spinale di ratto (Slack & Thompson, 2002; Slack *et al.*, 2004). Anche Kerr e collaboratori (1999) avevano riportato che il fattore neurotrofico è in grado di aumentare l'attività mediata dal recettore NMDA a livello delle corna dorsali, sebbene altri studi risultino in contrasto con tale ipotesi (Heppenstall & Levin, 2001). Le evidenze sopra riportate documentano come la neurotrofina interferisce con i meccanismi di plasticità sinaptica alla base dello sviluppo del dolore. Il coinvolgimento del BDNF nello sviluppo del dolore neuropatico è stato anche proposto. Infatti, è stato documentato un aumento di espressione, nei neuroni dei DRG a livello L4, in seguito a legatura del nervo spinale L5 (Fukuoka *et al.*, 2001). Recentemente, è stato anche riportato che somministrazioni intratecali ripetute di anticorpi diretti contro TrkB, recettore per il BDNF, siano in grado di sopprimere l'allodinia indotta dalla legatura parziale del nervo sciatico e che tale allodinia risulti ridotta in topi *knock-out* eterozigoti per il BDNF (Yajima *et al.*, 2005). Tuttavia, in contrasto con tali ipotesi, uno studio di terapia genica suggerisce che il BDNF esogeno possa avere effetti analgesici nel dolore neuropatico (Eaton *et al.*, 2002).

#### 1.4 La protein chinasi B (Akt) ed il dolore

La serina/treonina protein chinasi B o Akt (PKB/Akt) è stata descritta per la prima volta nel 1991 ed è stata definita protein chinasi B a causa dell'omologia con le protein chinasi A e C (Jones *et al.*, 1991). Nello stesso anno, essa è stata identificata come il prodotto dell'oncogene *v*-Akt del retrovirus AKT8 (Bellacosa *et al.*, 1991). L'Akt risulta attivata tramite fosforilazione della treonina Thr308 e della serina Ser473 (Alessi *et al.*, 1996; Meier *et al.*, 1997, Alessi & Cohen, 1998; Toker & Newton, 2000), presenti nella coda carbossi-terminale (fig. 1.3). L'Akt è attivata dal BDNF (Cheng *et al.*, 2003) ed in risposta ad un'ampia varietà di stimoli (Downard, 1998) quali l'insulina (Lawlor & Rotwein, 2000), la trombina e diversi altri fattori di crescita (Kaplan & Miller, 2000) come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) (Taylor, 2000; Simakjornboon *et al.*, 2001), il fattore di crescita epidermico (EGF) (Chaudhary & Hruska, 2001) e l'NGF. Inoltre, è stata documentata l'esistenza di una via di attivazione di Akt mediata dal recettore NMDA (Bhave *et al.*, 1999; Perkinson *et al.*, 2002) che risulta calcio- e fosfatidil-inositolo-3-kinasi (PI3k)-dipendente, diversamente dall'attivazione mediata dai recettori a tirosin chinasi per le neurotrofine (Kaplan & Miller 2000) che risulta essere calcio-indipendente. E' stato anche dimostrato che l'attivazione di Akt possa richiedere il coinvolgimento dei recettori accoppiati a proteine G, in maniera indipendente dall'attivazione in tirosina (Murga *et al.* 1998, 2000). La defosforilazione di Akt è mediata, invece, dalle fosfatasi di tipo PP2A, PHLPP1 e PHLPP2 che direttamente defosforilano in corrispondenza della serina (Mendoza & Blenis, 2007). L'Akt è un effettore a valle della *pathway* della PI3K, una chinasi lipidica che fosforila i fosfatidilinositoli in posizione D-3 per produrre PI(3,4,5)P3 che agisce come un secondo messaggero (Toker & Cantley, 1997). L'Akt sembra mediare la maggior parte degli effetti del PI3K (Franke *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999) che è tipicamente attivato da neurotrofine che mediano la sopravvivenza neuronale e la crescita assonale (Atwal *et al.*, 2000; Patapoutian & Reichardt, 2001; Markus *et al.*, 2002). Tale chinasi è ben conosciuta come fattore pro-sopravvivenza che agisce inattivando la proteina Bad, membro proapoptotico della famiglia di Bcl-2, attraverso la fosforilazione della serina 136 (Datta *et al.*, 1997). Inoltre PKB esiste in tre isoforme: PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2 e PKB $\gamma$ /Akt3 (fig.

1.3) (see Sale & Sale, 2008). Akt1 è espressa a livello ubiquitario, Akt2 è espressa in maniera predominante nei tessuti bersaglio dell'insulina quali le cellule adipose, il fegato ed i muscoli scheletrici, mentre Akt 3 è altamente espressa nel cervello.

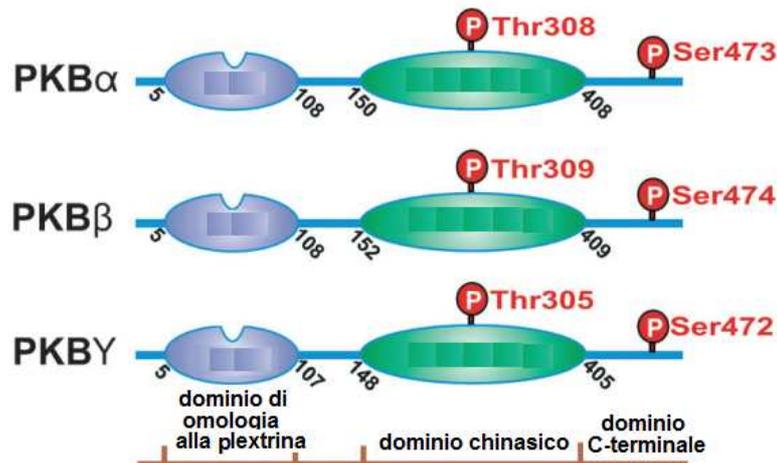


Fig.1.3. Strutture delle tre isoforme di PKB o Akt (Sale & Sale, 2008).

L'Akt, oltre ad essere un importante fattore pro-sopravvivenza che partecipa al controllo dell'apoptosi, esplica un ruolo chiave in una grande varietà di processi fisiologici, come per esempio il trasporto del glucosio, la sintesi del glicogeno, il controllo della lipolisi e della lipogenesi, l'angiogenesi, la regolazione del ciclo cellulare e della genesi di tumori (see Sale & Sale, 2008). Inoltre, diverse evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo chiave per l'attivazione di Akt nei meccanismi di sviluppo del dolore sia infiammatorio che neuropatico. In particolare, utilizzando la tecnica dell'immunoistochimica, è stato riportato l'aumento di neuroni immunoreattivi per pAkt a livello delle corna dorsali ipsilaterali del tratto L5 del midollo spinale a partire da 1 giorno fino a 7 giorni dopo SNL nel ratto (Xu *et al.*, 2007). Mentre a livello del rispettivo DRG nel ratto l'aumento è stato riscontrato a partire da 12 ore fino a 3 giorni dopo SNL (Xu *et al.*, 2007). E' stato anche suggerito che l'Akt contribuisce all'induzione dell'iperalgia termica indotta dall'NGF (Zhuang *et al.*, 2004) e allo sviluppo della sensibilizzazione meccanica indotta dalla capsaicina (Sun *et al.*, 2006). Infatti, un'aumentata immunoreattività per pAkt si riscontra nelle corna dorsali ipsilaterali a livello lombare, soprattutto nelle lamine I-II, e nei neuroni dei DRGs a livello

L5, in seguito alla somministrazione intradermica di capsaicina nella zampa posteriore di ratto (Sun *et al.*, 2006). Inoltre, sia il pretrattamento che il post-trattamento con diversi inibitori dell'Akt, determina una riduzione dell'ipersensibilità meccanica indotta dalla capsaicina, suggerendo il coinvolgimento di Akt nello sviluppo e nel mantenimento dell'iperalgia meccanica (Sun *et al.*, 2006). Tuttavia, in contrasto con tali studi che suggeriscono il coinvolgimento dell'Akt nei meccanismi di sviluppo del dolore Guedes e collaboratori (2008) documentano che l'aumento dei livelli di pAkt può rappresentare un meccanismo di protezione dal danno ossidativo. Infatti, 7 giorni dopo transezione del nervo sciatico, periodo in cui il midollo spinale è particolarmente esposto allo stress ossidativo, si osservano aumentati livelli di pAkt e di Akt totale nel tratto lombosacrale del midollo spinale di ratto (Guedes *et al.*, 2008). Studi condotti su cellule di endotelio cerebrale suggeriscono che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) attivano l'Akt mentre sostanze ad azione antiossidante ne possono inibire la fosforilazione supportando l'esistenza di una stretta relazione tra i livelli di Akt e la formazione di specie radicaliche (Schreibelt *et al.*, 2007). Evidenze sperimentali documentano che, 1 giorno dopo la lesione del midollo spinale indotta da occlusione vascolare (SCI), la forma fosforilata di Akt risulta ridotta nel core ed aumentata nell'area periferica, dove molti motoneuroni riescono a sopravvivere, suggerendo un ruolo neuroprotettivo per Akt (Yu *et al.*, 2005). Come sopra detto, il BDNF è costitutivamente espresso nei neuroni dei DRGs ed il genoma di queste cellule sembra essere regolato dall'Akt (Pezet *et al.*, 2005). Tuttavia, resta da chiarire se l'Akt possa mediare i processi alla base degli stati di ipersensibilizzazione ed in particolare, dello sviluppo del dolore neuropatico.

## **1.5 I modelli sperimentali di dolore**

### **1.5.1 I modelli sperimentali di dolore infiammatorio**

A partire dagli anni '70 sono stati elaborati diversi modelli animali di dolore infiammatorio, quali il *formalin test*, il modello della carragenina, il *Complete Freud's Adjuvant* (CFA). Tra questi risulta essere ampiamente utilizzato il *formalin test* (Dubuisson & Dennis, 1977) che

prevede la somministrazione di una soluzione acquosa di formalina al 5% (s.c., 20 µl/50 µl) nella zampa posteriore di topo/ratto. Tale test prevede la determinazione del tempo in cui l'animale manifesta un comportamento dolorifico che consiste nel leccarsi e mordersi la zampa (*licking/biting*) e/o dal muovere velocemente la zampa (*flinching*) durante l'ora successiva alla somministrazione dell'agente algogeno e la sua registrazione ad intervalli di 5 minuti. Il *formalin test* risulta caratterizzato dalla presenza di una risposta comportamentale nocicettiva bifasica in cui la prima fase dura approssimativamente 10 minuti, mentre la seconda, che avviene in seguito ad un periodo di latenza di circa 10 minuti, dura 40 minuti. Hunskaar e collaboratori (1985) hanno mostrato che la somministrazione sistemica di oppioidi inibisce entrambe le fasi, mentre la somministrazione sistemica di FANS e corticosteroidi inibisce solo la seconda fase. Tali dati suggeriscono che la prima fase possa essere causata dalla diretta attivazione delle fibre C dei nocicettori, mentre la seconda fase possa essere determinata dalla risposta infiammatoria in atto. Pertanto, possiamo considerare la prima fase come indice della risposta dolorifica di tipo nocicettiva e la seconda fase come indice della risposta dolorifica di tipo infiammatoria. Il *formalin test* rimane ancora uno dei modelli animali di dolore più utilizzati. Esso è facile da riprodurre e permette di avere informazioni sia sulla componente nocicettiva che infiammatoria del dolore. Pertanto, risulta utile per esempio nel caso della caratterizzazione farmacologica di potenziali agenti analgesici. Il modello della carragenina (Winter *et al.*, 1962; Tonussi & Ferreira, 1992) prevede la somministrazione sottocutanea di λ-carragenina, unico sottotipo di carragenina che non forma gel a temperatura ambiente, all'1% nella zampa posteriore di ratto (Kayser & Guilbaud, 1987). I carragenani sono un complesso gruppo di polisaccaridi estratti dalle alghe rosse e costituiti da monomeri galattosidici ripetuti che formano gel termoreversibili. Il *Complete Freund's Adjuvant* è una emulsione acqua-olio contenente componenti della parete batterica del *mycobacterium butyricum* che induce una risposta infiammatoria. In particolare, la somministrazione intraplantare di CFA (<0.5 mg/Kg) nel ratto induce infiammazione ed edema (Millan *et al.*, 1988) che compaiono dopo poche ore e durano per 5 settimane, mentre l'iperalgia termica e meccanica raggiungono il picco dopo 24 ore e persistono per l'intero periodo. La

somministrazione intradermica di CFA, a livello della coda nel topo/ratto risulta, invece, in un modello di poliartrite (Millan *et al.*, 1986). Esistono inoltre, altri modelli di dolore infiammatorio che prevedono la somministrazione intraplantare di sostanze algogene, quali la prostaglandina E2 (PGE2) (Kuhn & Willis, 1973) ed il fattore di crescita del nervo (NGF) (Taiwo *et al.*, 1991; Lewin *et al.*, 1993). Recentemente, è stato caratterizzato un modello di dolore infiammatorio cutaneo indotto da un danno sterile provocato da una singola irradiazione ultravioletta (Davies *et al.*, 2005). Il modello appena descritto differisce dai classici modelli di dolore infiammatorio che coinvolgono componenti del sistema immunitario specializzate nel combattere i patogeni. Infine, il modello della neurite infiammatoria del nervo sciatico (SIN) (Chacur *et al.*, 2001) consiste nell'applicazione dello zymosan (pareti cellulari di lievito) intorno al nervo sciatico nel ratto ed induce allodinia meccanica sia a livello della zampa ipsilaterale che controlaterale.

### **1.5.2 I modelli sperimentali di dolore neuropatico**

I modelli sperimentali di dolore neuropatico correntemente utilizzati sono diversi e si basano sulla legatura serrata o blanda dell'intero nervo (spinale o periferico) o di una sua parte o di alcune sue branche. Tra quelli classicamente utilizzati possiamo distinguere il modello della legatura spinale del nervo L5 (SNL) che sarà trattato dettagliatamente nel prossimo paragrafo, il modello del danno da costrizione cronica (CCI) ed il modello della legatura parziale del nervo sciatico (PSL). Recentemente, sono stati introdotti altri modelli di dolore neuropatico quali il modello del danno nervoso di tipo *spared* (SNI), il modello del danno al nervo tibiale, il modello di neuropatia diabetica ed, infine, il modello della legatura parziale del nervo safeno (SPL). Il modello del CCI (Bennett & Xie, 1988) prevede l'esposizione del nervo sciatico a mezza coscia per 4-5 mm e quattro legature con filo cromato 4.0 intorno al nervo in prossimità della triforcazione del nervo sciatico e a distanza di 1 mm l'uno dall'altro. Il modello del CCI determina irritazione, rigonfiamento e danno agli assoni (Basbaum *et al.*, 1991; Guilbaud *et al.*, 1993) e gran parte del danno da CCI è dovuto all'infiammazione determinata dal cromo presente nelle suture (Maves *et al.*, 1993).

Il modello PSL (Seltzer *et al.*, 1990) prevede l'esposizione del nervo sciatico nella coscia superiore e la legatura di circa la metà del nervo con un filo di seta 8.0 in un sito adiacente al punto in cui il bicipite posteriore ed il nervo semitendineo si diramano. Il modello SNI (Decosterd & Woolf, 2000) rappresenta una variante del modello PSL e si basa sulla lesione di due delle tre branche terminali del nervo sciatico, i nervi tibiale e del peroneo comune, lasciando intatto il restante nervo surale. Il modello SPL (Walczak *et al.*, 2005) è un nuovo modello di dolore neuropatico, facilmente riproducibile, che consiste in un parziale danno unilaterale del nervo safeno. Il modello della neuropatia diabetica (Wang & Wang, 2003) prevede la somministrazione di streptozotocina (i.p., 1 mg/Kg) per una sola volta nel ratto e per 5 giorni consecutivi nel topo. La streptozotocina è un antibiotico che possiede tossicità selettiva per le cellule pancreatiche, determinando la comparsa di diabete in circa 3 settimane. In seguito all'accertata insorgenza di diabete, una percentuale variabile di animali sviluppa il dolore neuropatico.

### **1.5.3 Il modello di dolore neuropatico della legatura del nervo spinale L5 (SNL)**

Il modello della Spinal Nerve Ligation (Kim & Chung, 1992) prevede l'esposizione e la legatura con un filo di seta 6-0 del nervo spinale L5 nel topo e dei nervi spinali L5 e L6 nel ratto, nervi che insieme al nervo L4 afferiscono al nervo sciatico. Il modello SNL induce una severa allodinia meccanica che inizia a svilupparsi sin dai primi giorni successivi alla chirurgia, raggiunge il picco una settimana dopo e si mantiene stabile fino ad almeno 30 giorni. La legatura del nervo spinale L5 non determina variazioni della sensibilità termica, sebbene nella letteratura siano presenti anche dati contrastanti. Tra i diversi farmaci studiati il gabapentin, la morfina ed il WIN55,212-2, un agonista non selettivo dei recettori cannabinoidi, sono in grado di revertire l'allodinia meccanica indotta da legatura del nervo spinale L5 nel ratto (La Buda & Little, 2005); l'amitriptilina e la fluoxetina determinano solo una parziale riduzione; l'indometacina, la carbamazepina, la fenitoina (Hunter *et al.*, 1997) e U-50,488-H, un agonista del recettore oppioide K, risultano inefficaci (La Buda & Little, 2005). Dal momento che il danno interessa soltanto un nervo spinale (L5), tale

modello presenta il vantaggio di permettere lo studio dei meccanismi neurochimici che avvengono a livello del DRG danneggiato (L5) in paragone a quello non danneggiato (L4). I meccanismi fisiopatologici che sottendono allo sviluppo dell'allodinia indotta da SNL coinvolgono numerosi mediatori del dolore neuropatico. Per esempio, 3 giorni dopo SNL è stato riportato l'aumento dell'immunoreattività per la fractalkina (Lindia *et al.*, 2005b) e per la forma fosforilata del recettore NMDA (Gao *et al.*, 2005) e l'aumento dell'espressione della COX2, nNOS e iNOS (O'Rielly & Loomis, 2006) nelle corna dorsali ipsilaterali a livello del tratto L5 del midollo spinale nel ratto. Allo stesso livello 7 giorni dopo transezione del nervo spinale L5, mediante indagini immunohistochimiche, è stato riscontrato un aumento dell'attivazione microgliale ed astrocitica nel topo (Burzstajn *et al.*, 2004). Sempre allo stesso livello 14 giorni dopo SNL risulta aumentata l'espressione del recettore P2X4R, determinata con tecniche di immunofluorescenza, nelle cellule gliali secondo un andamento temporale simile a quello dello sviluppo dell'allodinia meccanica (Tsuda *et al.*, 2003). Inoltre, topi *knock-out* per l'interleuchina-1beta presentano una riduzione dell'allodinia indotta da SNL (Honore *et al.*, 2006) suggerendo che la citochina possa essere un mediatore del dolore neuropatico indotto da SNL. Tale deduzione è supportata da uno studio condotto utilizzando il modello di costrizione del nervo sciatico nel ratto che ha riportato l'aumento di espressione dell'mRNA per l'interleuchina-1beta nel nervo sciatico 7 giorni dopo la lesione ed un ritardato aumento della citochina anti-infiammatoria IL-10 che sembra mediare la fase di risoluzione della sensitizzazione (Okamoto *et al.*, 2001). In seguito ad SNL è stata riscontrata anche l'*up-regulation* della subunità alfa2delta1 del canale del calcio voltaggio-dipendente (VGCC) a livello dei DRG e del midollo spinale. Inoltre, l'aumento ha raggiunto livelli superiori rispetto a quelli determinati in altri modelli di dolore neuropatico come per esempio il CCI (Luo *et al.*, 2001). Anche l'espressione del canale del sodio voltaggio-dipendente Nav 1.8 risulta aumentata a livello dei DRGs (Porreca *et al.*, 1999) e del nervo sciatico (Gold *et al.* 2003) dopo SNL. Tuttavia, i meccanismi fisiopatologici alla base del dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale L5 restano in gran parte da chiarire.

## **1.6 I tests comportamentali per lo studio della risposta dolorifica**

Accanto ai numerosi modelli animali di dolore sono stati elaborati anche diversi metodi per lo studio della risposta nocicettiva quali per esempio il test di Von Frey ed il test di Haregreaves'. Il test di Von Frey è stato descritto da diversi autori (Fuchs *et al.*, 1999; Kim & Chung, 1992; Seltzer *et al.*, 1990) come metodo per determinare la presenza di allodinia meccanica utilizzando filamenti numerati di diversa rigidità che imprimono una forza incrementale secondo una scala logaritmica (i filamenti di Von Frey). Tali filamenti vengono applicati sulla superficie plantare della zampa posteriore per 3-5 secondi. Per determinare la risposta di *withdrawal*, in seguito all'applicazione dei filamenti di Von Frey, esistono due metodi: il metodo *up-down* (Chaplan *et al.*, 1994; Dixon, 1980) che consente di determinare il valore corrispondente al 50% della soglia di *withdrawal* ed il metodo *full battery* (Fuchs *et al.*, 1999) che permette di calcolare la percentuale di risposta. Il metodo *up-down* consiste nell'applicazione dei diversi filamenti secondo una sequenza che tiene conto del tipo di risposta dell'animale. In particolare, si applica come primo filamento quello corrispondente al 50% della soglia di *withdrawal* in condizioni basali. Successivamente, in seguito a presenza di risposta dolorifica, si applica un filamento di forza decrescente, mentre si applica quello di forza crescente in seguito ad assenza di risposta dolorifica. Il test continua fino a che si ottengono almeno sei misurazioni intorno al valore del 50% di soglia di *withdrawal*. Il test di Haregreaves' (Haregreaves *et al.*, 1988) consiste, invece, nella proiezione di una sorgente di calore radiante sulla zampa di ratto/topo e permette di determinare l'eventuale presenza di iperalgesia termica misurando il tempo di reazione.

## **1.7 Approccio fitoterapico al controllo del dolore**

Il dolore è stato alleviato con rimedi fitoterapici fin dai tempi più antichi. In natura sono presenti, infatti, numerose specie contenenti principi attivi ad azione analgesica, quali per esempio l'oppio, la cannabis sativa ed il capsicum. Studi clinici, inoltre, documentano

l'efficacia di sostanze di origine naturale nel trattamento del dolore che accompagna condizioni patologiche, quali per esempio l'osteoartrite (Chrubasik *et al.*, 2007) e l'emicrania (Agosti *et al.*, 2006). Inoltre, uno studio *in vivo* ha mostrato che l'acido tormentico, un triterpene pentaciclico isolato dalla pianta brasiliana *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), possiede proprietà antiallodiniche paragonabili a quelle del gabapentin nel dolore neuropatico indotto dalla legatura parziale del nervo sciatico nel topo (Bortalanza *et al.*, 2002). Uno studio clinico a doppio cieco ha riportato l'efficacia di un rimedio contenente l'intera pianta di cannabis nel ridurre il dolore neuropatico associato a sclerosi multipla (Rog *et al.*, 2005).

### **1.7.1 Gli olii essenziali ed il dolore**

Gli olii essenziali sono miscele complesse di diversi composti aromatici, estratte dalle piante mediante distillazione o spremitura, la cui composizione è determinata principalmente dal patrimonio genetico di ciascuna varietà (*cultivar*) e può essere influenzata dal metodo di estrazione (McGimpsey & Porter, 1999). Essi vengono utilizzati da diversi decenni nell'aromaterapia, un metodo curativo naturale, al fine di migliorare la percezione dello stato di benessere fisico e mentale, ma soprattutto come sostanze ad azione coadiuvante per il trattamento di numerose patologie (Wiebe, 2000, Komori *et al.*, 1995, Smallwood *et al.*, 2001). Infatti, gli olii essenziali risultano utili nell'alleviare la sintomatologia di alcune malattie cutanee, come la psoriasi, la dermatite e l'eczema (see Cavanagh & Wilkinson, 2002). Inoltre, posseggono proprietà antiinfiammatorie, antibatteriche, antifungine, antivirali, insetticide, espettoranti, digestive, diuretiche, immunostimolanti, spasmolitiche e sono in grado di facilitare l'induzione del sonno e di stimolare l'appetito e la circolazione (Price & Price, 1995). E' importante sottolineare che gli olii essenziali sono utilizzati da diversi decenni anche allo scopo di alleviare il dolore; è noto il loro uso in situazioni associate a dolore quali le procedure odontoiatriche. Numerose evidenze sperimentali documentano le proprietà antinocicettive di diversi olii essenziali quali per esempio l'olio essenziale di *Eremanthus erythropappus* (Sousa *et al.*, 2008), di *Alpinia zerumbet* (De Araújo *et al.*, 2005), di *Croton sonderianus* (Santos *et al.*, 2005), di *Dracocephalum kotschy*

(Golshani *et al.*, 2004), di *Zataria multiflora* (Jaffary *et al.*, 2004), di *Laurus nobilis* Linn (Sayyah *et al.*, 2003) in modelli di dolore infiammatorio nel topo e nel ratto. Studi clinici hanno riportato che l'olio essenziale di lavanda in combinazione con l'agopuntura è efficace nel ridurre il dolore al collo (Yip & Tse, 2006) e che gli oli essenziali di arancia e ginger in associazione ai massaggi sono in grado di alleviare il dolore alle ginocchia (Yip & Tam, 2008). Inoltre, l'olio essenziale di lavanda ed in particolare, il linalolo, uno dei componenti presente in maggiore quantità, insieme ad il suo estere linalil-acetato, ha mostrato esplicitare attività antinocicettiva nel test della piastra calda e nel test dell'acido acetico (Barocelli *et al.*, 2004). Le proprietà antiinfiammatorie ed analgesiche di tale interessante monoterpene sono state documentate in diversi modelli di dolore infiammatorio (Peano *et al.*, 2002; 2004a; 2004b; 2005) e saranno trattate in seguito, visto che il linalolo è stato per noi oggetto di studio. Indagini sperimentali hanno investigato le proprietà di altre sostanze isolate dagli oli essenziali. Per esempio, il beta-pinene ed il 1,8-cineolo, due monoterpene presenti nell'olio essenziale di Eucalipto della varietà *camaldulensis*, hanno mostrato possedere proprietà antinocicettive nel test della piastra calda e nel test del *tail-flick* (Liapi *et al.*, 2008). Recentemente, uno studio elettrofisiologico ha mostrato che l'eugenolo, sostanza presente in diverse piante come il garofano, l'alloro ed il pepe, è capace di inibire le correnti del sodio, sia quelle sensibili che resistenti alla tetrodotossina andando a rallentare il recupero dall'inattivazione, e che tale meccanismo è verosimilmente responsabile della sua azione analgesica (Cho *et al.*, 2008).

## **1.7.2 L'olio essenziale (OE) di bergamotto**

### **1.7.2.1 Il bergamotto**

Il bergamotto è un agrume che viene classificato come *Citrus Bergamia* Risso *et Poiteau* ed appartiene alla famiglia delle Rutacee, genere *Citrus*. Il bergamotto è un frutto endemico calabrese che fruttifica con successo solo lungo la sottile striscia costiera, lunga un centinaio di chilometri, che si estende tra Villa San Giovanni e Gioiosa Jonica. Tale zona, in provincia di Reggio Calabria è caratterizzata da un terreno di tipo argilloso-calcareo e da peculiari

caratteristiche climatiche che forniscono l'*habitat* ideale per l'agrume. Tuttavia, il bergamotto viene coltivato anche in altri Paesi (Florida, California, Costa d'Avorio, Tunisia, Sud America) e la sua origine rimane ancora da chiarire, sebbene l'ipotesi più accreditata sembra essere quella di un ibrido tra due diverse varietà del genere *Citrus*. Il frutto maturo ha una forma sferica o leggermente piriforme, con un peso medio intorno ai 100 gr. e una colorazione gialla. La buccia è mediamente sottile, con una superficie liscia e, a volte, moderatamente rugosa, mentre la polpa, di colore verde-giallo pallido, è caratterizzata da un sapore fortemente acido e amaro. Il periodo di raccolta dei frutti va da Novembre a Marzo, mentre la fioritura avviene nel mese di Aprile. Esistono tre diverse varietà di bergamotto che si differenziano l'una dall'altra per caratteristiche botaniche e morfologiche, quali l'aspetto della pianta, la forma delle foglie e dei frutti, lo spessore della buccia e il periodo di raccolta dei frutti (Verzera *et al.*, 2003): le varietà Femminello, Castagnaro e Fantastico. Tuttavia, quest'ultima varietà rappresenta, attualmente, circa il 90% delle piante produttive (Dugo *et al.*, 1987). La tutela della coltivazione del *Citrus Bergamia Risso et Poiteau* è affidata al Consorzio del Bergamotto di Reggio Calabria che ha il compito di garantire la qualità del prodotto.

### **1.7.2.2 L'olio essenziale (OE) di bergamotto**

L'olio essenziale (OE) di bergamotto si ottiene per spremitura a freddo dell'epicarpo e parte del mesocarpo del frutto fresco di *Citrus Bergamia Risso et Poiteau* (FUI X ed.). In epoche precedenti alla prima opera di industrializzazione del processo di estrazione dell'essenza di bergamotto, che è avvenuta nel 1844, l'essenza veniva estratta per pressione manuale dalla scorza del frutto e veniva fatta assorbire da spugne naturali. Oggi, l'essenza viene ricavata per abrasione della parte superficiale dei frutti mediante un sistema di grattugie di cui sono dotate le "macchine pelatrici". Tale processo permette di ottenere un impasto che è una miscela di acqua e olio essenziale. Successivamente, la fase acquosa viene separata dalla fase oleosa che costituisce l'essenza. L'essenza ha una consistenza oleosa e si presenta liquida, talvolta con depositi solidi, volatile, con colorazione verde o giallo-verdastro, un

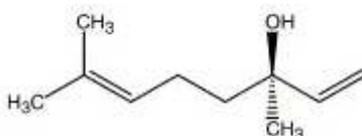
caratteristico odore gradevole ed un sapore aromatico amaro. L'OE di bergamotto è un fitocomplesso contenente oltre trecento componenti ed è formato da una frazione volatile, che rappresenta il 93-96% dell'essenza, e da una frazione non volatile, che ne costituisce il 4-7% (Di Giacomo & Mincione, 1993). La complessa composizione chimica dell'OE di bergamotto è stata resa nota mediante l'uso di tecniche analitiche quali la gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), per la frazione volatile (Verzera *et al.*, 1998), e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), per quella non volatile (Dugo *et al.*, 1997). I componenti della frazione volatile possono essere classificati in terpeni (es. linalolo), sesquiterpeni ed idrocarburi, mentre la frazione non volatile è costituita prevalentemente da composti eterociclici ossigenati, distinti in furano cumarine (psoraleni) e metossicumarine. La frazione volatile dell'OE di bergamotto è caratterizzata da un contenuto elevato di composti ossigenati e soprattutto dalla presenza in quantità superiori a quelle di tutti gli altri olii essenziali agrumari, di un alcool, il linalolo (6-18%) e del suo corrispondente estere, l'acetato di linalile (19-28%). Queste due sostanze determinano le caratteristiche aromatiche dell'essenza e costituiscono, infatti, dei markers di qualità del prodotto (Dugo *et al.*, 1987). Inoltre, il limonene, un monoterpene monociclico che rappresenta il costituente principale delle essenze del genere *Citrus*, con percentuale generalmente non inferiore al 60% (Moufida & Marzouk, 2003), nell'OE di bergamotto non è mai superiore al 50% e talvolta la sua percentuale è pari a quella dell'acetato di linalile. Tuttavia, la composizione dell'OE di bergamotto è soggetta ad una enorme variabilità per quanto riguarda la composizione percentuale di ciascun componente dell'essenza. Infatti, la composizione del fitocomplesso subisce ampie oscillazioni in funzione della stagione di raccolta e dell'area di produzione dei frutti. Per esempio, per quanto riguarda la quantità di linalolo presente nella frazione volatile, essa diminuisce dal 12% al 6% durante la stagione di raccolta, mentre il contenuto di acetato di linalile aumenta, durante lo stesso periodo di raccolta, dal 23% al 31% (Dugo *et al.*, 1987). Analogamente, anche la quantità dei componenti della frazione non volatile dell'essenza viene influenzata dal periodo di produzione: passando da gennaio a marzo, infatti, la bergamottina aumenta significativamente, mentre il bergaptene e il ciproptene diminuiscono di circa due terzi rispetto al contenuto iniziale (Dugo *et al.*, 1997). L'OE di bergamotto è ampiamente

utilizzato in diversi settori industriali ed in particolare, è indispensabile nell'industria profumiera a livello internazionale. Infatti, il fitocomplesso ha la peculiare funzione non solo di fissare il *bouquet* aromatico dei profumi, ma anche di armonizzare le altre essenze contenute, esaltandone freschezza e fragranza. L'OE di bergamotto trova impiego anche nel settore alimentare come aromatizzante di gelati, bibite, liquori e nel settore cosmetico per la preparazione di prodotti quali deodoranti, saponi, prodotti solari e dentifrici. Inoltre, è utilizzato anche come correttivo degli odori nelle preparazioni farmaceutiche. Analogamente ad altri olii essenziali, è utilizzato nell'aromaterapia per ridurre l'ansia e facilitare l'induzione del sonno (Komori *et al.*, 1995; Lehrner *et al.*, 2000), oltre che nella medicina popolare come analgesico, digestivo, cicatrizzante, etc. Per quanto riguarda i meccanismi alla base delle azioni farmacologiche dell'olio essenziale, la maggior parte delle evidenze sperimentali riportate in letteratura sono relative alle azioni di singoli componenti dell'OE di bergamotto, quali il linalolo o alcuni psoraleni, mentre si hanno a disposizione poche informazioni riguardo agli effetti del fitocomplesso. In particolare, l'azione analgesica dell'OE di bergamotto è verosimilmente ascrivibile principalmente al linalolo le cui proprietà antiinfiammatorie ed analgesiche, che verranno trattate nel dettaglio, sono state ampiamente documentate in diversi modelli di dolore infiammatorio (Peana *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2005). Recentemente, è stato riportato che l'OE di bergamotto è dotato di attività biologica, dimostrata a livello del sistema nervoso centrale. In particolare, è stato documentato che l'olio essenziale interferisce con processi fondamentali della comunicazione sinaptica, quali per esempio, il rilascio di amminoacidi con funzione di neurotrasmettitori in specifiche aree cerebrali del ratto (Morrone *et al.*, 2007). Inoltre, è stato documentato che l'OE di bergamotto conferisce neuroprotezione in sistemi *in vitro* (Corasaniti *et al.*, 2007) ed *in vivo* (Morrone *et al.*, 2006). In particolare, l'OE ha esplicito effetti neuroprotettivi in ratti sottoposti ad ischemia focale permanente, verosimilmente mediante modulazione dei livelli sinaptici di amminoacidi eccitatori quali aspartato e glutammato (Morrone *et al.*, 2006).

## 1.7.3 Il linalolo

### 1.7.3.1 Generalità

Il (-)-linalolo (Fig.1.3) è l'enantiomero presente in natura del monoterpene comunemente reperibile nella frazione volatile degli olii essenziali di diverse piante aromatiche come il bergamotto, il gelsomino e la lavanda.



**Fig. 1.3. Formula di struttura del (-)-linalolo.**

Il monoterpene esplica proprietà antiinfiammatorie ed analgesiche documentate da diversi studi sperimentali (Peano *et al.*, 2002, 2004a, 2004b, 2005) che saranno trattati successivamente.

### 1.7.3.2 Profilo farmacologico del linalolo

Dati presenti in letteratura hanno riportato l'attività antiinfiammatoria (Peano *et al.*, 2002) del linalolo suggerendo che le proprietà antiinfiammatorie esercitate da diversi olii essenziali siano da ascrivere al monoterpene. Le proprietà antiinfiammatorie del (-)-linalolo, del suo racemo e del suo estere, il linalil acetato, sono state studiate utilizzando il modello di edema indotto da carragenina nel ratto (Peano *et al.*, 2002). La somministrazione subcutanea di (-)-linalolo, a livello addominale e alle dosi di 50 e 75 mg/Kg nel ratto, ha determinato una drastica riduzione dell'edema 1 ora dopo la somministrazione di carragenina (1%; s.c.). Invece, alla dose più bassa di 25 mg/kg una significativa riduzione dell'edema è stata riscontrata 3 e 5 ore dopo la somministrazione. L'enantiomero puro ha dimostrato avere una

più lunga durata d'azione rispetto al racemo sebbene anche la forma racemica ha indotto una rilevante riduzione dell'edema indotto da carragenina (Peana *et al.*, 2002). Gli effetti del linalolo, somministrato nell'addome alle dosi di 50, 100, 150 e 200 mg/Kg (s.c.) 30 minuti prima della somministrazione della sostanza algogena, sono stati studiati utilizzando 3 modelli di iperalgesia (Peana *et al.*, 2004a) termica nel ratto. Il monoterpene ha revertito l'iperalgesia termica indotta dalla somministrazione di L-glutammato (30 nmol/zampa; s.c.) a livello della zampa ipsilaterale, solo quando somministrato alla dose di 200 mg/kg. Inoltre, esso ha esplicato un'azione antiiperalgesica anche a livello della zampa controlaterale alla somministrazione di glutammato che non ha sviluppato iperalgesia termica. Nel modello di iperalgesia termica indotta dalla somministrazione intraplantare di prostaglandina E2 (200 ng/zampa), il linalolo ha determinato una riduzione del tempo di latenza in risposta allo stimolo termico sia a livello ipsilaterale che contro laterale. Invece, la drastica attenuazione dose-dipendente dell'iperalgesia termica indotta dalla somministrazione di  $\lambda$ -carragenina (1 mg/zampa; s.c.) ha interessato la zampa controlaterale, ma non la ipsilaterale (Peana *et al.*, 2004a). Un recente studio *in vivo* ha dimostrato che la somministrazione sistemica di linalolo determina un effetto antinocicettivo in un importante modello animale di dolore infiammatorio: il formalin test (Peana *et al.*, 2004b). In particolare, il (-)-linalolo alle dosi di 50 e 100 mg/kg ha determinato una riduzione della prima, ma non della seconda fase del comportamento nocicettivo indotto dalla somministrazione intraplantare di una soluzione di formalina a bassa concentrazione (1%) nel ratto. Invece, quando somministrato alla dose più alta (150 mg/kg) ha determinato anche una drastica riduzione (32%) della seconda fase del comportamento dolorifico caratterizzato da *flinching* e *licking/biting*. Inoltre, la somministrazione di linalolo (25, 50 e 75 mg/Kg; s.c.) 30 minuti prima della somministrazione di una soluzione acquosa di acido acetico (1,2%; i.p.) ha ridotto significativamente il numero delle costrizioni addominali indotte dalla somministrazione dell'agente algogeno nel topo. L'effetto antinocicettivo del linalolo nel test di *writhing*, modello di dolore infiammatorio addominale, è stato completamente antagonizzato dal naloxone (i.p.; 5 mg/Kg) e dall'atropina (i.p.; 5 mg/Kg) (Peana *et al.*, 2002). Alla dose di 100 mg/Kg ha indotto una pronunciata risposta analgesica (Peana *et al.*, 2005) anche nel test

della piastra calda, modello di analgesia sovraspinale e tale effetto è stato ridotto in maniera significativa dal pretrattamento con un antagonista selettivo del recettore per l'adenosina A1, l' 1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina (DPCPX) (0.1 mg/kg; i.p.) e con un antagonista selettivo del recettore per l'adenosina A2A, il 3,7-dimetil-1-propargilxantina (DMPX) (0.1 mg/kg; i.p.) (Pena *et al.*, 2005). Numerosi studi hanno, quindi, documentato le proprietà antiinfiammatorie ed antinocicettive del linalolo in diversi modelli sperimentali di dolore infiammatorio. Inoltre, studi di binding hanno dimostrato che il linalolo si comporta come antagonista competitivo dei recettori NMDA (N-Metil-D-aspartato) (Elisabetsky *et al.*, 1999; Silva Brum *et al.*, 2001). In particolare, Elisabetsky e collaboratori (1999) hanno mostrato che il linalolo inibisce il binding del [3H] glutammato in maniera competitiva e che il *binding* del [3H] MK801 diminuisce con concentrazioni crescenti di linalolo, mentre il binding del [3H] muscimolo rimane inalterato. E' stato anche documentato che il linalolo è in grado di interferire con altri sistemi neurotrasmettitoriali. In particolare, il linalolo determina l'aumento del rilascio di dopamina in fettine striatali di ratto (Okuyama *et al.*, 2004) e l'inibizione del rilascio di acetilcolina a livello delle giunzioni neuromuscolari di topo (Re *et al.*, 2000). Infine, utilizzando la tecnica del patch clamp è stato mostrato che il linalolo sopprime, in maniera significativa e reversibile, ma non selettivamente, le correnti voltaggio-dipendenti ( $I_{Na}$ ,  $I_{Ca,L}$ ,  $I_{Ca,T}$ ,  $I_K$  e  $I_{KCa}$ ) nei neuroni sensitivi delle ORCs (cellule del recettore olfattorio) (Narusuye *et al.*, 2005) nella salamandra. Una simile soppressione è stata riportata negli ORCs in risposta a sostanze odorose come il limonene e l'amil acetato (Kawai *et al.*, 2000). Inoltre, è stato riportato che il linalolo sopprime le correnti voltaggio-dipendenti anche nelle cellule di Purkinje nel ratto (Narusuye *et al.*, 2005).

## **1.8 Scopo della tesi**

Il dolore neuropatico è il tipo di dolore cronico più difficile da trattare e manca ancora di trattamenti farmacologici efficaci. Esso rappresenta una condizione patologica invalidante che determina sofferenza e riduzione della qualità della vita dei pazienti che ne sono colpiti. Lo scopo principale di tale lavoro di tesi è stato pertanto quello di studiare i meccanismi alla

base dello sviluppo del dolore neuropatico al fine di identificare nuovi targets farmacologici per lo sviluppo di innovativi approcci terapeutici. A tal fine, è stato necessario effettuare un periodo di formazione all'estero presso un gruppo di Ricerca esperto del settore, il *Molecular Nociception Group* dell'*University College of London (UCL)*, Londra, sotto la guida del Prof. John Wood. Durante tale periodo, della durata di circa tredici mesi, oltre ad aver avuto l'opportunità di confrontarmi con dottorandi e giovani ricercatori che da diversi anni lavorano nel campo del dolore, ho potuto sviluppare una specifica competenza nell'impiego di diversi modelli animali compreso il modello di dolore neuropatico mediante legatura del nervo spinale L5 (SNL) nel topo. Al fine di determinare la risposta dolorifica in seguito all'applicazione di stimoli di diverso tipo, sono stati utilizzati diversi tests comportamentali. Inoltre, ho avuto anche modo di portare avanti esperimenti volti a studiare il coinvolgimento di alcuni sottotipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti, quelli del tipo Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8, nei meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale L5. Tali esperimenti sono stati condotti con un approccio comportamentale, utilizzando topi *knock-out* per i geni di interesse ottenuti nello stesso laboratorio. Inoltre, sempre con lo stesso approccio, ho potuto effettuare degli esperimenti volti a valutare l'eventuale coinvolgimento del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) nei meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico. Quindi, al rientro nel laboratorio di Farmacologia della Facoltà di Farmacia dell'Università della Calabria, presso il quale ho svolto il corso di Dottorato di Ricerca, ho potuto continuare a studiare il modello di dolore neuropatico precedentemente appreso caratterizzandone l'applicabilità allo studio dello sviluppo di nuovi approcci terapeutici, ivi compresi prodotti di origine naturale, per il trattamento del dolore neuropatico. Così, sono stati studiati gli effetti dell'olio essenziale (OE) di bergamotto (*Citrus Bergamia*, Risso) nel dolore neuropatico indotto da SNL; infatti, di recente è stato riportato come questo fitocomplesso sia in grado di interferire con i meccanismi fondamentali alla base della comunicazione sinaptica e di conferire neuroprotezione in sistemi *in vitro* (Corasaniti *et al.*, 2007) ed *in vivo* (Morrone *et al.*, 2007). Successivamente, nello stesso modello di dolore neuropatico sono stati valutati gli effetti del linalolo, uno dei componenti maggiormente rappresentati nel fitocomplesso e di cui sono note le proprietà antinocicettive in modelli di dolore infiammatorio. A tal scopo,

sono stati valutati gli effetti antinocicettivi e sull'attivazione della serina-treonin protein chinasi B (Akt), un prodotto genico pro-survival coinvolto nei meccanismi di dolore infiammatorio, ma scarsamente studiato nei modelli di dolore neuropatico.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 Animali

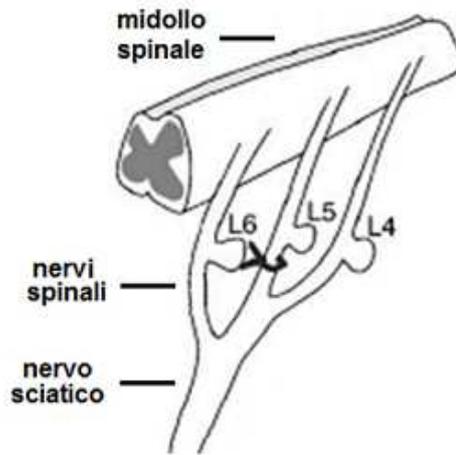
Per il presente studio, sono stati usati, topi maschi adulti del ceppo C57/BL6 (20-22 g; Charles River, Calco, Italy), topi *knock-out* per diversi sottotipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti (Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8) e per il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) ed i rispettivi topi *wild-type*. Gli animali sono stati stabulati in condizioni controllate di temperatura ( $22 \pm 1$  °C) e umidità relativa (65%), sono stati sottoposti ad un ciclo buio/luce di 12 ore (7:00-19:00), con libero accesso all'acqua e al cibo.

Le procedure sperimentali sono state condotte in accordo alle linee guida del Ministero della Salute (D.M. 116/1992) cercando di ridurre le condizioni di sofferenza per l'animale e utilizzando solo il numero di topi strettamente necessario per ottenere risultati apprezzabili.

### 2.2 Procedura chirurgica per la legatura del nervo spinale L5

Il dolore neuropatico è stato indotto dalla legatura del nervo spinale L5 (Fig. 2.1) nel topo secondo il modello descritto da Kim & Chung (1992). Prima di procedere alla procedura chirurgica, gli animali sono stati anestetizzati con isoflurano al 2% e l'anestesia è stata mantenuta durante l'operazione attraverso la continua somministrazione di isoflurano a basse concentrazioni (1-1,5 %). In seguito ad una incisione mediana nella cute della regione dorso-lombare del tronco, a livello delle vertebre L2-S2, i muscoli paraspinali del lato sinistro sono stati separati dai processi spinali, dalle articolazioni e dai processi trasversi a livello L4-S1. Il nervo spinale L5 del lato di sinistra è stato isolato e strettamente legato con

un filo di seta 6-0. La ferita chirurgica è stata quindi suturata utilizzando un filo di sutura 3-0.



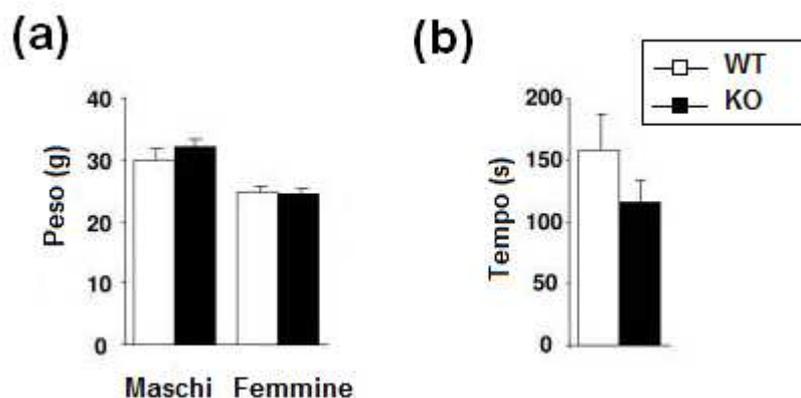
**Fig.2.1. Schema rappresentativo del modello di dolore neuropatico da legatura del nervo spinale L5 (Ueda, 2006).**

Per il gruppo degli animali sham, la procedura chirurgica è stata identica a quella del gruppo neuropatico eccetto che per la legatura del nervo spinale. Successivamente gli animali sono stati lasciati ad acclimatare per 24 ore, al fine di riprendersi dall'anestesia e dalla procedura chirurgica, prima di effettuare le procedure sperimentali. Inoltre, la postura è stata monitorata attraverso tutto il periodo post-operatorio e gli animali che hanno riportato lesioni sono stati esclusi dal gruppo sperimentale. Tuttavia, tra tutti gli esperimenti effettuati, solo un numero estremamente ridotto di animali ha mostrato segni di lesioni. Dopo aver effettuato gli opportuni trattamenti farmacologici, i tests comportamentali, che sono stati condotti fino a 30 giorni dopo la chirurgia, e gli eventuali prelievi di campioni per poter effettuare gli studi biochimici, gli animali sono stati sacrificati con la somministrazione (i.p.) di una dose letale di anestetico (cloralio idrato).

### **2.3 Topi *knock-out* del tipo nocicettore-specifico, globale e NFH-Cre per i geni di interesse**

La delezione genica dei geni di interesse è stata effettuata con tre diversi metodi che hanno portato rispettivamente alla generazione di topi *knock-out* del tipo nocicettore-specifico, globale e NFH-Cre (neurofilament heavy chain-Cre). I topi *knock-out* tessuto-specifici sono stati prodotti utilizzando il sistema del Cre-loxP (Le & Sauer, 2001; Nagi, 2000) che permette di incrociare di topi che esprimono la ricombinasi del tipo Cre (DNA Cyclization Recombination protein) con topi che possiedono il gene target affiancato da due siti loxP (gene “*floxed*”). Tale ricombinasi derivante dal batteriofago P1 va ad eliminare selettivamente la sequenza di DNA affiancata da due sequenze di riconoscimento con siti loxP. Inoltre, al fine di ottenere topi *knock-out* specificamente a livello dei nocicettori (nocicettore-specifico *knock-out*), sono stati utilizzati topi del tipo Cre-Nav1.8 in cui la ricombinasi del tipo Cre è stata specificamente espressa nei nocicettori guidando il gene con il promotore Nav1.8 (Stirling *et al.*, 2005), canale del sodio voltaggio dipendente espresso selettivamente nei neuroni nocicettivi e completamente assente in altri tessuti (Akopian *et al.*, 1996). Dall’incrocio tra topi transgenici in cui due siti loxP affiancano la sequenza del gene di interesse e topi transgenici in cui la ricombinasi del tipo CRE è espressa selettivamente nel tessuto di interesse, sono stati ottenuti topi in cui la delezione genica è avvenuta selettivamente a livello dei nocicettori. Con tale tecnica di delezione genica sono stati ottenuti topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per i sottotipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8 e per il fattore neurotrofico BDNF. Invece, la delezione genica globale è stata effettuata solo per il gene che codifica per il canale Nav1.3 (SCN3A) e Nav1.8 (SCN10A), dal momento la delezione globale del gene che codifica per Nav1.7 (SCN9A) (Nassar *et al.*, 2004) e per il BDNF (Rios *et al.*, 2001) risultava letale. La delezione tempo-specifica, infine, è stata effettuata solo per il gene che codifica per il canale Nav1.3. Dall’incrocio tra topi che esprimono la ricombinasi del tipo NFH-Cre, espressa principalmente nelle fibre mieliniche e nel cervello (Mallucci *et al.*, 2002) e topi con il gene per Nav1.3 *floxed* sono stati ottenuti topi *knock-out* del tipo NFH-Cre per Nav1.3 cioè in cui il gene è stato eliminato selettivamente nei neuroni sensitivi di

grande diametro. Tale tecnica di delezione sfrutta l'espressione tempo-specifica di questo peculiare sottotipo di Cre che si esprime 10-12 settimane dopo la nascita e permette, quindi, di ottenere topi *knock-out* in assenza delle alterazioni compensative, in questo caso di altri canali del sodio, che verosimilmente avvengono durante la vita embrionale. Gli animali ingegnerizzati sono stati, quindi, sottoposti ad esperimenti controllo al fine di verificare che la delezione genica non determini variazioni della crescita in peso (fig. 2.2.a) e delle prestazioni motorie (Fig. 2.2.b). Solo nel caso in cui non siano state verificate variazioni significative della crescita in peso e della coordinazione motoria, determinata mediante il test di Rotarod, si è potuto procedere alle opportune procedure sperimentali.



**Fig. 2.2. Esempio di esperimento controllo per verificare eventuali effetti della delezione genica di Nav1.3 sull'andamento della crescita in peso (a) e sulle prestazioni motorie (b) di topi *knock-out* in paragone a topi *wild-type*.** Effetti della delezione genica di Nav1.3 sull'andamento della crescita in peso (a) e sulle prestazioni motorie (b), determinate mediante il test di Rotarod, di topi *knock-out* (KO) in paragone a topi *wild-type* (WT). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=8-10 animali) e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).  $p < 0.05$  è stato considerato significativo. La delezione genica di Nav1.3 non determina variazioni significative né della crescita in peso né delle prestazioni motorie degli animali.

## 2.4 Tests comportamentali

I tests comportamentali sono stati condotti, due volte al giorno, 3 e 5 giorni prima (giorno -5 e -3) dell'induzione del dolore neuropatico al fine di determinare i livelli basali di ciascun animale e, nel periodo post-operatorio 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 e 30 giorni dopo la legatura del nervo spinale. I valori ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono stati normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. Per la determinazione della sensibilità meccanica, gli animali sono stati sottoposti al von Frey test seguendo il metodo dell'up-down (Chaplan *et al.*, 1994) ed utilizzando filamenti calibrati da 0.04 a 12.75 g. Per la determinazione della sensibilità termica, invece, è stato utilizzato il test di Haregreaves' (Haregreaves *et al.*, 1988).

### 2.4.1 Test di Von Frey

Il test di Von Frey è stato descritto da diversi autori (Fuchs *et al.*, 1999; Kim & Chung, 1992; Seltzer *et al.*, 1990) come metodo per determinare la presenza di allodinia meccanica utilizzando filamenti numerati di diversa rigidità che imprimono una forza incrementale secondo una scala logaritmica (filamenti di von Frey). Inizialmente gli animali vengono acclimatati nel Perspex box (75 mm per 90 mm) con pavimento metallico per un periodo di circa 60 minuti. Successivamente i filamenti di von Frey vengono applicati sulla superficie glabra della zampa posteriore sinistra per 3-5 secondi al fine di determinare la latenza di *withdrawal* (tempo espresso in s) della zampa dalla sorgente dolorosa. Per determinare la soglia di *withdrawal* esistono due metodi: l'*up-down* method (Chaplan *et al.*, 1994; Dixon, 1980) che consente di determinare il valore corrispondente al 50% della soglia di *withdrawal* ed il *full battery testing* (Fuchs *et al.*, 1999) che permette di calcolare la percentuale di risposta in seguito all'applicazione di otto filamenti, in ordine crescente di forza compresa tra gli 0.219g e i 7.59g, per cinque volte ciascuno. Tra questi è stato

utilizzato il metodo *up-down* che consiste nell'applicare come primo filamento quello corrispondente al 50% della soglia di *withdrawal* in condizioni basali e successivamente un filamento di forza decrescente in seguito a presenza di risposta nocicettiva ed uno di forza crescente in seguito ad assenza di risposta. Il test continua fino a che si ottengono almeno sei misurazioni intorno al valore del 50% di soglia di *withdrawal*. Ogni misurazione viene eseguita a distanza di 3 minuti dalla successiva per evitare la presenza di risposte amplificate a causa delle ravvicinate stimolazioni. I risultati sono espressi come media  $\pm$  ES e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita, dove appropriato, da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.

#### **2.4.2 Test di Haregreaves'**

Il test di Haregreaves' (Haregreaves *et al.*, 1988) permette di determinare l'eventuale presenza di iperalgesia termica misurando il tempo di reazione del topo/ratto allo stimolo termico e consiste nella proiezione di una sorgente di calore radiante sulla zampa (Plantar Test, modello 7650, Ugo Basile, Italia). In seguito alla cessazione dell'attività esplorativa dell'animale, si proietta tale sorgente sulla zampa posteriore sinistra utilizzando un'intensità del 20% per il topo e del 50% per il ratto ed un cut-off di 20 secondi per evitare eventuali danni tessutali. I risultati sono espressi come media  $\pm$  ES e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita, dove appropriato, da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.

#### **2.4.3 Test di Rotarod**

Il test di Rotarod (Janes & Roberts, 1968) è il test più utilizzato per valutare le capacità motorie dei roditori e prevede l'uso di un cilindro rotante sul quale l'animale deve camminare per evitare di cadere. Gli animali vengono posizionati sul Rotarod (modello

7650, Ugo Basile, Italia) ad una velocità costante di 20 giri al minuto per 60 secondi per consentire l'acclimatamento. Successivamente vengono sottoposti ad una velocità crescente per un tempo massimo di 5 minuti e viene registrato il tempo in cui il topo/ratto riesce a mantenersi in equilibrio sul cilindro rotante. Il test viene eseguito 4 volte al fine di ottenere una misura più accurata. I risultati sono espressi come media  $\pm$  ES e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita, dove appropriato, da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.

## 2.5 Formalin test

Il formalin test (Dubuisson & Dennis, 1977) è un modello di dolore infiammatorio ampiamente utilizzato nell'ambito della ricerca scientifica. Tale test è caratterizzato da una risposta comportamentale nocicettiva bifasica in cui la prima fase dura approssimativamente 10 minuti, mentre la seconda, che avviene in seguito ad un periodo di latenza di circa 10 minuti, dura 40 minuti. I topi/ratti vengono lasciati acclimatare rispettivamente per circa 60/20 minuti e successivamente vengono inseriti in un *restrainer* per la somministrazione intraplantare di una soluzione acquosa di formalina al 5% (s.c., 20  $\mu$ l/50  $\mu$ l) nella zampa posteriore sinistra. La formalina induce un comportamento nocicettivo spontaneo caratterizzato da *licking/biting* e *flincking*. Durante l'ora successiva alla somministrazione viene, quindi, registrato il tempo di durata del comportamento di *licking/biting* per ogni intervallo di tempo della durata di 5 minuti. I risultati sono espressi come media  $\pm$  ES e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita, dove appropriato, da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.

## **2.6 Studio *ex-vivo*: isolamento e prelievo della porzione lombare di midollo spinale**

L'isolamento ed il prelievo delle porzione lombare di midollo spinale sono stati effettuati immediatamente dopo il sacrificio dell'animale. Nel primo set di esperimenti, è stata prelevata la porzione lombare L4-L6 considerandola come ipsilaterale in quanto prossima al sito del danno e la porzione toracica T5-T9 considerandola come porzione contro laterale. I prelievi sono stati effettuati 1, 3 e 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5. I dati ottenuti non sono risultati chiari, a causa dell'elevata variabilità, tra un esperimento e l'altro, dei livelli di espressione della proteina. Al fine di poter escludere la possibilità che eventuali variazioni dell'espressione della proteina di interesse risultassero diluite dal prelievo di una porzione ipsilaterale troppo estesa, nel successivo set di esperimenti è stata prelevata l'emisezione sinistra della porzione L4-L5 considerandola come ipsilaterale e la rispettiva emisezione destra considerandola come controlaterale. I tessuti prelevati sono stati velocemente immersi in azoto liquido, conservati alla temperatura di -80 °C e successivamente sottoposti alla metodica del western blotting al fine di studiare i livelli di espressione dell'Akt.

## **2.7 Western blotting**

I livelli delle proteine studiate sono stati analizzati quantizzandone l'espressione con la tecnica del Western Blotting, utilizzando l'elettroforesi sul gel di poliacrilammide, in condizioni denaturanti e riducenti. Per l'estrazione delle proteine totali, ogni pool, risultante dall'unione di tre campioni di midollo spinale, è stato omogeneizzato, utilizzando un potter vetro/teflon, in 90 µl di tampone di lisi freddo contenente 50 mM di Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM di NaCl, 2 mM di EDTA, 2 mM di EGTA, 1% Triton X-100, 1 nM di acido okadaico,

inibitori delle proteasi (cod. P8349, Sigma, Milano, Italia) e inibitori delle fosfatasi (cod. 524625, Calbiochem, La Jolla, USA). Il lisato tissutale è stato centrifugato per 15 minuti a 10.000 g a 4°C ed infine è stato raccolto il surnatante destinato all'analisi. La concentrazione delle proteine è stata determinata utilizzando il metodo DC per l'analisi delle proteine (Laboratori Bio-Rad, Milano, Italia) con albumina sierica bovina (BSA) usata come standard. Cinque microgrammi di proteine totali sono stati risolti attraverso elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) al 12% e successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa (Optitran BA-S 83, Schleicher & Schuell, Biosciences, Dassel, Germania). I siti aspecifici sulla membrana sono stati bloccati utilizzando latte al 5% in un tampone salino contenente Tris 10mM, (pH8), NaCl 150mM, Tween20 0.05% (TBS-T) per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente la membrana è stata incubata per una notte a 4°C con l'anticorpo primario, diretto contro la proteina d'interesse. In particolare, sono stati determinati non solo i livelli della forma fosforilata di Akt (pAkt), ma anche della Akt totale, per stabilire che eventuali cambiamenti nei livelli di pAkt non fossero dovuti a cambiamenti nell'espressione della proteina. Inoltre, al fine di confermare il caricamento di un uguale quantità di proteina in ogni pozzetto è stata effettuata l'ibridazione con un anticorpo anti-tubulina, anti-actina o anti-GAPDH. Per identificare la forma fosforilata di Akt è stato utilizzato l'anticorpo primario policlonale anti-fosfo-Akt (serina 473) prodotto nel coniglio e anti-topo alla diluizione di 1:1000 (Cell Signaling Technology). L'anticorpo è stato utilizzato in esperimenti di western blotting effettuati nel nostro laboratorio utilizzando omogenati di tessuto corticale, striatale e di retina (Russo *et al.*, 2008) nel ratto. Inoltre, sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari policlonali prodotti nel coniglio: anti-Akt alla diluizione di 1:2000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); anti gliceraldeide trifosfato deidrogenasi (GAPDH) alla diluizione di 1:4000 (Ambion). Sono stati inoltre utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali prodotti nel topo: anti-actina (clone AC-40, Sigma) alla diluizione di 1:1000; anti-tubulina (clone B-5-1-2, Sigma) alla diluizione di 1:30.000. Per la rilevazione del segnale le membrane di nitrocellulosa sono state incubate con un anticorpo secondario (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA), coniugato con perossidasi di rafano, per 1 ora a temperatura ambiente e l'attività enzimatica determinata in chemiluminescenza (ECL, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Milano,

Italia) esponendo le membrane ad una lastra fotografica. Le lastre fotografiche sono state scannerizzate e l'analisi densitometrica delle bande relative alla proteina d'interesse è stata realizzata utilizzando il Software QuantiScan (Biosoft, Cambridge, Regno Unito).

## **2.8 Trattamenti farmacologici**

L'olio essenziale (OE) di bergamotto (Consorzio del Bergamotto, Reggio Calabria), concentrato è stato somministrato sistemicamente (1 ml/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 in topi maschi C57/BL6 (20-22 g) (n=7) e successivamente una volta al giorno fino a 14 giorni dopo la chirurgia. Agli animali controllo è stato somministrato un identico volume (1 ml/Kg) di una miscela di polietilen glicole 200 (PEG) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e soluzione salina (NaCl 0.9%) (1:1). Tale schema di trattamento è stato utilizzato negli esperimenti condotti utilizzando il modello sperimentale di dolore neuropatico. Invece, per quanto riguarda gli esperimenti effettuati utilizzando il formalin test, l'OE di bergamotto è stato somministrato concentrato sia per via intraplantare (20 µl, intrapl.) (n=9) nella zampa posteriore sinistra che a livello della regione interscapolare (2 e 20 µl, s.c.) (n=7, n=10), 15 minuti prima della somministrazione della soluzione di formalina al 5 %. Il fitocomplesso è stato somministrato concentrato alla dose di 20 µl/topo. Agli animali controllo è stato somministrato un identico volume di due diversi tipi di olii di origine naturale, l'olio di oliva (20 µl, intrapl. e s.c.) (n=6, n=3) e l'olio di semi (20 µl, intrapl.) (n=4). Invece, la dose inferiore di 2 µl/topo è stata somministrata disciolta in una miscela di cremophor/etanolo/soluzione salina in rapporto 1:1:18. Pertanto, tale miscela è stata utilizzata anche come controllo (20 µl, s.c.) (n=8). Il (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stato disciolto in una miscela di polietilen glicole 200 (PEG) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e soluzione salina (NaCl 0.9%) (1:1) ed è stato somministrato (100 mg/Kg; s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 in topi maschi C57/BL6 (20-22 g) in un primo gruppo di animali (n=9) ed una volta al giorno fino a 14 giorni in un secondo gruppo di animali (n=19). Agli animali controllo (n=6 per ciascun gruppo) è stato somministrato lo stesso volume (116 µl/Kg, s.c.) di polietilen glicole 200/ soluzione salina.

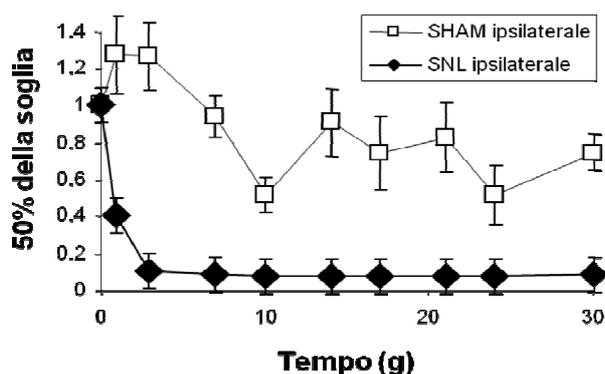
## **2.9 Analisi Statistiche**

Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  ES e le differenze sono state valutate statisticamente utilizzando il test “t” di Student o l’analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita, dove appropriato, da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.  $p < 0.05$  è stato considerato significativo. I calcoli sono stati eseguiti utilizzando GraphPad Prism.

### 3 RISULTATI

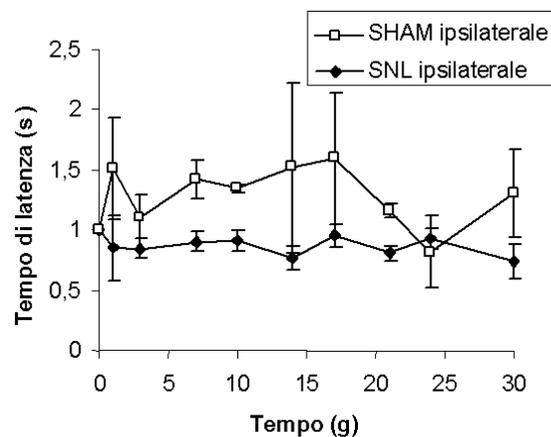
#### 3.1 La legatura del nervo spinale L5 induce allodinia meccanica, ma non determina variazioni della sensibilità termica nel topo

La legatura del nervo spinale L5 del lato sinistro induce nel topo (n=10) allodinia meccanica, a livello della zampa ipsilaterale. L'allodinia inizia a svilupparsi dopo 3 giorni e si mantiene fino a 30 giorni dopo il completamento della procedura chirurgica. Nel gruppo degli animali sottoposti alla procedura sham (n=3) non si riscontra lo sviluppo di allodinia (Fig. 3.1).



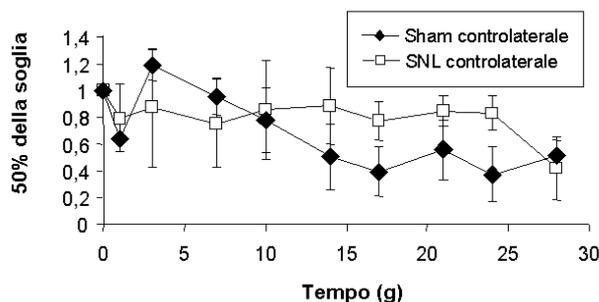
**Fig. 3.1. Time course della sensibilità meccanica della zampa ipsilaterale nel modello di dolore neuropatico da legatura del nervo spinale L5 (SNL) nel topo.** Effetti della legatura del nervo spinale L5 o della procedura sham sulla sensibilità meccanica di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=10 per il gruppo di animali neuropatici, n=3 per il gruppo di animali sottoposti a procedura sham) del 50% della soglia di dolore. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La legatura del nervo spinale L5 induce, a livello della zampa ipsilaterale al danno, una severa e persistente allodinia meccanica che è invece assente nel gruppo di animali sham.

L'allodinia meccanica corrisponde ad una drastica riduzione del valore corrispondente al 50% della soglia di dolore, che si determina mediante il test di von Frey, in seguito all'applicazione di uno stimolo di tipo meccanico. L'allodinia meccanica è una componente caratterizzante tale modello, infatti tutti gli animali sottoposti a legatura del nervo spinale sviluppano una severa riduzione del valore della soglia di dolore in seguito all'applicazione di uno stimolo meccanico. Il gruppo degli animali sham, invece, non sviluppa allodinia. Inoltre, non si riscontrano variazioni della sensibilità termica della zampa ipsilaterale (Fig. 3.2), determinata mediante test di Haregreaves' che, pertanto, in tale modello, rappresenta un importante controllo negativo.



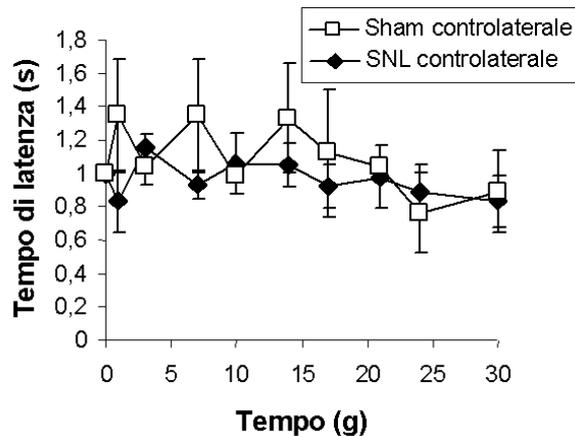
**Fig. 3.2. Time course della sensibilità termica della zampa ipsilaterale nel modello di legatura del nervo spinale L5 nel topo.** Effetti della legatura del nervo spinale L5 o della procedura sham sulla sensibilità termica di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=10 per il gruppo di animali neuropatici, n=3 per il gruppo di animali sottoposti a procedura sham) della latenza di *withdrawal* (tempo espresso in s) della zampa dalla sorgente dolorosa. I valori del tempo di latenza ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La legatura del nervo spinale L5 non determina variazioni della sensibilità termica a livello della zampa ipsilaterale dal momento che i valori del tempo di latenza sono simili a quelli del gruppo di animali sham.

Inoltre, lo sviluppo di allodinia meccanica interessa esclusivamente la zampa ipsilaterale al danno, infatti a livello della zampa controlaterale non si riscontra alcuna variazione della sensibilità meccanica (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3. Time course della sensibilità meccanica della zampa controlaterale nel modello di legatura del nervo spinale L5 nel topo.** Effetti della legatura del nervo spinale L5 o della procedura sham sulla sensibilità meccanica della zampa controlaterale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=10 per il gruppo di animali neuropatici, n=3 per il gruppo di animali sottoposti a procedura sham) del 50% della soglia di dolore. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La legatura del nervo spinale L5 non determina allodinia meccanica a livello della zampa controlaterale.

Inoltre, anche per quanto riguarda la sensibilità di tipo termico, a livello della zampa controlaterale, non si riscontrano variazioni del tempo di latenza (Fig.3.4).

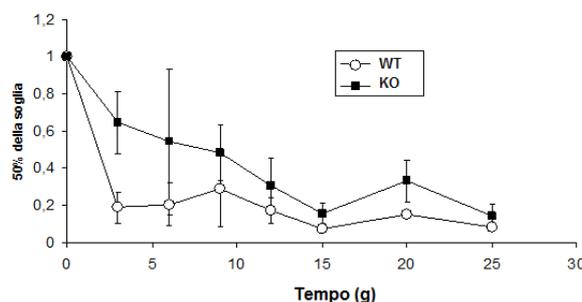


**Fig. 3.4. Time course della sensibilità termica della zampa controlaterale nel modello di legatura del nervo spinale L5 nel topo.** Effetti della legatura del nervo spinale L5 o della procedura sham sulla sensibilità termica della zampa controlaterale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=10 per il gruppo di animali neuropatici, n=3 per il gruppo di animali sottoposti a procedura sham) della latenza di *withdrawal* (tempo espresso in s) della zampa dalla sorgente dolorosa. I valori del tempo di latenza ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La legatura del nervo spinale L5 non determina variazioni della sensibilità termica a livello della zampa controlaterale dal momento che i valori del tempo di latenza sono simili a quelli del gruppo di animali sham.

I risultati ottenuti, in accordo con i dati presenti in letteratura sul modello sperimentale utilizzato, mostrano che la legatura del nervo spinale induce esclusivamente allodinia di tipo meccanico, ma non termico ed essa interessa selettivamente la zampa ipsilaterale. Inoltre, si sviluppa in tutti gli animali sottoposti alla legatura, ma non negli animali sottoposti a procedura sham. La possibilità di determinare in maniera quantitativa la variazione del 50% della soglia del dolore, mediante il test di von Frey, permette, pertanto, di utilizzare questo modello sperimentale come strumento per valutare eventuali azioni antiallodiniche di sostanze di origine naturale o sintetica che potrebbero rappresentare nuove strategie farmacologiche per il trattamento del dolore neuropatico.

### 3.2 L'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 si sviluppa normalmente in topi con delezione del gene che codifica per il canale Nav1.3

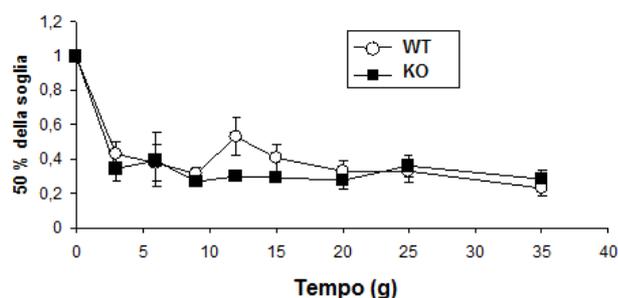
Il modello SNL è stato riprodotto in animali sottoposti a delezione genica della sequenza che codifica per il canale del sodio voltaggio-dipendente del tipo 1.3 (Nav1.3), al fine di studiare, con un approccio comportamentale, il coinvolgimento del gene di interesse nei meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico. In particolare, la legatura del nervo spinale L5 è stata indotta in 22 topi (20-30 g) *knock-out* del sottotipo nocicettore-specifico, di cui 12 *knock-out* (KO) per Nav1.3 e 10 *wild-type* (WT). Sia i tests per la determinazione della sensibilità meccanica (test di von Frey) che termica (test di Haregreaves') sono stati effettuati come descritto precedentemente per un periodo di 25 giorni post-operatori. I risultati dimostrano che la delezione genica tessuto-specifica, a livello dei gangli delle radici dorsali, del canale Nav1.3 non altera lo sviluppo ed il mantenimento dell'allodinia meccanica (fig. 3.5) suggerendo che il canale Nav1.3 espresso a livello dei DRG non ha un ruolo importante nel dolore neuropatico.



**Fig. 3.5.** *Time course* dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per Nav1.3. Effetti della delezione genica tessuto-

specifica del canale Nav1.3 sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* (KO, n= 7) in paragone a topi *wild-type* (WT, n= 5). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia del dolore e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).  $p < 0.05$  è considerato significativo. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La delezione genica tessuto-specifica, a livello dei neuroni nocicettivi, del canale Nav1.3 non determina variazioni significative dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo.

Inoltre, la delezione genica non determina variazioni della sensibilità termica (dati non mostrati). E' stato, quindi, studiato sia il coinvolgimento di quella porzione del gene di interesse che è espressa a livello dei gangli delle radici dorsali che del gene Nav1.3 nella sua totalità. Un ulteriore set sperimentale è stato condotto, sempre con lo stesso approccio, utilizzando topi in cui il gene era stato eliminato *in toto* (del tipo globale *knock-out*). La legatura del nervo spinale L5 è stata indotta in 19 topi, di cui 10 *knock-out* del tipo globale per Nav1.3 (KO) e 9 *wild-type* (WT) e successivamente gli animali sono stati sottoposti ai tests comportamentali, come nel gruppo sperimentale precedente. I dati ottenuti mostrano che anche la delezione genica globale del canale Nav1.3 non altera né lo sviluppo né il mantenimento dell'allodinia meccanica (fig. 3.6) suggerendo che il canale Nav1.3 *in toto* non esplica un ruolo chiave nel dolore neuropatico.



**Fig. 3.6. Time course dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi *knock-out* del tipo globale per Nav1.3.** Effetti della delezione genica globale del canale Nav1.3

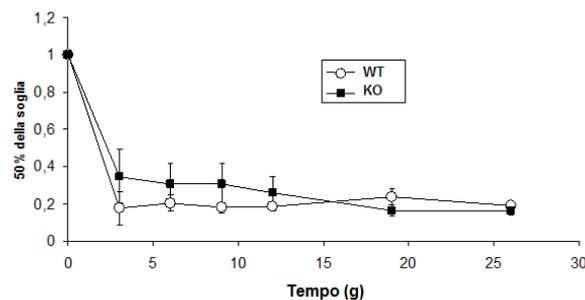
sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi *knock-out* del tipo globale (KO, n=10) utilizzando come controllo i topi *wild-type* (WT, n= 9). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia del dolore e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).  $p < 0.05$  è considerato significativo. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La delezione genica globale del canale Nav1.3 non determina variazioni significative dell'allodinia meccanica indotta da SNL nel topo.

Al fine di studiare il ruolo di Nav1.3 espresso nei neuroni sensitivi di grande diametro nel dolore neuropatico, sono stati utilizzati topi *knock-out* del sottotipo NFH-Cre (neurofilament heavy chain-Cre). Dal momento che anche con tale peculiare tipo di animali ingegnerizzati non si riscontrano variazioni (dati non mostrati) dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5, possiamo affermare che anche il canale Nav1.3 espresso nei neuroni sensitivi di grande diametro non possiede un ruolo funzionale nei meccanismi di dolore neuropatico. Inoltre, tutti i sottotipi di topi *knock-out* per il canale Nav1.3 utilizzati in tale studio non determinano variazioni (dati non mostrati) della sensibilità termica che tipicamente rimane invariata in seguito ad induzione del dolore neuropatico mediante SNL. Tuttavia, il test di Haregreaves' rappresenta un importante controllo negativo del modello e delle condizioni sperimentali.

### **3.3 La legatura del nervo spinale L5 induce allodinia anche in topi *knock-out* per i canali Nav1.7 e Nav1.8**

Dal momento che è stato riportato l'aumento di espressione del canale Nav1.7 in topi *knock-out* per Nav1.8, al fine di eliminare gli effetti di tali aumenti compensatori, è stato studiato, sempre con un approccio comportamentale, l'andamento dello sviluppo dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi sottoposti alla delezione genica

di entrambi i canali di interesse. Considerando il fatto che la delezione genica globale del canale Nav1.7 è letale non è stato possibile utilizzare topi del tipo globale *knock-out* per entrambi i geni di interesse. Pertanto, sono stati utilizzati topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per Nav1.7 e globale *knock-out* per Nav1.8. La legatura del nervo spinale L5 è stata indotta in un gruppo di 10 topi, di cui 6 *knock-out* (KO) e 4 *wild-type* (WT). I topi *knock-out* per i canali Nav1.7 e Nav1.8 sviluppano una robusta allodinia meccanica che inizia a partire dal terzo giorno post-operatorio e che non risulta significativamente diversa (Fig. 3.7) da quella sviluppata dal gruppo controllo.

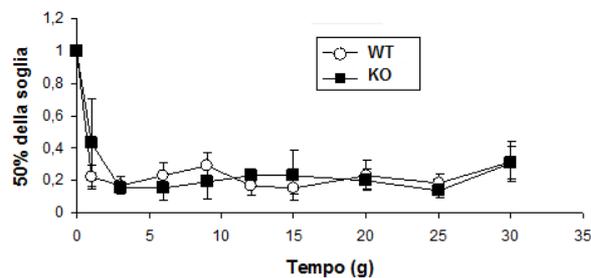


**Fig. 3.7. Time course dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi *knock-out* per Nav1.7 e Nav1.8.** Effetti della doppia delezione genica del canale Nav1.7 e Nav1.8 sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi *knock-out* (KO, n= 6) in paragone a topi *wild-type* (WT, n= 4). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia del dolore e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).  $p < 0.05$  è considerato significativo. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La doppia delezione genica del canale Nav1.7 e Nav1.8 non determina variazioni significative dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo.

Inoltre la doppia delezione genica non determina variazioni della sensibilità termica (dati non mostrati) che tipicamente rimane inalterata in seguito ad induzione del dolore neuropatico mediante SNL. Tuttavia, il test di Haregreaves' rappresenta un importante controllo negativo del modello e delle condizioni sperimentali. Tali risultati mostrano, quindi, che il dolore neuropatico si sviluppa normalmente in topi *knock-out* per i canali Nav1.7 e Nav1.8 suggerendo che la presenza di tali canali non è necessaria per lo sviluppo del dolore neuropatico.

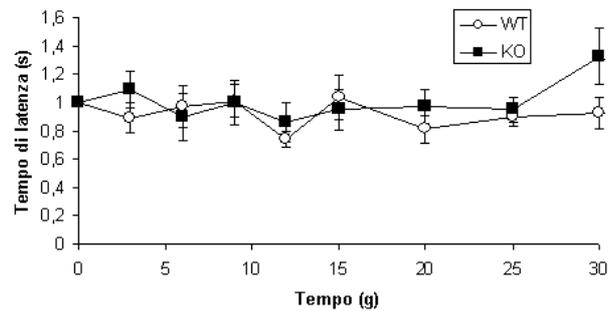
### **3.4 L'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 si sviluppa normalmente anche in topi con delezione tessuto-specifica del gene che codifica per il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF)**

Considerando l'importante ruolo che fattori neurotrofici quali l'NGF (Wada *et al.*, 2004) ed il GDNF (Boucher *et al.*, 2000) giocano nella regolazione dell'espressione dei canali del sodio, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, è stato studiato, sempre con un approccio comportamentale, l'eventuale coinvolgimento del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) nello sviluppo del dolore neuropatico. La legatura del nervo spinale L5 è stata indotta in 16 topi (25-30 g), di cui 7 del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per il BDNF e 9 *wild-type*. I tests di von Frey e Haregreaves' sono stati effettuati 1, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 giorni dopo SNL. Tutti i topi sottoposti a tale modello sperimentale mostrano livelli di allodinia meccanica del tutto simili, senza alcuna differenza tra il gruppo *knock-out* e quello *wild-type* (fig. 3.8).



**Fig. 3.8. Time course dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF).** Effetti della delezione genica tessuto-specifica del BDNF sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* (KO, n= 7) in paragone a topi *wild-type* (WT, n= 9). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia del dolore. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La delezione genica tessuto-specifica, a livello dei neuroni nocicettivi, del BDNF non determina variazioni dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo.

Inoltre tale delezione tessuto-specifica, non determina variazioni della sensibilità termica (fig. 3.9) che tipicamente rimane invariata in seguito ad induzione del dolore neuropatico mediante legatura del nervo spinale L5. Tuttavia, il test di Haregreaves' rappresenta un valido controllo negativo del modello e delle condizioni sperimentali.



**Fig. 3.9. Time course della sensibilità termica della zampa ipsilaterale in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per il fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) sottoposti a legatura del nervo spinale L5.** Effetti della delezione genica tessuto-specifica del BDNF sulla sensibilità termica di topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* (KO, n= 7) in paragone a topi *wild-type* (WT, n= 9), sottoposti a legatura del nervo spinale L5. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES della latenza di *withdrawal* (tempo espresso in s) della zampa dalla sorgente dolorosa. I valori del tempo di latenza ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. La delezione genica tessuto-specifica, a livello dei neuroni nocicettivi, del BDNF non determina variazioni della sensibilità termica a livello della zampa ipsilaterale dal momento che i valori del tempo di latenza del gruppo *knock-out* sono simili a quelli del gruppo *wild-type*.

I risultati ottenuti dimostrano, quindi, che il BDNF rilasciato dai neuroni sensitivi non è un importante mediatore del dolore neuropatico.

### **3.5 La legatura del nervo spinale L5 non determina variazioni dei livelli di Akt 1, 3 e 7 giorni dopo la lesione**

Oltre a studiare il ruolo del fattore neurotrofico BDNF nello sviluppo del dolore neuropatico, abbiamo voluto studiare anche l'eventuale coinvolgimento di una chinasi attivata dalla neurotrofina (Cheng *et al.*, 2003) e che sembra essere coinvolta nei

meccanismi di sviluppo del dolore sia infiammatorio (Zhuang *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006) che neuropatico (Xu *et al.*, 2007): la serina/treonina protein chinasi B o Akt (PKB/Akt). Al fine di determinare eventuali variazioni dei livelli di Akt nella porzione lombare del midollo spinale in seguito alla legatura del nervo spinale L5, è stata utilizzata la metodica del Western Blotting. Nel primo set di esperimenti, condotti utilizzando la porzione L4-L6 del midollo spinale (L) di topi neuropatici o sham considerandola ipsilaterale, e la rispettiva porzione toracica T5-T9 (T), considerandola come controlaterale, si ottengono risultati molto variabili tra un esperimento e l'altro. Sebbene nei singoli esperimenti a volte si riscontrino delle variazioni dei livelli di Akt (fig. 3.10.a) in seguito ad analisi densitometrica dei tre esperimenti indipendenti si verifica che i livelli di pAkt e Akt totale non variano in maniera significativa (fig. 3.10.b) nella porzione lombare rispetto alla porzione toracica 1, 3 e 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5 nel topo. Tuttavia, è riscontrabile una tendenza all'aumento di pAkt (fig. 3.10.b) nella porzione lombare degli animali neuropatici rispetto alla porzione toracica sia a 3 che a 7 giorni.

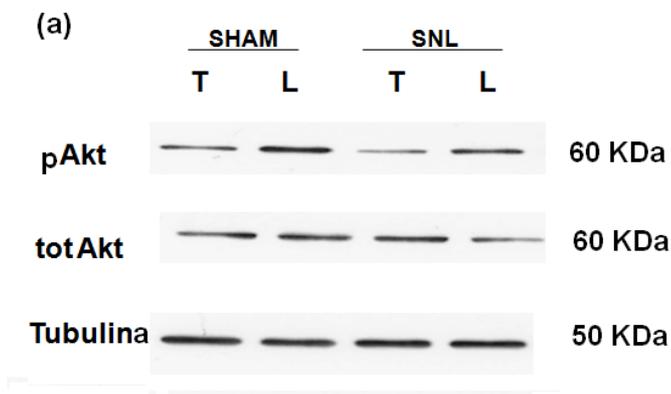


Figura 3.10.a. Western Blotting rappresentativo degli effetti della legatura del nervo spinale L5 sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale effettuati utilizzando omogenati della porzione L4-L6 (L= lombare) e della porzione T5-T9 (T= toracica) di midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6 sacrificati 3 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5 (SNL) o la procedura sham. Ogni campione di omogenato si ottiene da un pool di 3 animali. Seppure in tale esperimento sia riscontrabile una tendenza all'aumento dei livelli di pAkt nella porzione lombare (L) rispetto alla toracica (T) sia negli animali sham che

SNL, in seguito all'analisi densitometrica dei tre esperimenti indipendenti (fig. 3.11.b) nessuna variazione raggiunge livelli di significatività.

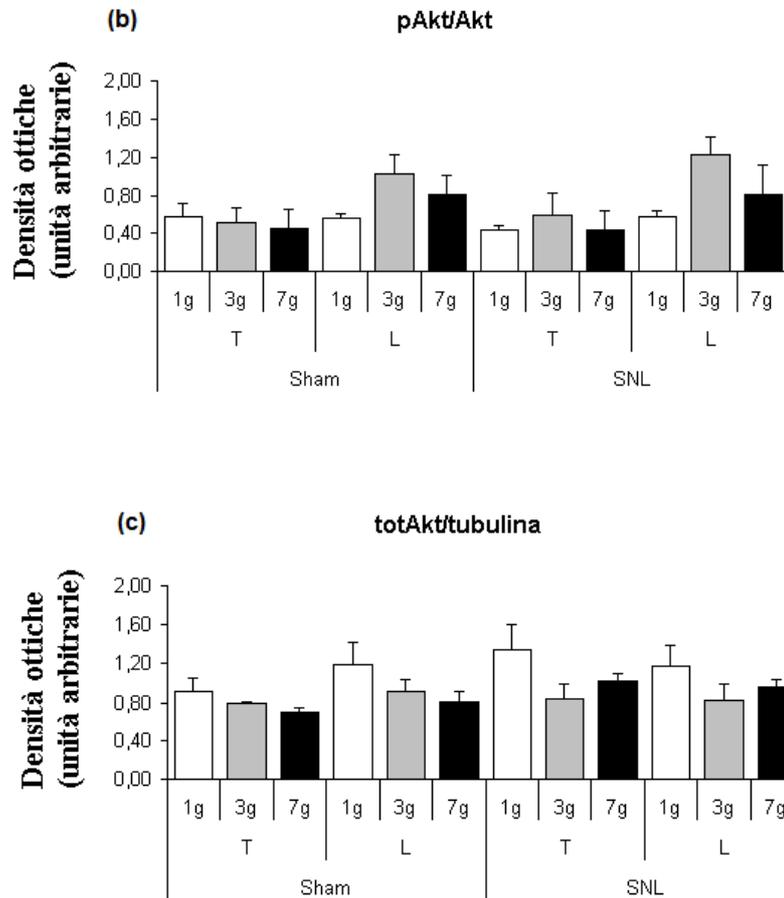


Figura 3.10.b. e c. Gli istogrammi mostrano i risultati dell'analisi densitometrica delle bande autoradiografiche dei Western Blotting effettuati per determinare quantitativamente gli effetti della legatura del nervo spinale L5 sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale. Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando omogenati della porzione L4-L6 (L= lombare) e della porzione T5-T9 (T= toracica) di midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6 sacrificati 1, 3 e 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5 (SNL) o la procedura sham. I dati sono normalizzati al segnale densitometrico della tubulina ed espressi come media  $\pm$  ES dei valori di densità ottica relativa, espressi in unità arbitrarie, di tre esperimenti indipendenti. La legatura del nervo spinale L5 non induce variazioni significative dei livelli di pAkt e Akt totale, né tra gli animali neuropatici e quelli sham, né tra il tratto lombare e quello toracico, 1, 3 e 7 giorni dopo SNL.

Al fine di escludere un eventuale effetto di diluizione delle variazioni dei livelli di Akt, probabilmente dovuto al prelievo dell'intera porzione L4-L6, di seguito si riportano i risultati di esperimenti condotti impiegando omogenati ottenuti da emisezioni di tessuto spinale della porzione L4-L5 ipsilaterale e controlaterale alla legatura del nervo spinale L5. Inoltre, si studiano i livelli di Akt solo 7 giorni dopo la lesione, tempo in cui l'allodinia meccanica si sviluppa pienamente. Tuttavia, anche in tale set di esperimenti non si riscontrano differenze significative né tra gli animali neuropatici rispetto agli animali sham né tra le rispettive porzioni ipsilaterali rispetto alle controlaterali (fig. 3.11.b), sebbene i risultati ottenuti risultino più omogenei.

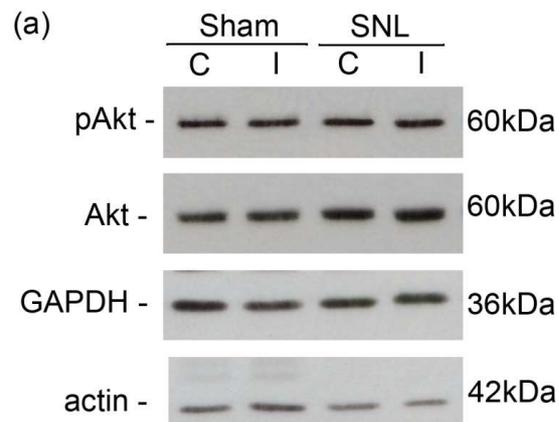


Figura 3.11.a. Western Blotting rappresentativo degli effetti della legatura del nervo spinale L5 sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale effettuati utilizzando omogenati delle emisezioni ipsilaterali (I) e controlaterali (C) della porzione lombare L4-L5 del midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6 sacrificati 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5 (SNL) o la procedura sham. Ogni campione di omogenato si ottiene da un pool di 3 animali. Il western mostrato è rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti. Non si riscontra nessuna variazione significativa dei livelli di pAkt e Akt totale, né tra gli animali neuropatici e quelli sham, né tra il tratto lombare e quello toracico, 7 giorni dopo SNL.

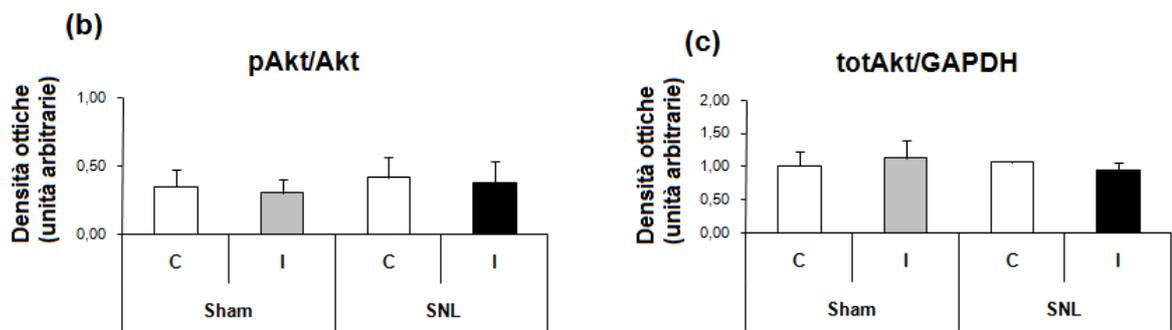
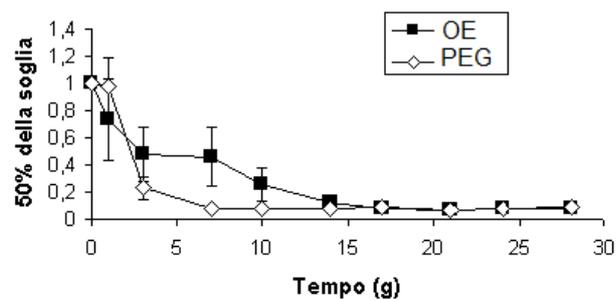


Figura 3.11.b. e c. Gli istogrammi mostrano i risultati delle analisi densitometriche delle bande autoradiografiche dei Western Blotting effettuati per determinare quantitativamente gli effetti della legatura del nervo spinale L5 sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale. Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando omogenati delle emisezioni ipsilaterali (I) e controlaterali (C) della porzione lombare L4-L5 del midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6 sacrificati 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5 (SNL) o la procedura sham. I dati sono normalizzati al segnale densitometrico di GAPDH ed espressi come media  $\pm$  ES dei valori di densità ottica relativa, espressi in unità arbitrarie, di tre esperimenti indipendenti. La legatura del nervo spinale L5 non induce variazioni significative dei livelli di pAkt e Akt totale 7 giorni dopo SNL.

### 3.6 Effetti della somministrazione subcronica di olio essenziale (OE) di bergamotto sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo

Considerando la capacità di diverse sostanze di origine naturale di alleviare il dolore (Chrubasik *et al.*, 2007; Agosti *et al.*, 2006) ed in particolare quello di tipo neuropatico (Bortalanza *et al.*, 2002; Rog *et al.*, 2005), è stato ritenuto interessante caratterizzare il profilo farmacologico di una sostanza di origine naturale. In particolare, dal momento che l'olio essenziale (OE) di bergamotto risulta in grado di interferire con i meccanismi fondamentali alla base della comunicazione sinaptica e di conferire neuroprotezione in sistemi *in vitro* (Corasaniti *et al.*, 2007) ed *in vivo* (Morrone *et al.*, 2007), è stata studiata la

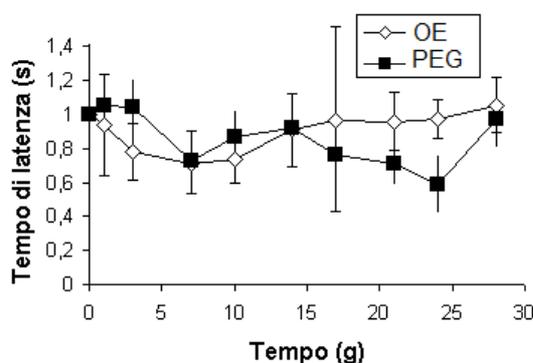
capacità dell'OE di bergamotto di modulare la plasticità sinaptica alla base dello sviluppo del dolore neuropatico. Pertanto, sono stati valutati gli effetti del trattamento subcronico con OE di bergamotto sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo. Tale studio mostra che il trattamento con il fitocomplesso (1 ml/Kg; s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale ed una volta al giorno per 14 giorni non determina una riduzione significativa dell'allodinia meccanica. Tuttavia, nel gruppo di animali trattati con OE di bergamotto (n=7) si riscontra una tendenza della curva verso la riduzione a 7 e 10 giorni dalla SNL (fig. 3.12) rispetto al gruppo di animali (n=6) trattati con un identico volume di una miscela di polietilenglicole 200 e soluzione salina (0.9 % di NaCl) in rapporto 1:1.



**Fig. 3.12. Time course dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi trattati subcronicamente con olio essenziale (OE) di bergamotto.** Effetti del trattamento subcronico con olio essenziale (OE) di bergamotto (Consorzio del Bergamotto, Reggio Calabria) (1 ml/Kg; s.c.), 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno per 14 giorni, sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. Il gruppo degli animali controllo è stato trattato con un identico volume (1 ml/Kg; s.c.) di una miscela di polietilenglicole 200 (PEG) e soluzione salina (0.9 % di NaCl) in rapporto 1:1. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=7 per il gruppo di animali trattati con OE, n=6 per il gruppo di animali trattati con PEG) del 50% della soglia del dolore e le differenze valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.  $p < 0.05$  è considerato significativo. I calcoli sono eseguiti utilizzando GraphPad Prism. I valori ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. Il trattamento subcronico con OE di bergamotto non determina una riduzione significativa dell'allodinia

meccanica, sebbene si riscontri una tendenza della curva verso la riduzione 7 e 10 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5.

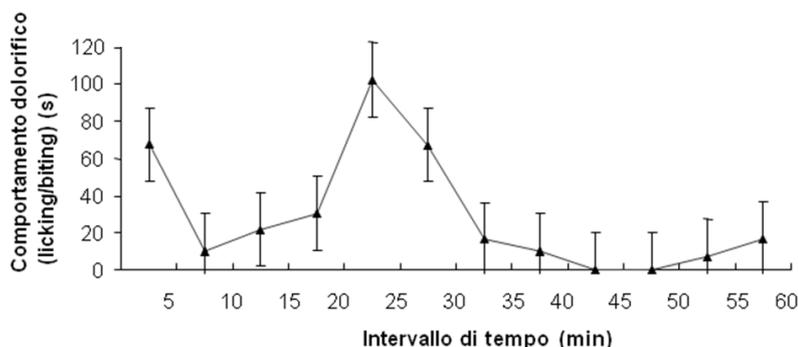
Inoltre, in accordo con il modello sperimentale utilizzato e con i risultati precedentemente mostrati, anche il trattamento subcronico con OE di bergamotto non determina variazioni della sensibilità termica (fig. 3.13); tuttavia, il test di Haregreaves' rappresenta un importante controllo negativo delle condizioni sperimentali.



**Fig. 3.13. Time course della sensibilità termica in topi neuropatici trattati subcronicamente con olio essenziale (OE) di bergamotto.** Effetti del trattamento subcronico con olio essenziale (OE) di bergamotto (1 ml/Kg; s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno per 14 giorni, sulla sensibilità termica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. Il gruppo degli animali controllo è stato trattato con un identico volume (1 ml/Kg; s.c.) di una miscela di polietilenglicole 200 (PEG) e soluzione salina (0.9 % di NaCl) in rapporto 1:1. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=7 per il gruppo di animali trattati con OE, n=6 per il gruppo di animali trattati con PEG) della latenza di *withdrawal* (tempo espresso in s) della zampa dalla sorgente dolorosa. I valori ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. Il trattamento subcronico con OE di bergamotto non determina variazioni della sensibilità termica in topi sottoposti alla legatura del nervo spinale L5.

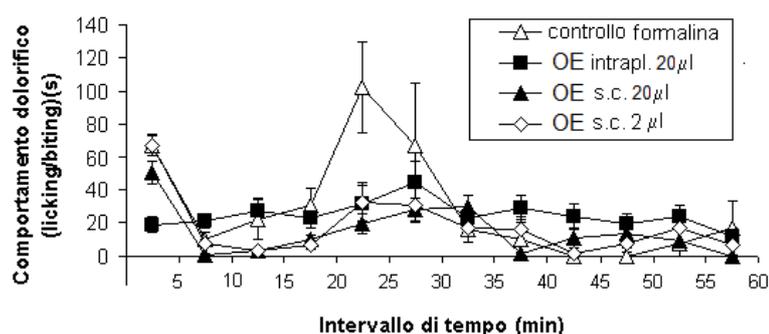
### 3.7 Il pretrattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto determina una riduzione del comportamento dolorifico indotto dalla formalina

Dal momento che il trattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto determina una tendenza alla riduzione, seppure senza raggiungere livelli di significatività, dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo, al fine di completare il profilo antinocicettivo del fitocomplesso sono stati studiati gli effetti del pretrattamento con OE in un modello di dolore infiammatorio ampiamente conosciuto: il *formalin test*. Pertanto, prima di procedere con tale studio, è stato condotto un esperimento controllo al fine di verificare che le condizioni sperimentali utilizzate fossero ottimali. Diversi parametri, come per esempio la temperatura, possono alterare la risposta dolorifica indotta dalla formalina. Tuttavia, nelle condizioni sperimentali utilizzate e soprattutto alla temperatura di 24 °C si ottiene l'andamento bifasico classicamente riportato in letteratura (fig.3.14).



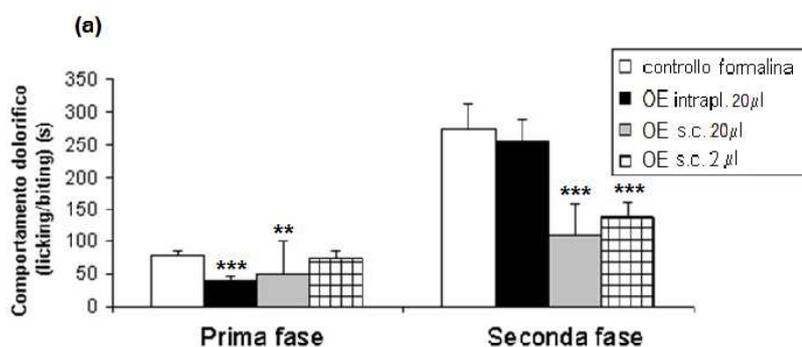
**Fig. 3.14. Formalin test.** *Time course* del comportamento dolorifico (licking/biting) indotto dalla somministrazione intraplantare di una soluzione di formalina al 5 % (20 µl/topo) nella zampa sinistra di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. I dati sono espressi come media  $\pm$  ES (n=3) del tempo di comportamento di *licking/biting* (espresso in s). I valori sono ottenuti sommando il tempo in cui ciascun animale manifesta il tipico comportamento dolorifico di *licking/biting*, per ogni intervallo di tempo di 5 minuti, a partire dalla somministrazione di formalina per 60 minuti. In accordo con i dati riportati in letteratura, la somministrazione intraplantare di formalina induce il comportamento di *licking/biting* con il tipico andamento bifasico.

Dopo aver standardizzato le condizioni sperimentali, è stato studiato l'effetto del pretrattamento con OE di bergamotto (20µl/topo), somministrato sia per via intraplantare (n=9) che a livello della regione interscapolare (n=10) sul *formalin test*. Come controllo sono stati utilizzati l'olio di semi (n=4), l'olio di oliva (n=3) ed il cremophor (n=8). Inoltre, è stato valutato l'effetto di una dose inferiore di OE di bergamotto (2 µl/topo) (n=7), somministrata sempre a livello della regione interscapolare. I dati ottenuti mostrano che il fitocomplesso interferisce con entrambe le fasi del comportamento nocicettivo indotto da formalina, ma in maniera diversa a seconda della dose e della via di somministrazione utilizzate. Infatti, il fitocomplesso somministrato per via intraplantare alla dose di 20 µl/topo (s.c.) determina una significativa riduzione della prima fase (\*\*\*) del comportamento nocicettivo indotto da formalina, mentre non determina variazioni nella seconda fase (fig. 3.15 e 3.16.a). Quando somministrato a livello della regione interscapolare alla stessa dose l'OE determina una significativa riduzione sia della prima (\*\* = p< 0.01 vs formalina) che della seconda (\*\*\*) fase del formalin test (fig. 3.15 e 3.16a). E' interessante notare come la somministrazione per la stessa via della dose inferiore (2 µl/topo) di OE utilizzata determina una significativa riduzione (\*\*\*) della seconda fase del comportamento di *licking/biting* ma non esercita effetti antinocicettivi sulla prima fase del test.



**Fig. 3.15. Effetti del trattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto sul comportamento dolorifico bifasico del formalin test.** Effetti del pretrattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto (Consorzio del Bergamotto, Reggio Calabria) 15 minuti prima della somministrazione intraplantare di una

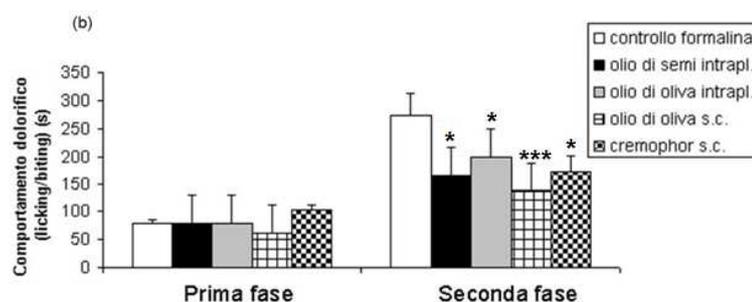
soluzione di formalina al 5 % (20 µl/topo) nella zampa sinistra di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6, sul comportamento dolorifico (*licking/biting*) bifasico indotto dalla formalina. Il fitocomplesso è stato somministrato per via intraplantare (n=9) alla dose di 20 µl/topo oppure a livello della regione interscapolare sia alla dose di 20 µl/topo (n=10) che alla dose inferiore di 2 µl/topo (n=7). Come controlli sono stati utilizzati l'olio di semi (n=4), l'olio di oliva (n=3) ed il cremophor (n=8). Tuttavia, i dati relativi ai controlli sono riportati solo in forma di istogramma nella figura 3.16.b. I dati sono espressi come media ± ES del tempo di comportamento di *licking/biting* (espresso in s). I valori sono ottenuti sommando il tempo in cui ciascun animale manifesta il tipico comportamento dolorifico di *licking/biting*, per ogni intervallo di tempo di 5 minuti, a partire dalla somministrazione di formalina per 60 minuti. Le differenze statistiche sono riportate nella figura 3.16.a e .b in cui i risultati, rappresentati sotto forma di istogramma, risultano più chiari.



**Fig. 3.16.a. Istogramma rappresentativo degli effetti del trattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto sulla prima e sulla seconda fase del comportamento nocicettivo di *licking/biting* indotto dalla formalina.** Istogramma rappresentativo degli effetti del pretrattamento con olio essenziale (OE) di bergamotto (Consorzio del Bergamotto, Reggio Calabria) 15 minuti prima della somministrazione intraplantare di una soluzione di formalina al 5 % (20 µl/topo) nella zampa sinistra di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6, sulle due fasi del comportamento dolorifico (*licking/biting*) indotto dalla formalina. Il fitocomplesso è stato somministrato per via intraplantare (n=9) alla dose di 20 µl/topo oppure a livello della regione interscapolare (s.c.) sia alla dose di 20 µl/topo (n=10) che alla dose inferiore di 2 µl/topo (n=7). I dati sono espressi come media ± ES del tempo di comportamento di *licking/biting* (espresso in s). I valori sono ottenuti sommando il tempo in cui ciascun animale manifesta il tipico comportamento dolorifico di *licking/biting* durante i 10 minuti (prima fase) successivi alla somministrazione di formalina e per i successivi 50 minuti (seconda fase). Le differenze sono valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.  $p < 0.05$  è considerato significativo. I calcoli sono eseguiti utilizzando GraphPad Prism. \*\* =  $p < 0.01$  vs formalina, \*\*\* =  $p < 0.001$  vs

formalina. L'OE di bergamotto interferisce con entrambe le fasi del formalin test, ma in maniera diversa a seconda della dose e della via di somministrazione utilizzata.

Tuttavia, tutti i controlli utilizzati (olio di semi, olio di oliva e cremophor) determinano una significativa riduzione (\* =  $p < 0.05$  vs formalina, \*\*\* =  $p < 0.001$  vs formalina) della seconda, ma non della prima fase del formalin test (fig. 3.16.b). Inoltre, l'olio di oliva somministrato a livello della regione interscapolare (s.c.) determina una riduzione ancora più marcata (\*\*\*) della seconda fase.

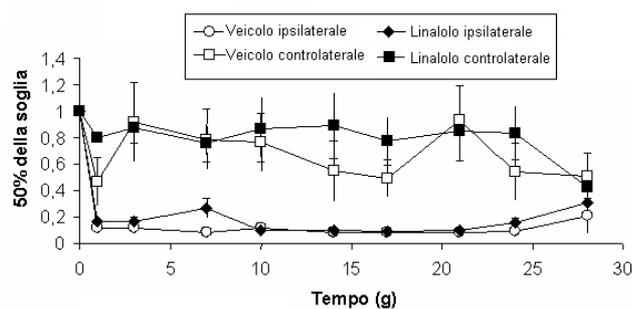


**Fig. 3.16.b. Istogramma rappresentativo degli effetti del trattamento con i controlli sulla prima e sulla seconda fase del comportamento nocicettivo di *licking/biting* indotto dalla formalina.**

Istogramma rappresentativo degli effetti del pretrattamento con i controlli utilizzati (olio di semi, olio di oliva e cremophor) (20  $\mu$ l/topo) 15 minuti prima della somministrazione intraplantare di una soluzione di formalina al 5 % (20  $\mu$ l/topo) nella zampa sinistra di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6, sulle due fasi del comportamento dolorifico (*licking/biting*) indotto dalla formalina. L'olio di semi (n=4) è stato somministrato per via intraplantare, il cremophor (n=8) a livello della regione interscapolare (s.c.) e l'olio di oliva per entrambe le vie di somministrazione (n=3 per ciascun gruppo). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del tempo di comportamento di *licking/biting* (espresso in s). I valori sono ottenuti sommando il tempo in cui ciascun animale manifesta il tipico comportamento dolorifico di *licking/biting* durante i 10 minuti (prima fase) successivi alla somministrazione di formalina e per i successivi 50 minuti (seconda fase). Le differenze sono valutate statisticamente utilizzando l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita da un test per comparazioni multiple come il test di Tukey.  $p < 0.05$  è considerato significativo. I calcoli sono eseguiti utilizzando GraphPad Prism. \* =  $p < 0.05$  vs formalina, \*\*\* =  $p < 0.001$  vs formalina. I controlli interferiscono con la seconda fase del formalin test.

### 3.8 La somministrazione subcronica, ma non acuta, di (-)-linalolo attenua l'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo

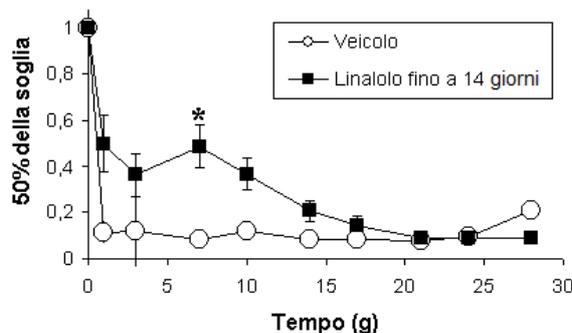
I dati precedentemente ottenuti mostrano che l'OE di bergamotto interferisce con entrambe le fasi del comportamento nocicettivo indotto da formalina, ma non determina variazioni significative dell'allodinia meccanica indotta da SNL. Il linalolo, monoterpene presente in elevate quantità (8-16 %) nella frazione volatile dell'olio essenziale di bergamotto, possiede proprietà antiinfiammatorie (Peana *et al.*, 2002) e antinocicettive che sono state studiate utilizzando diversi modelli di dolore infiammatorio (Peana *et al.*, 2003; Peana *et al.*, 2004a) quale per esempio il formalin test (Peana *et al.*, 2004b). Tuttavia, gli effetti del trattamento con linalolo non erano stati studiati in nessun modello di dolore neuropatico. Pertanto, sono stati studiati gli effetti della somministrazione acuta e subcronica di linalolo sullo sviluppo dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5. In accordo con il modello sperimentale, tutti gli animali trattati con il veicolo (n=5) sviluppano pienamente l'allodinia meccanica 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5 ed essa si mantiene fino a 28 giorni, ultimo giorno in cui si effettuano gli studi comportamentali. La somministrazione acuta di linalolo (n=10), 1 ora prima della legatura del nervo spinale, non determina la riduzione dell'allodinia meccanica, sebbene sia riscontrabile una tendenza della curva verso l'attenuazione (fig. 3.17) a 7 giorni dalla lesione.



**Fig. 3.17. Time course dell'allodinia meccanica in topi neuropatici trattati acutamente con (-)-linalolo.** Effetti del trattamento acuto con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 (n=9), sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. Il gruppo degli animali controllo (n= 6) è stato trattato con un

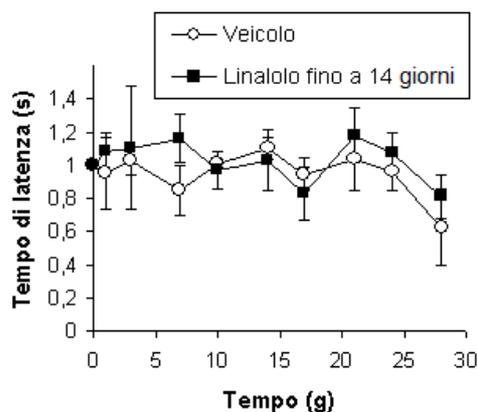
identico volume di veicolo (miscela di polietilenglicole 200 e soluzione salina in rapporto 1:1). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia di dolore. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. Il trattamento acuto con linalolo non determina una riduzione significativa dell'allodinia meccanica sebbene una tendenza della curva verso la riduzione sia riscontrabile a 7 giorni dalla lesione.

In maniera interessante, la somministrazione subcronica di (-)-linalolo (100 mg/Kg; s.c.) determina, invece, una riduzione significativa dell'allodinia meccanica. In particolare, la riduzione si osserva a 3, 7 (\*=  $p < 0.05$  vs veicolo; test "t" di Student) e 10 giorni nel gruppo di topi trattati con una singola dose giornaliera di linalolo fino a 14 giorni (n=19) (fig. 3.18).



**Fig. 3.18. Time course dell'allodinia meccanica in topi neuropatici trattati subcronicamente con (-)-linalolo.** Effetti del trattamento subcronico con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno fino a 14 giorni (n=19), sull'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. Il gruppo degli animali controllo è stato trattato con un identico volume (1 ml/Kg; s.c.) di veicolo (n= 5) (miscela di polietilenglicole 200 e soluzione salina in rapporto 1:1). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia di dolore e le differenze valutate statisticamente utilizzando il test "t" di Student. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale.  $p < 0.05$  è considerato significativo. I calcoli sono eseguiti utilizzando GraphPad Prism. \*=  $p < 0.05$  vs veicolo nel gruppo di topi trattati con linalolo fino a 14 giorni. In accordo con il modello sperimentale, tutti gli animali trattati con veicolo sviluppano pienamente l'allodinia meccanica 7 giorni dopo l'SNL ed essa si mantiene fino a 28 giorni. Il trattamento subcronico con linalolo invece determina una riduzione dell'allodinia meccanica che si osserva a partire da 3 giorni e raggiunge livelli di significatività a 7 giorni (\*=  $p < 0.05$  vs veicolo).

Inoltre, in accordo con il modello sperimentale utilizzato e con i risultati precedentemente mostrati, sia la somministrazione acuta (dati non mostrati) che subcronica di linalolo, non determina alcun cambiamento (fig.3.19) della sensibilità termica, che tipicamente rimane inalterata in seguito ad induzione del dolore neuropatico mediante SNL.



**Fig. 3.19. Time course della sensibilità termica in topi neuropatici trattati subcronicamente con (-)-linalolo.** Effetti del trattamento subcronico con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno fino a 14 giorni (n=19), sulla sensibilità termica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6. Il gruppo degli animali controllo (n= 5) è stato trattato con un identico volume di veicolo (miscela di polietilenglicole 200 e soluzione salina in rapporto 1:1). I dati sono espressi come media  $\pm$  ES del 50% della soglia di dolore. I valori del 50% della soglia del dolore ottenuti nei giorni successivi alla chirurgia sono normalizzati ad 1 considerando unitario il valore basale misurato in ciascun animale. Il trattamento subcronico con linalolo non determina variazioni della sensibilità termica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo.

### 3.9 Il trattamento subcronico con (-)- linalolo non determina variazioni dei livelli di Akt 1, 3 e 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono un ruolo chiave per l'attivazione della serina/treonina protein chinasi B (Akt) nei meccanismi di sviluppo sia del dolore

infiammatorio (Zhuang *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006) che neuropatico (Xu *et al.*, 2007; Guedes *et al.*, 2008). Tuttavia, la via di trasduzione mediata da Akt è stata studiata solo marginalmente nella fase di induzione dell'allodinia meccanica in cui il linalolo esplica la sua azione antinocicettiva. Di seguito vengono riportati i livelli di pAkt e Akt totale, determinati mediante la metodica del western blotting 1, 3 o 7 giorni dopo SNL in animali trattati con (-)-linalolo (100 mg/Kg; s.c.) o con veicolo (PEG200-soluzione salina in rapporto 1:1) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno fino ad 1 ora prima del prelievo. Sebbene nei singoli esperimenti a volte si riscontrino delle variazioni dei livelli di Akt (fig. 3.20.a), in seguito all'analisi densitometrica dei tre esperimenti indipendenti si verifica che i livelli di pAkt e Akt totale non variano in maniera significativa (fig. 3.20.b e c), nella porzione lombare rispetto alla toracica in seguito a trattamento con linalolo a tutti i tempi studiati. Tuttavia, è riscontrabile una tendenza all'aumento di pAkt (fig. 3.20.b) nella porzione lombare degli animali neuropatici trattati con linalolo rispetto alla porzione toracica sia a 3 che a 7 giorni, ma un simile andamento si verifica anche nel gruppo di animali trattati con veicolo.

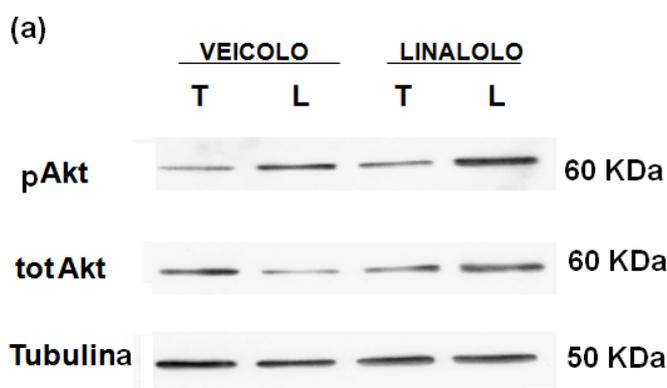


Figura 3.20.a. Western Blotting rappresentativo degli effetti del trattamento con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno per 3 giorni sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale. Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando omogenati della porzione L4-L6 (L= lombare) e della porzione T5-T9 (T= toracica) di midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL 6, trattati con linalolo o veicolo e sacrificati 3 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5. Ogni campione di omogenato si ottiene da un pool di 3 animali. In tale esperimento è

riscontrabile una tendenza all'aumento dei livelli di pAkt nella porzione lombare (L) rispetto alla toracica (T), sia negli animali trattati con linalolo che con veicolo, tuttavia in seguito all'analisi densitometrica dei tre esperimenti indipendenti (fig. 3.20.b e c) nessuna variazione raggiunge livelli di significatività.

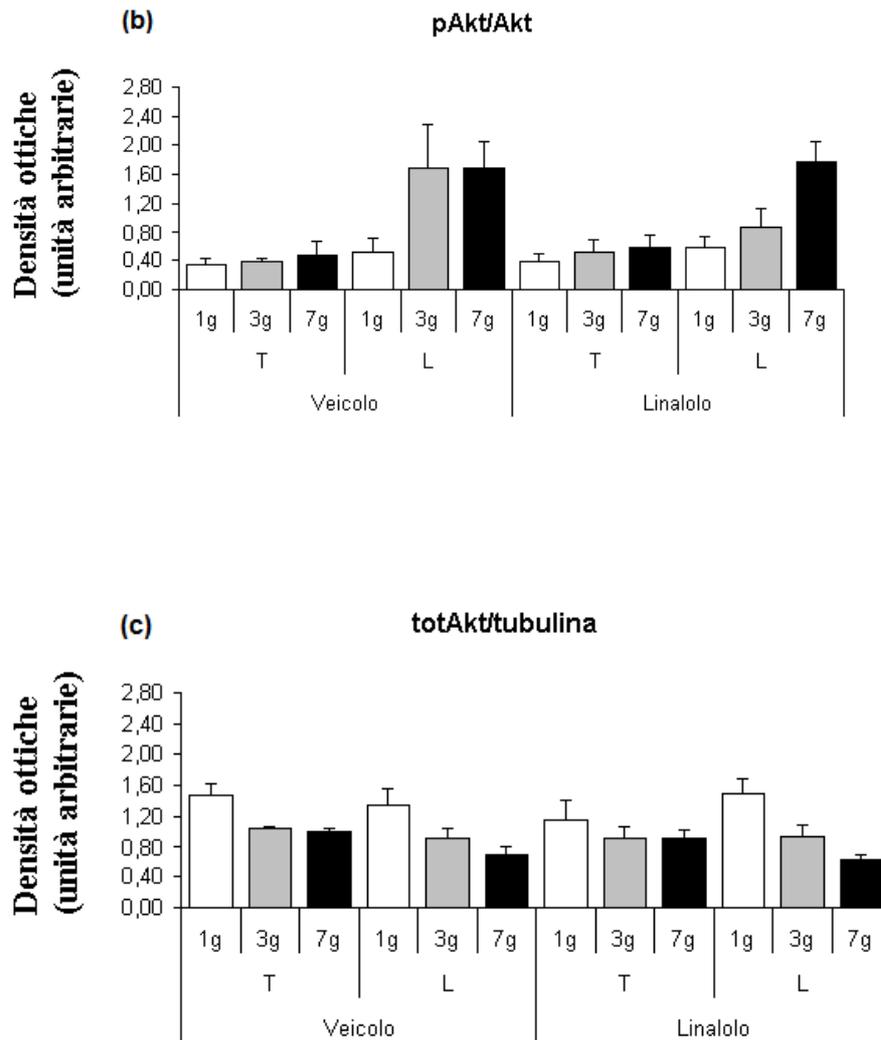


Figura 3.20. b. e c. Gli istogrammi mostrano i risultati delle analisi densitometriche delle bande autoradiografiche dei Western Blotting effettuati per determinare quantitativamente gli effetti del trattamento con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno fino ad 1 ora prima del prelievo, sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale. Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando omogenati della porzione L4-L6 (L= lombare) e della

porzione T5-T9 (T= toracica) di midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL 6, trattati con linalolo o veicolo e sacrificati 1, 3 e 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5. I dati sono normalizzati al segnale densitometrico della tubulina ed espressi come media  $\pm$  ES dei valori di densità ottica relativa, espressi in unità arbitrarie, di tre esperimenti indipendenti. Non si riscontra nessuna variazione significativa dei livelli di pAkt e Akt totale, né tra gli animali trattati con linalolo e quelli trattati con veicolo, né tra il tratto lombare e toracico, 1, 3 e 7 giorni dopo SNL.

È possibile che la strategia utilizzata di considerare la porzione lombare L4-L6 (L) come ipsilaterale e la porzione toracica T5-T9 (T) del midollo spinale come controlaterale determini un effetto di diluizione delle variazioni dei livelli di Akt. Pertanto, si effettua un secondo set sperimentale utilizzando l'emisezione sinistra della porzione L4-L5 (I=ipsilaterale) del midollo spinale e la rispettiva emisezione destra (C=controlaterale) e studiando gli effetti del trattamento subcronico con (-)-linalolo (100 mg/Kg; s.c.) o veicolo (PEG200-soluzione salina in rapporto 1:1) sui livelli di Akt 7 giorni dopo la lesione, tempo in cui l'allodinia meccanica si sviluppa pienamente. Tuttavia, anche in tale set di esperimenti non si riscontrano differenze significative né tra gli animali neuropatici trattati con linalolo rispetto a quelli trattati con veicolo, né tra le rispettive porzioni ipsilaterali rispetto alle controlaterali (fig. 3.21.b), sebbene i risultati ottenuti risultino più omogenei.

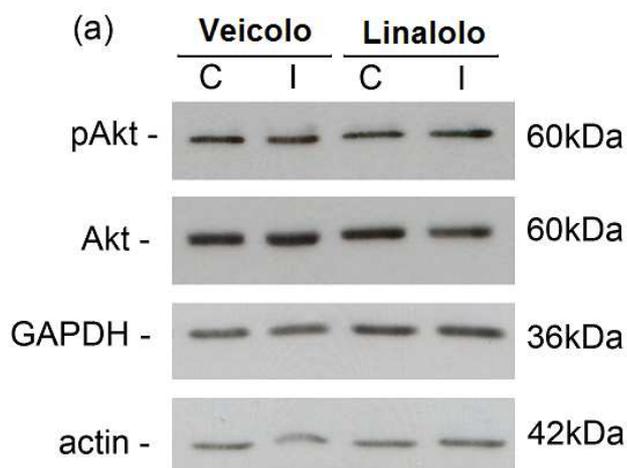


Figura 3.21.a. Western Blotting rappresentativo degli effetti del trattamento con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno per 7 giorni sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale. Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando omogenati delle emisezioni ipsilaterali (I) e controlaterali (C) della porzione lombare L4-L5 del midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL6, trattati con linalolo o veicolo e sacrificati 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5. Ogni campione di omogenato si ottiene da un pool di 3 animali. Il trattamento con linalolo non determina nessuna variazione dei livelli di pAkt e Akt totale.

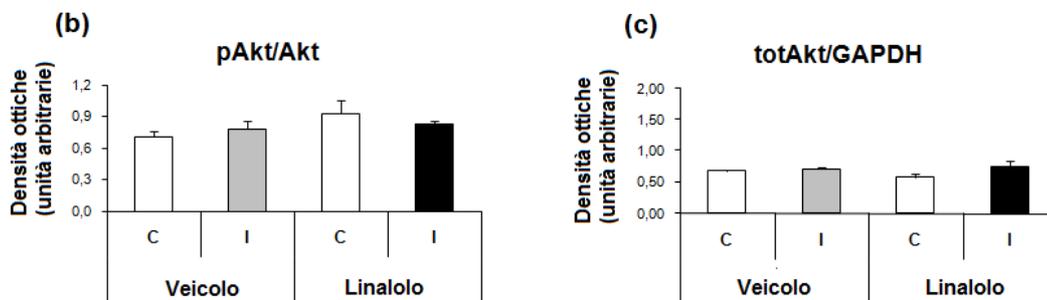


Figura 3.21.b e c. Gli istogrammi mostrano i risultati delle analisi densitometriche delle bande autoradiografiche dei Western Blotting effettuati per determinare quantitativamente gli effetti del trattamento con (-)-linalolo (Sigma-Aldrich, Italia) (100 mg/Kg, s.c.) 1 ora prima della legatura del nervo spinale L5 ed una volta al giorno per 7 giorni, sui livelli di espressione della pAkt (Ser 473) e Akt totale. Tali esperimenti sono stati effettuati utilizzando omogenati delle emisezioni ipsilaterali (I) e controlaterali (C) della porzione lombare L4-L5 del midollo spinale di topi maschi (20-22 g) del ceppo C57/BL 6, trattati con linalolo o con veicolo, sacrificati 7 giorni dopo la legatura del nervo spinale L5. Gli istogrammi derivano dalla media di tre esperimenti indipendenti. I dati sono normalizzati al segnale densitometrico di GAPDH ed espressi come media  $\pm$  S.E.M. dei valori di densità ottica relativa, espressi in unità arbitrarie, di tre esperimenti indipendenti. Il trattamento subcronico con linalolo non determina variazioni significative dei livelli di pAkt e Akt totale 7 giorni dopo SNL.

## 4 DISCUSSIONE

I dati ottenuti hanno permesso di investigare i meccanismi fisiopatologici alla base del dolore neuropatico valutando, con un approccio comportamentale, il coinvolgimento di alcuni sottotipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti (VGSCs) e del fattore neurotrofico BDNF nello sviluppo dell'allodinia indotta da SNL. Non essendo disponibili bloccanti specifici di tali canali, sono stati utilizzati topi sottoposti a delezione genica del tipo globale, tessuto-specifica o tempo-specifica al fine di analizzare la funzione del gene target nella conduzione dolorifica.

Tra le diverse tecniche genetico-molecolari, la delezione genica è molto apprezzata in quanto fedelmente riproducibile a differenza per esempio della tecnica del *knock-down* che determina solo una parziale riduzione dell'espressione genica. Inoltre, la delezione tessuto-specifica a livello dei neuroni nocicettivi (Le & Sauer, 2001; Stirling *et al.*, 2005) rappresenta un valido strumento per studiare il ruolo del gene di interesse espresso nei nocicettori nella conduzione dolorifica.

Tra i diversi sottotipi di VGSCs espressi a livello dei nocicettori (Felts *et al.*, 1997) alcuni subiscono notevoli variazioni di espressione in seguito a danno ai nervi e sembrano influenzare fortemente l'eccitabilità neuronale (Kim *et al.*, 2001, Sleeper *et al.*, 2000). In particolare, in seguito a danno ai nervi periferici, è stato riportato che l'espressione dei canali Nav1.8 e Nav1.9 risulta ridotta (Sleeper *et al.*, 2000), mentre l'espressione del canale Nav1.3, un canale normalmente espresso solo nei neuroni sensitivi in via di sviluppo, risulta aumentata (Waxman *et al.*, 1994, Iwahashi *et al.*, 1994, Cummins & Waxman, 1997, Black *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2001, 2002) suggerendo come l'espressione anomala di tale canale possa giocare un ruolo chiave nella patogenesi del dolore neuropatico. Inoltre, l'evidenza che il fattore neurotrofico di derivazione gliale (GDNF) sia in grado di revertire sia i cambiamenti di espressione dei canali Nav1.3, Nav1.8 e Nav1.9, indotti dal danno ai nervi,

che il dolore neuropatico (Boucher *et al.*, 2000) supporta l'ipotesi che tale canale sia coinvolto nello sviluppo del dolore neuropatico.

Pertanto, è stato studiato il ruolo di tale canale nello sviluppo e nel mantenimento dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5, utilizzando topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per il gene di interesse e topi sottoposti a delezione genica globale. I risultati ottenuti dimostrano che, contrariamente ai dati ottenuti precedentemente con la tecnica del *knock-down* (Hains *et al.*, 2003), il canale Nav1.3 non ha un importante ruolo nel dolore neuropatico (Nassar *et al.*, 2006). Infatti, né la delezione genica a livello dei nocicettori, né la delezione genica globale del canale Nav1.3 ha alterato lo sviluppo o il mantenimento dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo suggerendo che il canale Nav1.3 non esplica un ruolo chiave nel dolore neuropatico indotto da SNL.

Inoltre, al fine di studiare il coinvolgimento del canale Nav1.3 espresso nei neuroni sensitivi di grande diametro nel dolore neuropatico, sono stati utilizzati topi del tipo NFH-Cre *knock-out* per Nav1.3 (Mallucci *et al.*, 2002). Grazie all'espressione tempo-specifica di questo peculiare sottotipo di ricombinasi che si esprime 10-12 settimane dopo la nascita, è stato possibile anche studiare il ruolo di Nav1.3 nella conduzione dolorifica in assenza delle alterazioni compensative di altri canali del sodio che verosimilmente avvengono durante la vita embrionale. Dal momento che anche in tal caso non sono state riscontrate variazioni dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5, è possibile affermare che il canale Nav1.3 espresso nei neuroni sensitivi di grande diametro non possiede un ruolo funzionale nei meccanismi di dolore neuropatico (Nassar *et al.*, 2006). Tale deduzione fa escludere anche la possibilità di un eventuale effetto mascherante dovuto all'aumentata espressione degli altri canali durante il periodo di sviluppo embrionale.

Tra i diversi sottotipi di canali del sodio voltaggio-dipendenti Nav1.7 e Nav1.8 risultano espressi selettivamente a livello dei neuroni di piccolo calibro e con funzione tipicamente nocicettiva facendo ipotizzare un loro coinvolgimento nella trasmissione dolorifica. E' stato anche dimostrato che il gene SCN9A, codificante per Nav1.7, sia il sito di mutazioni che

portano alla sindrome da dolore rettale familiare con eritemalgia primaria (Yang *et al.*, 2004). L'evidenza che tale patologia cronica, caratterizzata da bruciore alle estremità, dolore evocato dalla posizione eretta e con un generalizzato fenotipo infiammatorio, sia correlata con mutazioni a carico del gene che codifica per Nav1.7 ha suggerito che questo canale può avere un ruolo chiave nel dolore infiammatorio. Infatti, studi condotti su topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per Nav1.7 hanno ampiamente documentato il coinvolgimento di tale canale del sodio nello sviluppo del dolore infiammatorio, in diversi modelli sperimentali quali il formalin test ed i modelli di iperalgesia termica indotta da carragenina e NGF (Nassar *et al.*, 2004). Tuttavia, il coinvolgimento di tale canale nello sviluppo del dolore neuropatico rimaneva da chiarire. Inoltre, era stato documentato che Nav1.7 subisce un aumento di espressione in topi *knock-out* per Nav1.8 (Akopian *et al.*, 1999), apparentemente mimando la funzione di Nav1.8 e mascherando il fenotipo di ridotto dolore infiammatorio.

Pertanto, al fine di chiarire il ruolo di Nav1.7 e di Nav1.8 nella patogenesi del dolore neuropatico in assenza degli effetti dovuti all'aumento dell'espressione del canale Nav1.7 riscontrata nei topi *knock-out* per Nav1.8, è stato studiato l'andamento dello sviluppo di allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5, in topi sottoposti a delezione genica per entrambi i canali. Dal momento che la delezione genica globale del canale Nav1.7 è letale, sono stati utilizzati topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per Nav1.7 e globale *knock-out* per Nav1.8.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che lo sviluppo del dolore neuropatico non richiede l'espressione dei canali Nav1.7 e Nav1.8 dal momento che l'allodinia meccanica si sviluppa normalmente anche in topi sottoposti a doppia delezione genica (Nassar *et al.*, 2005). Pertanto, tale studio dimostra che anche il canale Nav1.8, nonostante la sua singolare specificità di espressione a livello dei neuroni nocicettivi (Akopian *et al.*, 1996) e l'aumento di espressione che si riscontra in seguito a legatura del nervo spinale L5 (Porreca *et al.*, 1999), non è coinvolto nei meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico indotto da SNL. Tali risultati sono in accordo con quelli riportati da Kerr e collaboratori (2001) che avevano già escluso il coinvolgimento di Nav1.8 nello sviluppo del comportamento nocicettivo

neuropatico indotto da danno parziale del nervo sciatico, ma sono in contrasto con quelli ottenuti da Lai e collaboratori (2002) che avevano mostrato la completa reversione del comportamento nocicettivo neuropatico in seguito a somministrazione intratecale di oligonucleotidi antisenso per Nav1.8. Inoltre, i risultati ottenuti hanno permesso di escludere la possibilità che l'aumento di espressione di Nav1.7 riscontrato nei topi *knock-out* per Nav1.8 (Akopian *et al.*, 1999) fosse alla base di tale discrepanza.

In virtù dell'importante ruolo che fattori trofici quali l'NGF (Wada *et al.*, 2004) ed il GDNF (Boucher *et al.*, 2000) giocano nella regolazione dell'espressione dei canali del sodio, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, è stato studiato il coinvolgimento del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) nel dolore neuropatico indotto da SNL nel topo. Tale fattore neurotrofico, costitutivamente espresso in una sotto-popolazione di neuroni sensitivi di piccolo diametro presenti nei gangli delle radici dorsali (DRG) e con assoni amielinici che terminano nelle lamine superficiali delle corna dorsali, rappresenta anche un regolatore dell'eccitabilità neuronale e un modulatore della plasticità sinaptica (Rivera *et al.*, 2004). Recentemente, è stato suggerito che il BDNF agisce anche come neuromodulatore della prima sinapsi della conduzione dolorifica e sembra necessario per la piena attivazione del neurone di secondo ordine (see Pezet *et al.*, 2002a). Inoltre, esso partecipa ai meccanismi di *long-term potentiation* (LTP) alla base della formazione della memoria (Lu & Figurov, 1997) e, recentemente, è stato suggerito che il dolore e la memoria possano condividere un meccanismo d'azione comune (Ji *et al.*, 2003). Diverse evidenze sperimentali documentano che il BDNF è in grado di interferire con i meccanismi di plasticità sinaptica alla base dello sviluppo del dolore (Kerr *et al.*, 1999; Slack & Thompson 2002; Slack *et al.*, 2004) e suggeriscono il suo coinvolgimento sia nel dolore infiammatorio (Cho *et al.*, 1997a,b) che neuropatico (Fukuoka *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000). Tuttavia, il ruolo di questo peculiare fattore neurotrofico nel dolore neuropatico rimane controverso.

Pertanto, al fine di chiarire il coinvolgimento del BDNF nello sviluppo del dolore neuropatico è stato studiato l'andamento dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out*. Ma, ancora una volta, la delezione genica tessuto-specifica non ha determinato variazioni significative dell'allodinia

meccanica indotta da SNL nel topo, suggerendo che il BDNF rilasciato dai neuroni sensitivi non è un importante mediatore del dolore neuropatico (Zhao *et al.*, 2006).

I risultati ottenuti risultano in contrasto con i dati riportati da Yajima e collaboratori (2005) che hanno mostrato una riduzione dell'allodinia indotta dalla legatura parziale del nervo sciatico in topi *knock-out* eterozigoti per il BDNF e la soppressione dell'allodinia in seguito a somministrazioni intratecali ripetute di anticorpi diretti contro TrkB, recettore per il BDNF. Tuttavia tali dati sono stati ottenuti in un altro modello sperimentale di dolore neuropatico utilizzando topi in cui la delezione genica non è globale né tessuto-specifica. Inoltre, i dati ottenuti suggeriscono che l'aumento di espressione del BDNF riportato nei neuroni dei DRG a livello L4 (Fukuoka *et al.*, 2001) non ha un ruolo chiave nello sviluppo dell'allodinia meccanica indotta da SNL.

Complessivamente, gli esperimenti condotti con approccio comportamentale, utilizzando topi *knock-out* per i geni di interesse, hanno portato a risultati negativi, facendo concludere che i canali del sodio voltaggio-dipendenti del tipo Nav.1.3, Nav.1.7 e Nav1.8, ed il BDNF rilasciato dai neuroni sensitivi, non sono importanti mediatori del dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale L5.

Tuttavia, il potenziale ruolo dei canali del sodio nei meccanismi di dolore neuropatico potrebbe essere mascherato dagli effetti compensativi di altri canali oppure potrebbe essere quantitativamente non determinante. Di conseguenza l'inibizione o l'assenza di uno solo di questi fattori potrebbe non essere sufficiente a determinare la riduzione del dolore neuropatico. Inoltre, gli studi condotti hanno potuto mostrare, con un approccio diverso da quelli più comunemente utilizzati in letteratura, che il modello SNL rappresenta uno strumento estremamente valido per studiare i meccanismi alla base del dolore neuropatico.

Pur con i limiti imposti dalla non completa conoscenza della fisiopatologia alla base del dolore, tale modello risulta estremamente utile anche per valutare il profilo analgesico di sostanze di sintesi e/o di origine naturale. Infatti, una peculiarità che rende il modello di dolore neuropatico da legatura L5 estremamente vantaggioso rispetto ad altri modelli è

rappresentata dal danno che interessa soltanto un nervo spinale (L5) e dalla stabilità dell'allodinia meccanica che persiste fino a 30 giorni dalla lesione.

Pertanto, il modello è stato utilizzato per caratterizzare il profilo farmacologico dell'olio essenziale (OE) di bergamotto, fitocomplesso che si estrae dall'agrume del *Citrus Bergamia* *Risso et Poiteau*, pianta endemica calabrese. Recentemente, studi effettuati a livello del sistema nervoso centrale hanno fornito interessanti dati sull'attività biologica dell'OE di bergamotto ed in particolare, sulla sua capacità di interferire con processi fondamentali della comunicazione sinaptica, quali per esempio, il rilascio di amminoacidi con funzione di neurotrasmettitori in specifiche aree cerebrali del ratto (Morrone *et al.*, 2007). Inoltre, è stato documentato che l'OE di bergamotto conferisce neuroprotezione a ratti sottoposti ad ischemia focale permanente, verosimilmente mediante la modulazione dei livelli sinaptici di amminoacidi eccitatori quali aspartato e glutammato (Morrone *et al.*, 2006).

Dal momento che l'OE di bergamotto risulta in grado di interferire con i meccanismi fondamentali alla base della comunicazione sinaptica e di conferire neuroprotezione in sistemi *in vitro* (Corasaniti *et al.*, 2007) ed *in vivo* (Morrone *et al.*, 2007), è stato verificato se il fitocomplesso fosse in grado di modulare anche la plasticità sinaptica alla base dello sviluppo del dolore neuropatico. Inoltre, nessuno aveva finora investigato gli effetti del trattamento con l'OE di bergamotto nel dolore neuropatico.

Pertanto, è stata valutata l'eventuale azione analgesica dell'OE di bergamotto nel dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo. E' importante sottolineare le limitazioni del fitocomplesso dovute alla mancanza di controlli appropriati ed inerti. Come controlli sono stati utilizzati l'olio di oliva, l'olio di semi ed il cremophor, veicoli che possiedono attività antiinfiammatorie o antinocicettive. Infatti, è stato riportato che sia l'olio di oliva (Beauchamp *et al.*, 2005) che altri olii vegetali (Odabasoglu *et al.*, 2008) esplicano attività antiinfiammatorie. Inoltre, il cremophor, surfactante usato per solubilizzare farmaci insolubili in acqua (Burstein *et al.*, 1998), quando somministrato per via orale ad alte dosi esplica un'azione antinocicettiva nel modello di dolore addominale indotto dalla somministrazione di acido acetico (Tabarelli *et al.*, 2003).

I risultati ottenuti dimostrano che la somministrazione subcronica di OE di bergamotto determina una tendenza alla riduzione dell'allodinia meccanica indotta da SNL suggerendo che il fitocomplesso interferisce con i meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico, tuttavia tale riduzione non ha raggiunto livelli di significatività. Gli effetti del/i principio/i attivo/i ad azione analgesica eventualmente presente/i nell'OE di bergamotto potrebbero essere mascherati da uno dei circa trecento componenti che costituiscono la miscela complessa.

Al fine di completare il profilo antinocicettivo dell'OE, questo è stato studiato anche in un modello di dolore infiammatorio indotto dalla somministrazione di formalina nella zampa posteriore sinistra del topo. Bisogna sottolineare che la prima fase di tale modello di dolore infiammatorio è l'espressione comportamentale della componente "acuta" del dolore indotto dall'algogeno verosimilmente mediata dall'attivazione dei nocicettori laddove, la seconda fase è l'espressione della fase "cronica" che coinvolge meccanismi centrali ed in cui la componente infiammatoria risulta essere più importante rispetto alla prima fase. Tuttavia, anche nella prima fase non è possibile escludere una componente infiammatoria che comunque caratterizza tale modello.

I risultati ottenuti documentano un'interferenza dipendente dalla dose e dalla via di somministrazione del fitocomplesso con entrambe le fasi del comportamento dolorifico di *licking/biting* indotto dalla formalina. Infatti, quando somministrato per via intraplantare alla dose di 20 µl/topo l'OE di bergamotto determina una riduzione statisticamente significativa della prima fase del comportamento nocicettivo mentre, non determina variazioni significative nella seconda fase del formalin test. Quando somministrato a livello della regione interscapolare, il fitocomplesso (20 µl/topo; s.c.) determina una significativa riduzione sia della prima che della seconda fase del comportamento nocicettivo.

Il diverso comportamento antinocicettivo indotto dall'OE dopo somministrazione intraplantare rispetto alla somministrazione nella regione interscapolare può essere razionalizzato sulla base di una diversa disponibilità del principio attivo sul sito d'azione e della probabile esistenza di due siti d'azione per il fitocomplesso. Infatti, la

somministrazione intraplantare determina un'immediata risposta antinocicettiva che interessa esclusivamente la prima fase suggerendo un'azione a livello di una struttura ricompresa nel nocicettore. Al contrario, l'effetto registrato anche sulla seconda fase dopo somministrazione di OE a livello della regione interscapolare indica il possibile coinvolgimento di un sito diverso, verosimilmente centrale, d'azione che si aggiunge a quello periferico. In accordo con tale deduzione, la somministrazione di una dose inferiore di fitocomplesso a livello della regione interscapolare risulta inattiva nella prima fase laddove, determina una significativa riduzione della seconda fase. Similmente, la somministrazione di cremophor, veicolo utilizzato per diluire l'OE (2 microlitri), determina una riduzione statisticamente significativa del comportamento di *licking/biting* osservato nella seconda fase del formalin test. Quest'ultima osservazione rende difficile l'interpretazione dei risultati ottenuti con il basso volume di OE sulla seconda fase del formalin test.

E' interessante notare come sia difficile individuare un veicolo utile per lo studio del profilo antinocicettivo degli olii essenziali. Infatti, in accordo con la letteratura corrente anche gli altri controlli utilizzati (olio di semi, olio di oliva) determinano una riduzione statisticamente significativa della seconda, ma non della prima fase del formalin test. Inoltre, l'olio di oliva somministrato a livello della regione interscapolare induce una riduzione della seconda fase ad un livello maggiore di significatività statistica.

I risultati ottenuti indicano che il fitocomplesso contiene dei principi attivi con attività antinocicettiva. Il linalolo, un componente ampiamente rappresentato (6-18%) nella frazione volatile dell'OE, è noto possedere proprietà antiinfiammatorie ed antiiperalgiche (Peana *et al.*, 2002; Peana *et al.*, 2004a) nel ratto. Tuttavia, le proprietà farmacologiche del linalolo sono state documentate solo in modelli sperimentali di dolore infiammatorio. I risultati delle presenti indagini rappresentano che la somministrazione acuta di linalolo, 1 ora prima della legatura del nervo spinale non determina la riduzione dell'allodinia meccanica, sebbene si riscontri una tendenza della curva verso l'attenuazione a 7 giorni dalla lesione, stesso punto del *time course* in cui dopo il trattamento con OE di bergamotto era stato riscontrato un simile andamento. Tale dato lascia pensare che l'effetto dell'OE di bergamotto sull'allodinia

meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5, seppure probabilmente mascherato dall'azione di altri componenti del fitocomplesso sia probabilmente da ascrivere al monoterpene.

I risultati ottenuti rappresentano la prima documentazione della capacità del (-)-linalolo di attenuare il dolore neuropatico. In particolare, la somministrazione subcronica di (-)-linalolo fino a 14 giorni dopo la lesione determina una riduzione dell'allodinia meccanica indotta dalla legatura del nervo spinale L5 nel topo. Risultati statisticamente significativi si ottengono solo a 7 giorni rendendone difficile l'interpretazione. Inoltre, dati non mostrati documentano che lo stesso effetto si ottiene quando il trattamento viene interrotto a 7 giorni. Il linalolo ritarda la fase di induzione dell'allodinia meccanica, ma non esercita effetti sulla fase di mantenimento. Inoltre, sia la somministrazione acuta che subcronica di linalolo non determinano variazioni nella sensibilità termica, che tipicamente rimane inalterata in seguito ad induzione del dolore neuropatico mediante SNL. Pertanto, i risultati determinati tramite il test di Haregreaves' evidenziano che i meccanismi fisiologici della conduzione dolorifica sembrano restare inalterati in seguito a trattamento con linalolo.

I nostri studi non permettono di sviluppare ipotesi sul meccanismo alla base dell'azione analgesica del linalolo. E' stato documentato che classici mediatori dell'infiammazione come il nitrossido contribuiscono allo sviluppo del dolore neuropatico indotto da SNL (O'Rielly & Loomis, 2006), infatti il trattamento con AR-C102222, inibitore selettivo della iNOS, attenua l'allodinia meccanica indotta da SNL (LaBuda & Little, 2006). E' importante sottolineare che il linalolo è risultato in grado di inibire il rilascio di NO indotto in macrofagi J774.A1 stimolati con lipopolisaccaridi (Peana *et al.*, 2006). E' verosimile, quindi, che l'azione analgesica del linalolo possa essere mediata dalla sua capacità di inibire il rilascio di NO. Gli effetti del linalolo su classici mediatori dell'infiammazione come le citochine sono stati studiati, nel modello sperimentale di dolore neuropatico utilizzato, in un numero ristretto di esperimenti non mostrati. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi.

A supporto dell'importante ruolo che l'attività antinfiammatoria del linalolo svolge nella sua azione antinocicettiva è stato mostrato che il linalolo risulta attivo nel test di *writhing*

(Peana *et al.*, 2002), un modello di dolore infiammatorio addominale, allo stesso intervallo di dosi alle quali determina una riduzione statisticamente significativa dell'edema indotto da carragenina, un modello di infiammazione.

Il coinvolgimento di meccanismi centrali alla base dell'azione analgesica del linalolo è stato suggerito dall'evidenza che, quando somministrato alla dose di 200 mg/kg, il linalolo esplica un'azione antiiperalgica anche nella zampa controlaterale alla sede di somministrazione intraplantare di glutammato (Peana *et al.*, 2004a).

Evidenze sperimentali fanno pensare all'esistenza di un più complesso meccanismo d'azione in cui potrebbero essere coinvolti diversi sistemi neurotrasmettitoriali (Okuyama *et al.*, 2004; Re *et al.*, 2000) e/o canali ionici voltaggio-dipendenti (Narusuye *et al.*, 2005).

Studi *in vivo* hanno riportato la capacità del linalolo di ritardare le convulsioni indotte da NMDA e di bloccare le convulsioni indotte dall'acido chinolinico (Elisabetsky *et al.*, 1999). L'azione anticonvulsivante del monoterpene è verosimilmente legata ad un'interferenza con il complesso sopramolecolare del recettore NMDA (Elisabetsky *et al.*, 1999; Silva Brum *et al.*, 2001).

Indagini immunoistochimiche hanno documentato aumentati livelli della forma fosforilata di Akt a livello delle corna dorsali del tratto L5 del midollo spinale 7 giorni dopo SNL (Xu *et al.*, 2007). È importante notare che l'attivazione di Akt rappresenta una delle vie di trasduzione del segnale mediata dal recettore NMDA (Perkinton *et al.*, 2002). Gli effetti del trattamento con linalolo sui livelli di espressione di pAkt e Akt totale, sono stati studiati, mediante la metodica del western blotting, a livello del tratto lombare del midollo spinale 1, 3 e 7 giorni dopo SNL. I risultati ottenuti dimostrano che non si riscontrano differenze statisticamente significative dei livelli di pAkt e Akt totale tra gli animali trattati con linalolo rispetto a quelli trattati con veicolo così come tra gli animali neuropatici rispetto agli animali sham. Essi, quindi, suggeriscono che la chinasi non è coinvolta nel meccanismo alla base dell'azione analgesica del linalolo nel modello sperimentale utilizzato. Infine, i nostri studi effettuati con metodiche di western blotting nel topo non confermano l'aumento di pAkt documentato da indagini immunoistochimiche nel ratto (Xu *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONI

Gli studi condotti hanno permesso di caratterizzare meglio la patogenesi del dolore neuropatico da legatura del nervo spinale L5 nel topo. L'impiego di tale modello sperimentale ha permesso di studiare il profilo analgesico di nuovi potenziali farmaci ed, in particolare, di sostanze di origine naturale. I dati ottenuti dagli esperimenti con approccio comportamentale ed utilizzando topi ingegnerizzati mostrano che il dolore neuropatico indotto da SNL si sviluppa normalmente in topi del tipo nocicettore-specifico *knock-out* per i canali del sodio voltaggio-dipendenti del tipo Nav1.3, Nav1.7 e Nav1.8 suggerendo che la presenza di tali canali, in particolare quelli espressi nei nocicettori, non è necessaria per lo sviluppo del dolore neuropatico.

Altri studi condotti sempre con lo stesso approccio hanno permesso di escludere il coinvolgimento del BDNF rilasciato dai neuroni sensitivi nei meccanismi di sviluppo del dolore neuropatico indotto dalla legatura del nervo spinale L5. La natura negativa dei risultati indica che sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi alla base dei fenomeni di sensibilizzazione.

Tuttavia, questo non ha impedito di utilizzare tale modello sperimentale per lo studio del profilo farmacologico dell'OE di bergamotto. Il trattamento subcronico con il fitocomplesso non determina una riduzione significativa dell'allodinia meccanica indotta da SNL, sebbene sia riscontrabile una tendenza verso la riduzione a 7 giorni.

Verosimilmente il principio attivo responsabile dell'azione antiallodinica dell'OE è il linalolo, uno dei principali costituenti del fitocomplesso. I risultati ottenuti rappresentano la prima dimostrazione della capacità del linalolo di attenuare l'allodinia meccanica associata al dolore neuropatico. In particolare, il trattamento con linalolo determina una riduzione significativa dell'allodinia solo 7 giorni dopo la lesione determinando un ritardo nello sviluppo dell'allodinia meccanica indotta da SNL.

I meccanismi alla base dell'azione analgesica del linalolo non sono ancora noti. Indagini effettuate tramite esperimenti di western blotting dimostrano che il linalolo non determina

variazioni statisticamente significative di pAkt e Akt totale 1, 3 e 7 giorni dopo SNL suggerendo che l'Akt, uno dei possibili meccanismi di trasduzione del segnale attivati dal recettore NMDA, non è coinvolta nei meccanismi alla base dell'azione analgesica del linalolo.

In conclusione gli studi condotti confermano che il modello SNL è utile per lo studio di farmaci sia di origine naturale che di sintesi ed ulteriori studi sono necessari al fine di chiarire i meccanismi neurochimici alla base dell'azione antiallodinica del linalolo.

## 5. BIBLIOGRAFIA

AGOSTI, R., DUKE, R.K., CHRUBASIK, J.E. & CHRUBASIK, S. (2006). Effectiveness of *Petasites hybridus* preparations in the prophylaxis of migraine: A systematic review. *Phytomedicine*, **13**, 743–746.

AKOPIAN, A.N., SIVILOTTI, L. & WOOD, J.N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, **379**, 257-262.

AKOPIAN, A.N., SOUSLOVA, V., ENGLAND, S., OKUSE, K., OGATA, N., URE, J., SMITH, A., KERR, B.J., MCMAHON, S.B., BOYCE, S., HILL, R., STANFA, L.C., DICKENSON, A.H. & WOOD, J.N. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat. Neurosci.*, **2**, 541-548.

ALESSI, D.R., ANDJELKOVIC, M., CAUDWELL, B., CRON, P., MORRICE, N., COHEN, P. & HEMMING, B.A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.*, **15**, 6541-6551.

ALESSI, D.R. & COHEN, P. (1998). Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 55-62.

ALLEN, R.R. (1998). Neuropathic pain in the cancer patient. *Neurol. Clin.*, **16**, 869-88.

ASENSIO, V.C. & CAMPBELL, I.L. (1999). Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci.*, **22**, 504–512.

ANDERSEN, S. & WORM-PEDERSEN, J. (1989). The prevalence of persistent pain in a Danish population. *J. Pain*, S4-S332.

ATWAL, J.K., MASSIE, B., MILLER, F. D. & KAPLAN, D. R. (2000). The TrkBShc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3-kinase. *Neuron*, **27**, 265-277.

BACK, S. K., KIM, J. S., HONG, S. K. & NA, H. S. (2003). Ascending pathway for mechanical allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Neuroreport*, **14**, 1623–1626.

BACKONJA, M., BEYDOUN, A., EDWARDS, K.R., SCHWARTZ, S.L., FONSECA, V., HES, M., LAMOREAUX, L. & GAROFALO, E., (1998). Gabapentin for the symptomatic

treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.*, **280**, 1831–1836.

BAKER, M. & WOOD, J.N. (2001). Involvement of Na<sup>+</sup> channels in pain pathways. *Pharm. Sci.*, **22**, 27-31.

BAROCELLI, E., CALCINA, F., CHIAVARINI, M., IMPICCIATORE, M., BRUNI, R., BIANCHI, A. & BALLABENI, V. (2004). Antinociceptive and gastroprotective effects of inhaled and orally administered *Lavandula hybrida* Reverchon “Grosso” essential oil. *Life Sciences*, **76**, 213–223.

BASBAUM, A.I., GAUTRON, M., JAZAL, F., MAYES, M. & GUILBAUD, G. (1991). The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain*, **47**, 359-367.

BEAUCHAMP, G.K., KEAST, R.S.J., MOREL, D., LIN, J., PIKA, J., HAN, Q., LEE, C.H., SMITH, A.B. & BRESLIN, P.A.S. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, **437**, 45-46.

BECKER, N., BONDEGAARD, T.T., OLSEN, A.K. & SIOGREN, P. (1997). Pain epidemiology and health related quality of life in chronic non-malignant pain patients referred to a Danish multidisciplinary pain center. *Pain*, **73**, 393-400.

BELLACOSA, A., TESTA, J.R., STAAL, S.P. & TSICHLIS, P.N. (1991). A retroviral oncogene, Akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, **254**, 274-277.

BENNETT, G.J. & XIE Y.K., (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, **33**, 87-107.

BHAVE, S.V., GHODA, L. & HOFFMAN, P. L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor mediates the anti-apoptotic effect of NMDA in cerebellar granule neurons: signal transduction cascades and site of ethanol action. *J. Neurosci.*, **19**, 3277-3286.

BHAVE, G., ZHU, W., WANG, H., BRAISER, D.J., OXFORD, G.S. & GEREAU, R.W. (2002). cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, **35**, 721-731.

- BHAVE, G. & GEREAU, R.W. (2003). Growing pains: the cytoskeleton as a critical regulator of pain plasticity. *Neuron*, **39**, 577-579.
- BLACK, J.A., CUMMINS, T.R., PLUMPTON, C., CHEN, Y.H., HORMUZDIAR, W., CLARE, J.J. & WAXMAN, S.G. (1999). Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J. Neurophysiol.*, **82**, 2776-2785.
- BONNINGTON, J.K. & MCNAUGHTON, P.A. (2003). Signaling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J. Physiol.*, **551**, 433-446.
- BORTALANZA, L.B., FERREIRA, J., HESS, S.C., DELLE MONACHE, F., YUNES, R.A. & CALIXTO, J.B. (2002). Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **453**, 203– 208.
- BOUCHER, T.J., OKUSE, K., BENNETT, D.L., MUNSON, J.B., WOOD, J.N. & MCMAHON, S.B. (2000). Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science*, **290**, 124-127.
- BURSTEIN, S.H., FRIDERICHS, E., KOGEL, B., SCHNEIDER, J. & SELVE, N. (1998). Analgesic effects of 1',1'-dimethylheptyl-delta8-THC-11-oic acid (CT3) in mice. *Life Sciences*, **63**, 161-168.
- BURSZTAJN, S., RUTKOWSKI, M.D. & DELEO, J.A. (2004). The role of the N-methyl-Daspartate receptor NR1 subunit in peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia, glial activation and chemokine expression in the mouse. *Neuroscience*, **125**, 269–75.
- CAMPBELL, J.N. & MEYER, R.A. (2006). Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, **52**,77-92.
- CANTRELL, A.R. & CATTERALL, W.A. (2001). Neuromodulation of Na<sup>+</sup> channels: an unexpected form of cellular plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 397-407.
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. & JULIUS, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.

CAVANAGH, H.M.A. & MILKINSON, J.M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytother. Res.*, **16**, 301-308.

CHACUR, M., MILLIGAN, E.D., GAZDA, L.S., ARMSTRONG, C., WANG, H., TRACEY, K.J., MAIER, S.F. & WATKINS, L.R. (2001). A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain*, **94**, 231-44.

CHAN, T.O., RITTENHOUSE, S.E. & TSICHLIS, P.N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 965–1014.

CHAPLAN, S.R., BACH, F.W., POGREL, J.W., CHUNG, J.M. & YAKSH, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods*, **53**, 55-63.

CHAUDHARY, L.R. & HRUSKA, K.A. (2001). The cell survival signal Akt is differentially activated by PDGF-BB, EGF, and FGF-2 in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, **81**, 304-311.

CHENG, A., WANG, S., YANG, D., XIAO, R. & MATTSON, M.P. (2003). Calmodulin mediates brain-derived neurotrophic factor cell survival signaling upstream of Akt kinase in embryonic neocortical neurons. *J. Biol. Chem.*, **278**, 7591-7599.

CHO, H.J., KIM, J.K., ZHOU, X.F. & RUSH, R.A. (1997a). Increased brain derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation. *Brain Res.*, **764**, 269– 272.

CHO, H.J., KIM, S.Y., PARK, M.J., KIM, D.S., KIM, J.K. & CHU, M.Y. (1997b). Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res.*, **749**, 358– 362.

CHO, J.S., KIM, T.H., LIM, J.M. & SONG J.H. (2008). Effects of eugenol on Na<sup>+</sup> currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res.*, epub ahead of print.

CHRUBASIK, J. E., ROUFOGALIS, B. D. & CHRUBASIK, S. (2007). Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain. *Phytother. Res.*, **21**, 675–683.

CLATWORTHY, A.L., ILLICH, P.A., CASTRO, G.A. & WALTERS, E.T. (1995). Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, **184**, 5–8.

COLBURN, R.W., RICKMAN, A.J. & DELEO, J.A. (1999). The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp. Neurol.*, **157**, 289–304.

COLE, R.L., LECHNER, S.M., WILLIAMS, M.E., PRODANOVICH, P., BLEICHER, L., VARNEY, M.A. & GU, G. (2005). Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta subunit mRNA-containing cells in the rat Central Nervous System and the dorsal root ganglia. *J. Comp. Neurol.*, **491**, 246–269.

CORASANITI, M.T., MAIUOLO, J., MAIDA, S., FRATTO, V., NAVARRA, M., RUSSO, R., AMANTEA, D., MORRONE, L.A. & BAGETTA, G. (2007). Cell signaling pathways in the mechanisms of neuroprotection afforded by bergamot essential oil against NMDA-induced cell death in vitro. *Br. J. Pharmacol.*, **151**, 518–529.

COSTIGAN, M., BEFORT, K., KARCHEWSKI, L., GRIFFIN, R.S., D'URSO, D., ALLCHORNE, A., SITARSKI, J., MANNION, J.W., PRATT, R.E. & WOOLF, C.J. (2002). Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC Neurosci.*, **3**, 16.

CUI, J.G., HOLMIN, S., MATHIESEN, T., MAYERSON, B.A. & LINDEROTH, B. (2000). Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain*, **88**, 239–248.

CUMMINS, T.R. & WAXMAN, S.G. (1997). Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons following nerve injury. *J. Neurosci.*, **17**, 3503–3514.

CUMMINS, T.R., AGLIECO, F., RENGANATHAN, M., HERZOG, R.I., DIB-HAJJ, S.D. & WAXMAN, S.G. (2001). Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. *J. Neurosci.*, **21**, 5952–5961.

- DATTA S.R., DUDEK H., TAO X., MASTERS S., FU H., GOTOH Y. & GREENBERG M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-241.
- DAVIES, S.L., SIAU, C. & BENNETT, G.J. (2005). Characterization of a model of cutaneous inflammatory pain produced by an intraviolet irradiation-evoked sterile injury in the rat. *J. Neurosci. Methods*, **148**, 161-166.
- DE ARAUJO, P.F., COELHO-DE-SOUZA, A.N., MORAIS, S.M., FERREIRA, S.C. & LEAL-CARDOSO, J.H. (2005). Antinociceptive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* on mice. *Phytomedicine*, **12**, 482-6.
- DECOSTERD, I. & WOOLF, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, **87**, 149-158.
- DELLEMIJIN, P. (1999). Are opioids effective in relieving neuropathic pain? *Pain*, **80**, 453-462.
- DIB-HAJJ, S.D., FJELL, J., CUMMINS, T.R., ZHENG, Z., FRIED, K., LAMOTTE, R. BLACK, J.A. & WAXMAN, S.G. (1999). Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain*, **83**, 591-600.
- DI GIACOMO, A. & MINCIONE, B. (1993). In "*Olio Essenziale di Bergamotto, Citrus Bergamia Risso*", pp.1-30. Laruffa Editore.
- DISSANAYAKE, V.U., GEE, N.S., BROWN, J.P. & WOODRUFF, G.N. (1997). Spermine modulation of specific [<sup>3</sup>H]-gabapentin binding to the detergent solubilized porcine cerebral cortex alpha 2 delta calcium channel subunit. *Br. J. Pharmacol.*, **120**, 833– 840.
- DIXON, W.J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **20**, 441-462.
- DJOUHRI, L., FANG, X., OKUSE, K., WOOD, J.N., BERRY, C.M. & LAWSON, S.N. (2003). The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J. Physiol.*, **550**, 739-752.
- DOUBELL, T. P., MANNION, R. J., & WOOLFE, C. J. (1999). The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In *Textbook of Pain* (Fourth edition). Eds. Wall, P.D. & Melzack, R. London' Churchill Livingstone.

DOWNARD, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **10**, 262-267.

DUDUISSON, D. & DENNIS, S.G. (1977). The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, **4**, 161-174.

DUGO, G., LAMONICA, G., COTRONEO, A., TROZZI, A., CRISPO, F., LICANDRO, G. & GIOFFRÈ, D. (1987). Introduzione. In "*La composizione della frazione volatile dell'essenza di bergamotto*", pp.7. Essenze Derivati Agrumari, Reggio Calabria.

EATON, M.J., BLITS, B., RUITENBERG, M.J., VERHAAGEN, J. & OUDEGA, M. (2002). Amelioration of chronic neuropathic pain after partial nerve injury by adeno-associated viral (AAV) vector-mediated over-expression of BDNF in the rat spinal cord. *Gene Ther.*, **9**, 1387-1395.

ELISABETSKY, E., COELHO, M., DE SOUZA, G.P., DOS SANTOS, M.A.C., SIQUEIRA, I.R., AMADOR, T.A. & NUNES, D.S. (1995). Sedative properties of linalool. *Fitoterapia*, LXVI, 407-414.

ELISABETSKY, E., BRUM, L.F. & SOUZA, D.O. (1999). Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. *Phytomedicine*, **6**, 107-113.

EMFORS, P., WETMORE, C., OLSON, L. & PERSSON, H. (1990). Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron*, **5**, 511-526.

FAURSCHOU, M. & BORREGAARD, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, **5**, 1317-1327.

FELTS, P.A., YOKOYAMA, S., DIB-HAJJ, S., BLACK, J.A. & WAXMAN, S.G. (1997). Sodium channel alpha-subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system. *Mol. Brain Res.*, **45**, 71-82.

FRANKE, T.F., KAPLAN, D.R. & CANTLEY, L.C. (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, **88**, 435-437.

FUCHS, P.N., ROZA, C., SORA, I., UHL, G. & RAIA, S.N. (1999). Characterization of mechanical withdrawal responses and effects of mu-, delta- and kappa-opioid agonists in normal and mu-opioid receptor knock-out mice. *Brain Res.*, **821**, 480-486.

- FUKUOKA, T., KONDO, E., DAI, Y., HASHIMOTO, N. & NOGUCHI, K. (2001). Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective Spinal Nerve Ligation model. *J. Neurosci.*, **21**, 4891-4900.
- GALLI, S.J., NAKAE, S. & TSAI, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, **6**, 135–142.
- GAO, X., KIM, H.K., CHUNG, J.M. & CHUNG, K. (2005). Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. *Pain*, **116**, 62-72.
- GARRISON, C.J., DOUGHERTY, P.M., KAJANDER, K.C. & CARLTON, S.M. (1991). Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res.*, **565**, 1-7.
- GEE, N.S., BROWN, J.P., DISSANAYAKE, V.U., OFFORD, J., THURLOW, R. & WOODRUFF, G.N. (1996). The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem.*, **271**, 5768-76.
- GOLD, M.S., LEVINE, J.D., & CORREA, A.M. (1998). Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J. Neurosci.*, **18**, 10345– 10355.
- GOLD, M.S., WEINREICH, D., KIM, C.S., WANG, R., TREANOR, J., PORRECA, F. & LAI, J. (2003). Redistribution of Na(v)1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J. Neurosci.*, **23**, 158-166.
- GOLSHANI, S., KARAMKHANI, F., MONSEF-ESFEHANI, H.R. & ABDOLLAHI, M. (2004). Antinociceptive effects of the essential oil of dracocephalum kotschy in the mouse writhing test. *J.Pharm. Pharm. Sci.*, **7**,76-9.
- GORDON, D.B. & LOVE, G. (2004). Pharmacologic management of neuropathic pain. *Pain Management Nursing*, **5**, 19-33.
- GUEDES, R.P., ARAUJO, A.S.R., JANNER, D., BELLO-KLEIN, A., RIBEIRO, M.F.M. & PARTATA, W.A. (2008). Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. *Cell. Mol. Neurobiol.*, Epub ahead of print.
- GUILBAUD, G., GAUTRON, M., JAZAT, F., RATINAHIRANA, H., HASSIG, R. & HAUW, J.J. (1993). Time course of degeneration and regeneration of myelinated nerve

fibers following chronic loose ligatures of the rat sciatic nerve: can nerve lesions be linked to the abnormal pain-related behaviours? *Pain*, **53**, 147-158.

HAINS, B.C., KLEIN, J.P., SAAB, C.Y., CRANER, M.J., BLACK, J.A. & WAXMAN, S.G. (2003). Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, **23**, 8881-8892.

HAINS, B.C., SAAB, C.Y., KLEIN, J.P., CRANER, M.J. & WAXMAN, S.G. (2004). Altered sodium channel expression in second-order spinal sensory neurons contributes to pain after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.*, **24**, 4832-4839.

HAREGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C. & JORIS, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, **32**, 77-88.

HEPPENSTALL, P.A. & LEWIN, G.R. (2001). BDNF but not NT-4 is required for normal flexion reflex plasticity and function. *P.N.A.S. U.S.A.*, **98**, 8107-8112.

HEWITT, D.J., MCDONALD, M., PORTENOY, R.K., ROSENFELD, B., PASSIK, S. & BREITBART, W. (1997). Pain syndromes and etiologies in ambulatory AIDS patients. *Pain*, **70**, 117-23.

HOKFELT, T., ZHANG, X. & WIESENFELD-HALLIN, Z. (1994). Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci.*, **17**, 22-30.

HONORE, P., WADE, C.L., ZHONG, C., HARRIS, R.R., WU, C., GHAYUR, T., IWAKURA, Y., DECKER, M.W., FALTYNEK, C., SULLIVAN, J. & JARVIS, M.F. (2006). Interleukin-1 $\alpha$  gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain. *Behav. Brain Res.*, **167**, 355-364.

HOSLI, E. & HOSLI, L. (1993). Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **40**, 477-506.

HUANG, E.J. & REICHARDT, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 609-642.

HUDSON, L.J., BEVAN, S., MC NAIR, K., GENTRY, C., FOX, A., KUHN, R. & WINTER, J. (2002). Metabotropic glutamate receptor 5 upregulation in A-fibers after spinal nerve injury: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP) reverses the induced thermal hyperalgesia. *J. Neurosci.*, **22**, 2660-2668.

HUNSKAAR, S., FASMER, O.B. & HOLE, K. (1985). Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods*, **14**, 69-76.

HUNTER, J.C., GOGAS, K.R., HEDLEY, L.R., JACOBSON, L.O., KASSOTAKIS, L., THOMPSON, J. & FONTANA, D.J. (1997). The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, **324**, 153-160.

HWANG, J.H. & YAKSH, T.L. (1997). Effect of subarachnoid gabapentin on tactile evoked allodynia in a surgically induced neuropathic pain model in the rat. *Reg. Anesth.*, **22**, 249-256.

IWAHASHI, Y., FURUYAMA, T., INAGAKI, S., MORITA, Y. & TAKAGI, H. (1994). Distinct regulation of sodium channel types I, II and III following nerve transection. *Mol. Brain Res.*, **22**, 341-345.

JAFFARY, F., GHANNADI, A. & SIAHPOUSH, A. (2004). Antinociceptive effects of hydroalcoholic extract and essential oil of *Zataria multiflora*. *Fitoterapia*, **75**, 217-20.

JANES, B.J. & ROBERTS, D.J. (1968). A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naïve mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **259**, 211.

JI, R.R., ZHANG, Q., LAW, P.Y., LOW, H.H., ELDE, R. & HOLKFELT, T. (1995). Expression of mu-, delta- and kappa-opioid receptor like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J. Neurosci.*, **15**, 8156-8166.

JI, R.R., BADA, H., BRENNER, G.J. & WOOLF, C.J. (1999). Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neurosci.*, **2**, 1114-9.

JI, R.R. & WOOLF, C. J. (2001). Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol. Dis.*, **8**, 1-10.

JI, R.R., BEFORT, K., BRENNER, J. & WOOLF, C.J. (2002). ERK MAP kinase activation in superficial spinal cord neurons induces prodynorphin and NK-1 upregulation and contributes to persistent inflammatory pain hypersensitivity. *J. Neurosci.*, **22**, 478-485.

JI, R.R., KOHNO, T., MOORE, K.A. & WOOLF, C.J. (2003). Central sensitization and LTP. Do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci.*, **26**, 696-705.

JIN, S.X., ZHUANG, Z.Y., WOOLF, C.J. & JI, R.R. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J. Neurosci.*, **23**, 4017-4022.

JONES, P.F., JAKUBOWICZ, T., PITOSI, F.J., MAURER, F. & HEMMINGS, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 4171-4175.

JONES, K.R., FARINAS, I., BACKUS, C. & REICHARDT, L.F. (1994). Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development. *Cell*, **76**, 989-999.

JULIUS, D. & BASBAUM, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-10.

KAPLAN, D.R. & MILLER, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 381-391.

KAWAI, F. & MIYACHI, E. (2000). Odorants suppress voltage-gated currents in retinal horizontal cells in goldfish. *Neurosci. Lett.*, **281**, 151-4.

KAWAMATA, M. & OMOTE, K. (1996). Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain*, **68**, 85-96.

KAYSER, V. & GUILBAUD, G. (1987). Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. *Pain*, **28**, 99-107.

KENNEY, A.M. & KOCSIS. (1998). Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein binding activity by c-Jun and JunD in adult rat dorsal root ganglia in vivo. *J. Neurosci.*, **18**, 1318-1328.

KERR, B.J., BRADBURY, E.J., BENNETT, D.L.H., TRIVEDI, P.M., DASSAN, P., FRENCH, J., SHELTON, D.B., MCMAHON, S.B. & THOMPSON, S.W.N. (1999). Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory input and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J. Neurosci.*, **19**, 5138-5148.

KERR, B.J., SOUSLOVA, V., MCMAHON, S.B. & WOOD, J.N. (2001). A role for the TTX-resistant sodium channel Nav 1.8 in NGF-induced hyperalgesia, but not neuropathic pain. *Neuroreport*, **12**, 3077-3080.

KIM, S.K. & CHUNG, J.M. (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, **50**, 355-363.

KIM, C.H., OH, Y., CHUNG, J.M. & CHUNG, K. (2001). The changes in expression of three subtypes of TTX sensitive sodium channels in sensory neurons after spinal nerve ligation. *Mol. Brain Res.*, **95**, 153-161.

KIM, C.H., OH, Y., CHUNG, J.M. & CHUNG, K. (2002). Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci. Lett.*, **323**, 125-128.

KOLTZENBURG, M. (1998). Painful neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, **11**, 515-521.

KOMORI, T., FUJIWARA, R., TANIDA, M. & NOMURA, J. (1995). Potential antidepressant effects of lemon odor in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **5**, 477-480.

KNABL, J., WITSCHI, R., HOSL, K., REINOLD, H., ZEILHOFER, U.B., AHMADI, S., BROCKHAUS, J., SERGEJEVA, M., HESS, A., BRUNE, K., FRITSCHY, J.M., RUDOLPH, U., MOHLER, H. & ZEILHOFER, H.U. (2008). Reversal of pathological pain through specific spinal GABAA receptor subtypes. *Nature*, **451**, 330-4.

KUHN, D.C. & WILLIS, A.L. (1973). Prostaglandin E2, inflammation and pain threshold in rat paws. *Br. J. Pharmacol.*, **49**, 183-184.

- LA BUDA, C.J. & LITTLE, P.J. (2005). Pharmacological evaluation of the selective spinal nerve ligation model of neuropathic pain in the rat. *J. Neurosci. Methods*, **144**, 175-181.
- LABUDA, C.J., KOBLISH, M., TUTHILL, P., DOLLE, R.E. & LITTLE, P.J. (2006). Antinociceptive activity of the selective iNOS inhibitor AR-C102222 in rodent models of inflammatory, neuropathic and post-operative pain. *Eur. J. Pain*, **10**, 505-512.
- LAI, J., GOLD, M.S., KIM, C.S., BIAN, D., OSSIPOV, M.H., HUNTER, J.C. & PORRECA, F. (2002). Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain*, **95**, 143-152.
- LAI, J., PORRECA, F., HUNTER, J.C. & GOLD, M.S. (2004). Voltage-gated sodium channel and hyperalgesia. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 371-397.
- LAIRD, M.A. & GIDAL, B.E. (2000). Use of gabapentin in the treatment of neuropathic pain. *Ann. Pharmacother.*, **34**, 802-807.
- LAWLOR, M.A. & ROTWEIN, P. (2000). Insulin-like growth factor-mediated muscle cell survival: central roles for Akt and cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8983-8995.
- LE, Y. & SAUER, B. (2001). Conditional gene knockout using Cre recombinase. *Mol. Biotechnol.*, **17**, 269-275.
- LEHRNER, J., ECKERSBERGER, C., WALLA, P., POTSCHE, G. & DEECKE, L. (2000). Ambient odor of orange in a dental office reduces anxiety and improves mood in female patients. *Physiol. Behav.*, **71**, 83-86.
- LEVER, I., CUNNINGHAM, J., GRIST, J., YIP, P.K. & MALCANGIO, M. (2003). Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 1169-74.
- LEWIN, G.R., RITTER, A.M. & MENDELL, L.M. (1993). Nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the neonatal and adult rat. *J. Neurosci.*, **13**, 2136-48.
- LIAPI, C., ANIFANDIS, G., CHINOU, I, KOURONAKIS, A.P., THEODOSOPOULOS, S. & GALANOPOULOU, P. (2007). Antinociceptive properties of 1,8-Cineole and beta-pinene, from the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* leaves, in rodents. *Planta Med.*, **73**, 1247-54.

- LINDIA, J.A., KOHLER, M.G., MARTIN, W.J. & ABBADIE, C. (2005a). Relationship between sodium channel NaV1.3 expression and neuropathic pain behavior in rats. *Pain*, **117**, 145-153.
- LINDIA, J.A., MCGOWAN, E., JOCHOWITZ, N. & ABBADIE, C. (2005b). Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J. Pain*, **6**, 434-8.
- LIU, T., KNIGHT, K.R. TRACEY, D.J. (2000a). Hyperalgesia due to nerve injury-Role of peroxynitrite. *Neuroscience*, **97**, 125–131.
- LIU, T., VAN ROOIJEN, N. & TRACEY, D.J. (2000b). Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain*, **86**, 25–32.
- LU, B. & FIGUROV, A. (1997). Role of neurotrophins in synapse development and plasticity. *Rev. Neurosci.*, **8**, 1-12.
- LUCIANO, C.A., PARDO, C.A. & MCARTHUR, J.C. (2003). Recent developments in the HIV neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.*, **16**, 403-9.
- LUO, Z.D., CHAPLAN, S.R., HIGUERA, E.S., SORKIN, L.S., STAUDERMAN, K.A., WILLIAMS, M.E. & YAKSH, T.L. (2001). Upregulation of dorsal root ganglion alpha2delta calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J.Neurosci.* **21**, 1868-1875.
- LUO, Z. D., CALCUTT, N. A., HIGUERA, E. S., VALDER, C. R., SONG, Y.H., SVENSSON, C. I. & MYERS, R. R. (2002). Injury type-specific calcium channel alpha2delta1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 1199-1205.
- MAVES, T.J., PECHMAN, P.S., GEBHART, G.F. & MELLER, S.T. (1993). Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, **54**, 57–69.
- MALLUCCI, G.R., RATTE', S., ASANTE, E.A., LINEHAN, J., GOWLAND, I., JEFFERYS, J.G.R. & COLLINGE, J. (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.*, **21**, 202-210.

- MANEUF, Y.P., HUGHES, J. & MCKNIGHT, A.T. (2001). Gabapentin inhibits the substance P-facilitated K<sup>+</sup>-evoked release of [3H] glutamate from rat caudal trigeminal nucleus slices. *Pain*, **93**, 191–196.
- MARAIS, E., KLUGBAUER, N. & HOFMANN, F. (2001). Calcium channel alpha2delta1 subunits structure and gabapentin binding. *Mol. Pharmacol.*, **59**, 1243–1248.
- MARKUS, A., ZHONG, J. & SNIDER, W.D. (2002). Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron*, **35**, 65-76.
- MCGIMPSEY, J.A. & PORTER, N.G. (1999). In "*Lavander, A Grower's Guide for Commercial Production*". New Zeland Institute for Crop & Food Research Ltd., New Zeland.
- MCMAHON, S.B., CAFFERTY, W.B. & MARCHAND, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.*, **192**, 444–462.
- MCQUAY, H.J., TRAMER, M., NYE, B.A., CARROLL, D., WIFFEN, P.J. & MOORE, R.A. (1996). A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain*, **68**, 217-27.
- MEIER, R., ALESSI, D.R., CRON, P., ANDJELKOVIC, M. & HEMMING, B.A. (1997). Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase B beta. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30491-30497.
- MELLICK, G.A. & MELLICK, L.B. (1997). Reflex sympathetic dystrophy treated with gabapentin. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, **78**, 98-105.
- MELZACK, R. & WALL, P.D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, **150**, 971-979.
- MENDOZA, M.C. & BLENIS, J. (2007). PHLPPing it off: phosphatases get in the Akt. *Mol. Cell.*, **25**, 798-800.
- METCALFE, D.D., BARAM, D. & MEKORI, Y.A. (1997). Mast cells. *Physiol. Rev.*, **77**, 1033–1079.
- MILETIC, G., PANKRATZ, M.T. & MILETIC, V. (2002). Increases in the phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and decreases in the content of calcineurin accompany thermal hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. *Pain*, **99**, 493-500.

MILLAN, M.J., MILLAN, M.H., CZLONKOWSKI, A., HOLT, V., PILCHER, C.W., HERZ, A. & COLPAERT, F.C. (1986). A model of chronic pain in the rat: response of multiple opioid systems to adjuvant-induced arthritis. *J. Neurosci.*, **6**, 899-906.

MILLAN, M.J., CZLONKOWSKI, A., MORRIS, B., STEIN, C., ARENDT, R., HUBER, A., HOLT, V. & HERZ, A. (1988). Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain*, **35**, 299-312.

MILLIGAN, E.D., ZAPATA, V., CHACUR, M., SCHOENIGER, D., BIEDENKAPP, J., O'CONNOR, K.A., VERGE, G.M., CHAPMAN, G., GREEN, P., FOSTER, A.C., NAEVE, G.S., MAIER, S.F. WATKINS, L.R. (2004). Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2294–2302.

MITCHELL, S.W. (1872). Injuries of nerves and their consequences. J.B. Lippincott, Philadelphia.

MOALEM, G. & TRACEY, D.J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Reviews*, **51**, 240-264.

MOUFIDA, S. & MARZOUK, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem.*, **62**, 1283-1289.

MURGA, C., LAGUINGE, L., WETZKER, R., CUADRADO, A. & GUTKIND, J. S. (1998). Activation of Akt/protein kinase B by G protein-coupled receptors: A role for  $\alpha$  and  $\beta\gamma$  subunits of heterotrimeric G proteins acting through phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. *J. Biol. Chem.*, **273**, 19080-19085.

MURGA, C., FUKUHARA, S. & GUTKIND, J. S. (2000). A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$  in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12069-12073.

MYERS, R.R., CAMPANA, W.M. & SHUBAYEV, V.I. (2006). The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov. Today*, **11**, 8-20.

MORRONE, L.A., PELLE, C., AMANTEA, D., ROMBOLA', L., CORASANITI, M.T. & BAGETTA, G. (2006). Evidence that systemic administration of the essential oil of bergamot minimizes elevation of glutamate and aspartate in the brain cortex of ischemic rat.

In “Proceedings of the British Pharmacological Society” at <http://www.pA2online.org/abstracts/Vol4issue2abst057P>.

MORRONE, L.A., ROMBOLA', L., PELLE, C., CORASANITI, M.T., ZAPPETTINI, S., PAUDICE, P., BONANNO, G. & BAGETTA, G. (2007). The essential oil of bergamot enhances the levels of amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rat: implication of monoterpene hydrocarbons. *Pharmacol. Res.*, **55**, 255-62.

NAGI, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, **26**, 99-109.

NARUSUYE, K., KAWAI, F., MATSUZAKI, K. & MIYACHI, E. (2005). Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells. *J. Neural Transm.*, **112**, 193-203.

NASSAR, M.A., STIRLING, L.C., FORLANI, G., BAKER, M.D., MATTHEWS, E.A., DICKENSON, A.H. & WOOD, J.N. (2004). Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *P.N.A.S. U. S. A.*, **101**, 12706-12711.

NASSAR, M.A., LEVATO, A., STIRLING, L.C. & WOOD, J.N. (2005). Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Nav1.7 and Nav1.8. *Molecular Pain*, **1**, 1-24.

NASSAR, M.A., BAKER, M.D., LEVATO, A., INGRAM, R., MALLUCCI, G., McMAHON, S.B. & WOOD, J.N. (2006). Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Molecular Pain*, **2**, 33-43.

NATHAN, C.F. (1987). Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, **79**, 319-326.

NEWTON, R.A., BINGHAMB, S., CASEC, P.C., SANGERB, G.J. & LAWSON, S.N. (2001). Dorsal root ganglion neurons show increased expression of the calcium channel alpha-2 delta-1 subunit following partial sciatic nerve injury. *Mol. Brain Res.*, **95**, 1-8.

NICHOLS, M.L., ALLEN, B.J., ROGERS, S.D., GHILARDI, J.R., HONORE, P., LUGER, N.M., FINKE, M.P., LI, J., LAPPI, D.A., SIMONE, D.A. & MANTYH, P.W. (1999). Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*, **286**, 1558-61.

OBATA, K., & NOGUCHI, K. (2004). MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.*, **74**, 2643– 2653.

ODABASOGLU, F., HALICI, Z., CAKIR, A., HALICI, M., AYGUN, H., SULEYMAN, H., CADIRCI, E. & ATALAY, F. (2008). Beneficial effects of vegetable oils (corn, olive and sunflower oils) and  $\alpha$ -tocopherol on anti-inflammatory and gastrointestinal profiles of indomethacin in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **591**, 300–306.

OKAMOTO, K., MARTIN, D.P., SCHMELZER, J.D., MITSUI, Y. & LOW, P.A. (2001). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp. Neurol.*, **169**, 386–91.

OKUYAMA, S., SAWASAKI, E. & YOKOGOSHI, H. (2004). Conductor compounds of phenylpentane in *Mycocleptodonoides aitchisonii* mycelium enhance the release of dopamine from rat brain striatum slices. *Nutr. Neurosci.*, **7**, 107-111.

OLSSON, Y. (1967). Degranulation of mast cells in peripheral nerve injuries. *Acta Neurol. Scand.*, **43**, 365–374.

OLSSON, Y. (1968). Mast cells in the nervous system. *Int. Rev. Cytol.*, **24**, 27–70.

O'RIELLY, D.D. & LOOMIS, C.W. (2006). Increased expression of cyclooxygenase and nitric oxide isoforms, and exaggerated sensitivity to prostaglandin E2, in the rat lumbar spinal cord 3 days after L5-L6 spinal nerve ligation. *Anesthesiol.*, **104**, 328-337.

PATAPOUTIAN, A. & REICHARDT, L.F. (2001). Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **11**, 272-280.

PEANA, A.T., D'AQUILA, P.S., PANIN, F., SERRA, G., PIPPIA, P. & MORETTI, D.L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomed.*, **9**, 721-726.

PEANA, A.T., MARZOCCO, S., POPOLO, A. & PINTO, A. (2006). (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*, **78**, 719 - 723.

PEANA, A.T., RUBATTU, P., PIGA, G.G., FUMAGALLI, S., BOATTO, G., PIPPIA, P. & DE MONTIS, G. (2005). Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. *Life Sciences*, **78**, 2471-2474.

- PEANA, A.T., DE MONTIS, MG., SECHI, S., SIRCANA, G., D'AQUILA, PS. & PIPPIA, P. (2004a). Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. *Eur. J. Pharmacol.*, **497**, 279-84.
- PEANA, A.T., DE MONTIS, MG., NIEDDU, E., SPANO, MT., D'AQUILA, PS. & PIPPIA, P. (2004b). Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur. J. Pharmacol.*, **485**, 165-74.
- PEANA, A.T., D'AQUILA, P.S., CHESSA, M.L., MORETTI, D.L., SERRA, G. & PIPPIA, P. (2003). (-)-linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur. J. Pharmacol.*, **460**, 37-41.
- PEANA, A.T., D'AQUILA, P.S., PANIN, F., SERRA, G., PIPPIA, P. & MORETTI, D.L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomed.*, **9**, 721-726.
- PERKINS, N.M. & TRACEY, D.J. (2000). Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. *Neuroscience*, **101**, 745-757.
- PERKINTON, M.S., IP, J.K., WOOD, G.L., CROSTHWAITE, A.J. & Williams, R.J. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is a central mediator of NMDA receptor signalling to MAP kinase (Erk1/2), Akt/PKB and CREB in striatal neurons. *J. Neurochem.*, **80**, 239-254.
- PERRY, V.H., BROWN, M.C. & GORDON, S. (1987). The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.*, **165**, 1218-1223.
- PEZET, S., MALCANGIO, M. & MCMAHON, S.B. (2002). BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Res. Rev.*, **40**, 240-249.
- PEZET, S., SPYROPOULOS, A., WILLIAM, R.J. & MCMAHON, S.B. (2005). Activity-dependent phosphorylation of Akt/PKB in adult DRG neurons. *Eur. J. Neurosci.*, **21**, 1785-97.
- PIEHL, F. & LIDMAN, O. (2001). Neuroinflammation in the rat-CNS cells and their role in the regulation of immune reactions. *Immunol. Rev.*, **184**, 212-225.
- PORRECA, F., LAI, J., BIAN, D., WEGERT, S., OSSIPOV, M.H., EGLIN, R.M., KASSOTAKIS, L., NOVAKOVIC, S., RABERT, D.K., SANGAMESWARAN, L. & HUNTER, J.C. (1999). A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive

sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *P.N.A.S.USA*, **96**, 7640-7644.

PRICE, S. & PRICE, L. (1995). In "*Aromatherapy for health professionals*", pp. 15. Edinburgh: Churchill Livingstone.

RAGHAVENDRA, V., TANGA, F. & DELEO, J.A. (2003). Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 624–630.

RE, L., BAROCCI, S., SONNINO, S., MENCARELLI, A., VIVANI, C., PAOLUCCI, G., SCARPANTONIO, A., RINALDI, L. & MOSCA, E. (2000). Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol. Res.*, **42**, 177-182.

RENGANATHAN, M., CUMMINS, T.R. & WAXMAN, S.G. (2001). Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J. Neurophysiol.*, **86**, 629-40.

REYNOLDS, D.V. (1969). Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, **164**, 444–5.

RIOS, M., FAN, G., FEKETE, C., KELLY, J., BATES, B., KUEHN, R., LECHAN, R.M. & JAENISCH, R. (2001). Conditional deletion of Brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 1748-1757.

RIVERA, C., VOIPIO, J., THOMAS-CRUSELLS, J., LI, H., EMRI, Z., SIPILA, S., PAYNE, J.A., MINICHIELLO, L., SAARMA, M. & KAILA, K. (2004). Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2. *J. Neurosci.*, **24**, 4683– 4691.

ROG, D.J., NURMIKKO, T.J., FRIEDE, T. & YOUNG, C.A. (2005). Randomized, controlled trial of cannabis-based medicine in central pain in multiple sclerosis. *Neurology*, **65**, 812-9.

ROSENBERG, J.M., HARRELL, C., RISTIC, H., WERNER, R.A. & DE ROSAYRO, A.M. (1997). The effect of gabapentin on neuropathic pain. *Clin. J. Pain*, **13**, 251–255.

- ROSNER, H., RUBIN, L. & KESTENBAUM, A. (1996). Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. *Clin. J. Pain*, **12**, 56-8.
- ROWBOTHAM, M., HARDEN, N., STACEY, B., BERNSTEIN, P. & MAGNUS-MILLER, L. (1998). Gabapentin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.*, **280**, 1837-1842.
- RUSSO, R., CAVALIERE, F., BERLIOCCI, L., NUCCI, C., GLIOZZI, M., MAZZEI, C., TASSORELLI, C., CORASANITI, M.T., ROTIROTI, D., BAGETTA, G. & MORRONE, L.A. (2008). Modulation of pro-survival and death-associated pathways under retinal ischemia/reperfusion: effects of NMDA receptor blockade. *J. Neurochem.*, **107**, 1347-57.
- SALE, E.M. & Sale, G.J. (2008). Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 113-127.
- SANTOS, F.A., JEFERSON, F.A., SANTOS, C.C., SILVEIRA, E.R. & RAO, V.S. (2005). Antinociceptive effects of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Sci.*, **77**, 2953-63.
- SAYYAH, M., SAROUKHANI, G., PEIROVI, A. & KAMALINEJAD, M. (2003). Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* Linn. *Phytother. Res.*, **17**, 733-6.
- SCHMADER, K.E. (2002). Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *Clin. J. Pain*, **18**, 350-4.
- SCHOLZ, J. & WOOLF, C.J. (2002). Can we conquer pain? *Nat. Neurosci.*, **5**, 1062-7.
- SCHREIBELT, G., KOOIJ, G., REIJERKERK, A., VAN DOORN, R., GRINGHUIS, S.I., VAN DER POL, S., WEKSLER, B.B., ROMERO, I.A., COURAUD, P.O., POINTEK, J., BLASIG, I.E., DIJKSTRA, C.D., RONKEN, E. & DE VRIES, H.E. (2007). Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J.*, **21**, 3666-76.
- SEGAL, A.Z. & RORDORF, G. (1996). Gabapentin as a novel treatment for postherpetic neuralgia. *Neurology*, **46**, 1175-1176.

SELTZER, Z., DUBNER, R. & SHIRE, Y. (1990). A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, **43**, 205-218.

SILVA BRUM, L.F., ELISABETSKY, E. & SOUZA, D.O. (2001a). Effects of linalool on [3H] MK801 and [3H] muscimol binding in mouse cortical membranes. *Phytother. Res.*, **15**, 422-425.

SILVA BRUM, L.F., EMANUELLI, T., SOUZA, D.O. & ELISABETSKY, E. (2001b). Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. *Neurochem. Res.*, **26**, 191-194.

SINDRUP, S.H. & JENSEN, T.S. (1999). Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain*, **83**, 389-400.

SIMAKJORNBOON, N., SZERLIP, N.J., GOZAL, E., ANONETAPIPAT, J.W. & GOZAL, D. (2001). In vivo PDGF beta receptor activation in the dorsocaudal brainstem of the rat prevents hypoxia-induced apoptosis via activation of Akt and BAD. *Brain Res.*, **895**, 111-118.

SLACK, S.E. & THOMPSON, S.W. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor 1 phosphorylation in rat spinal cord. *Neuroreport*, **13**, 1967-1970.

SLACK, S.E., PEZET, S., MCMAHON, S.B., THOMPSON, S.W. & MALCANGIO, M. (2004). *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 1769-1778.

SLEEPER, A.A., CUMMINS, T.R., DIB-HAJJ, S.D., HORMUZDIAR, W., TYRRELL, L., WAXMAN, S.G. & BLACK, J.A. (2000). Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *J. Neurosci.*, **20**, 7279-89.

SMALLWOOD, J., BROWN, R., COULTER, F., IRVINE, E. & COPLAND, C. (2001). Aromatherapy and behaviour disturbances in dementia: a randomized controlled trial. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **16**, 1010-1013.

SOMMER, C., SCHMIDT, C. & GEORGE, A. (1998). Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp. Neurol.*, **151**, 138-142.

- SOMMER, C. & KRESS, M. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.*, **361**, 184–187.
- SOUSA, O.V., SILVERIO, M.S., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., MATHEUS, F.C., YAMAMOTO, C.H. & ALVES, M.S. (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leale. *J. Pharma. Pharmacol.*, **60**, 771-7.
- STIRLING, C.L., FORLANI, G., BAKER, M.D., WOOD, J.N., MATTHEWS, E.A., DICKENSON, A.H. & NASSAR, M.A. (2005). Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous Nav1.8-Cre recombinase mice. *Pain*, **113**, 27-36.
- STUESSE, S.L., CRISP, T., MCBURNEY, D.L., SCHECHTER, J.B., LOVELL, J.A. & CRUCE, W.L.R. (2001). Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation. *Exp. Brain Res.*, **137**, 219-227.
- SUMAN-CHAUHAN, N., WEBDALE, L., HILL, D.R. & WOODRUFF, G.N. (1993). Characterisation of [3H]gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies. *Eur. J. Pharmacol.*, **244**, 293–301.
- SUN, H., REN, K., ZHONG, C. M., OSSIPOV, M. H., MALAN, T. P., LAI, J. & PORRECA, F. (2001). Nerve injury-induced tactile allodynia is mediated via ascending spinal dorsal column projections. *Pain*, **90**, 105– 111.
- TABARELLI, Z., BERLESE, D.B., SAUZEM, P.D., MELLO, C.F., & RUBIN, M.A. (2003). Antinociceptive effects oh Cremophor EL orally administered to mice. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **36**, 119-123.
- TAIWO, Y.O., LEVINE, J.D., BURCH, R.M., WOO, J.E. & MOBLEY, W.C. (1991). Hyperalgesia induced in the rat by the amino-terminal octapeptide of the nerve growth factor. *P.N.A.S. U.S.A.*, **88**, 5144-8.
- TANGA, F.Y., RAGHAVENDRA, V. & DELEO, J.A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.*, **45**, 397–407.
- TANGA, F.Y., NUTILE-MCMENEMY, N. DELEO, J.A. (2005). The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 5856–5861.

TAYLOR, C.P., GEE, N.S., SU, T.Z., KOCSIS, J.D., WELTY, D.F., BROWN, J.P., DOOLEY, D.J., BODEN, P., & SINGH, L. (1998). A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology. *Epilepsy Res.*, **29**, 233–249.

TAYLOR, C.C. (2000). Platelet-derived growth factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and ras-extracellular signal-regulated kinase-1/2 kinase signalling pathways via the platelet-derived growth factor-beta receptor. *Endocrinol.*, **141**, 1545-1553.

TOKER, A. & CANTLEY, L.C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, **387**, 673–676.

TOKER, A. & NEWTON, A.C. (2000). Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8271-8274.

TOLEDO-ARAL, J.J., MOSS, B.L., HE, Z.J, KOSZOWSKI, A.G., WHISENAND, T., LEVINSON, S.R., WOLF, J.J., SILOS-SANTIAGO, I., HALEGOUA, S., MANDEL, G. (1997). Identification of PN1, a predominant voltage-dependent sodium channel expressed principally in peripheral neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1556-1569.

TONUSSI, C. & FERREIRA, S.H. (1992). Rat-knee joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain*, **48**, 421-427.

TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., KOIZUMI, S., MIZOKOSHI, A., KOHSAKA, S., SALTER, M.W. & INOUE, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature*, **424**, 778– 783.

TSUDA, M., INOUE, K. & SALTER, M.W. (2005). Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in “small” glia. *Trends Neurosci.*, **28**, 101–107.

UEDA, H. (2006). Molecular mechanisms of neuropathic pain–phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol. Therapeutics*, **109**, 57-77.

VANEGAS, H. & SCHAIBLE, H.G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res. Reviews*, **46**, 295-309.

VERGE, G.M., MILLIGAN, E.D., MAIER, S.F., WATKINS, L.R., NAEVE, G.S. & FOSTER, A.C. (2004). Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1)

distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 1150–1160.

VERZERA, A., TROZZI, A., STAGNO D'ALCONTRES, I., MONDELLO, L., DUGO, G. & SEBASTIANI, E. (1998). The composition of the volatile fraction of Calabrian bergamot essential oil. *Riv. Ital. EPPOS*, **25**, 17-38.

VEVES, A., BACKONJA, M. & MALIK, R.A. (2008). Painful diabetic neuropathy: epidemiology, natural history, early diagnosis, and treatment options. *Pain Med.*, **9**, 660-74.

VILARDT, F. (2005). Microglia: phagocyte and glia cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 17–21.

WALCZAK, J.S., PICHETTE, V., LEBLOND, F., DESBIENS, K. & BEAULIEU, P. (2005). Behavioral, pharmacological and molecular characterization of the saphenous nerve partial ligation: a new model of neuropathic pain. *Neuroscience*, **132**, 1093–1102.

WANG, L.X. & WANG, Z.J. (2003). Animal and cellular models of chronic pain. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 949-965.

WARFIELD, C.A. & FAUSETT, H.J. (2002). Pathophysiology of Pain. In *Manual of Pain Management, Second Edition*. Eds. Lippincott Williams & Williams. USA. pp. 6-7.

WATKINS, L.R., MILLIGAN, E.D. & MAIER, S.F. (2001). Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci.*, **24**, 450–455.

WAXMAN, S.G., KOCSIS, J.D. & BLACK, J.A. (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol.*, **72**, 466-470.

WIEBE, E. (2000). A randomized trial of aromatherapy to reduce anxiety before abortion. *Eff. Clin. Pract.* **3**, 188-190.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A. & NUSS, G.W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544-547.

WOOLF, C.J., SHORTLAND, P. & COGGESHALL, R.E. (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, **355**, 75-78.

WOOLF, C.J. & MANNION, R.J. (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, **353**, 1959-1964.

WOOLF, C.J. (2004). Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.*, **74**, 2605-10.

XU, J.T., TU, H.Y., XIN, W.J., LIU, X.G., ZHANG, G.H. & ZHAI, C.H. (2007). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp. Neurol.*, **206**, 269-279.

YAJIMA, Y., NARITA, M., USUI, A., KANEKO, C., MIYATAKE, M., NARITA, M., YAMAGUCHI, T., TAMAKI, H., WACHI, H., SEYAMA, Y. & SUZUKI, T. (2005). Direct evidence for the involvement of brain-derived neurotrophic factor in the development of a neuropathic pain-like state in mice. *J. Neurochem.*, **93**, 584-594.

YANG, Y., WANG, Y., LI, S., XU, Z., LI, H., MA, L., FAN, J., BU, D., LIU, B., FAN, Z., WU, G., JIN, J., DING, B., ZHU, X. & SHEN, Y. (2004). Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *J. Med. Genet.*, **41**, 171-174.

YIP, Y.B. & TAM, A.C.Y. (2008). An experimental study on the effectiveness of massage with aromatic ginger and orange essential oil for moderate-to-severe knee pain among the elderly in Hong Kong. *Compl. Ther. Medicine*, **16**, 131-138.

YIP, Y.B. & TSE, S.H-M.(2006). An experimental study on the effectiveness of acupressure with aromatic lavender essential oil for sub-acute, non-specific neck pain in Hong Kong. *Compl. Ther. Clinical Practice*, **12**, 18-26.

YU, F., SUGAWARA, T., MAIER, C.M., HSIEH, L.B. & CHAN, P.H. (2005). Akt/Bad signaling and motor neuron survival after spinal cord injury. *Neurobiol. Disease*, **20**, 491-499.

ZHAO, J., SEEREERAM, A., NASSAR, M.A., LEVATO, A., PEZET, S., HATHAWAY, G., MORENILLA-PALAO, C., STIRLING, C., FITZGERALD, M., McMAHON, S.B., RIOS, M. & WOOD, J.N. (2006). Nociceptor-derived Brain-Derived Neurotrophic Factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol. Cel. Neurosci.*, **31**, 539-548.

ZHANG, X., BAO, L., SHI, T.J., JU, G., ELDE, R. & HOLKFELT, T. (1998). Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience*, **82**, 223-240.

ZHOU, X.F., CHIE, E.T., DENG, Y.S., ZHONG, J.H., XUE, Q., RUSH, R.A. & XIAN, C.J. (1999). Injured primary sensory neurons switch phenotype for brain-derived neurotrophic factor in the rat. *Neurosci.*, **92**, 841-53.

ZHOU, X.F., DENG, Y.S., XIAN, C.J. & ZHONG, J.H. (2000). Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 100-5.

ZHUANG, Z.Y., XU, H., CLAPHAM, D.E. & JI, R.R. (2004). Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J. Neurosci.*, **24**, 8300–8309.

ZUO, Y., PERKINS, N.M., TRACEY, D.J. & GECZY, C.L. (2003). Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*, **105**, 467-479.

## PRODUZIONE SCIENTIFICA

### Lavori *in extenso*

NASSAR, M.A., LEVATO, A., STIRLING, L.C. & WOOD, J.N. (2005). Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Nav1.7 and Nav1.8. *Molecular Pain*, **1**, 1-24.

ZHAO, J., SEEREERAM, A., NASSAR, M.A., LEVATO, A., PEZET, S., HATHAWAY, G., MORENILLA-PALAO, C., STIRLING, C., FITZGERALD, M., McMAHON, S.B., RIOS, M. & WOOD, J.N. (2006). Nociceptor-derived Brain-Derived Neurotrophic Factor regulates acute and inflammatory but not neuropathic pain. *Mol. Cel. Neurosci.*, **31**, 539-548.

NASSAR, M.A., BAKER, M.D., LEVATO, A., INGRAM, R., MALLUCCI, G., McMAHON, S.B. & WOOD, J.N. (2006). Nerve injury induces robust allodynia and ectopic discharges in Nav1.3 null mutant mice. *Molecular Pain*, **2**, 33-43.

FALCONE, A., AMANTEA, D., LEVATO, A., ARONE, F., MORRONE, L.A., BAGETTA, D., FLORIO, L., LISTA, M.R. & BAGETTA, G. (2006). Outcomes of a pharmacoepidemiological survey on the antibiotic treatment of uncomplicated acute cystitis in community. *Pharmacol. Res.*, **53**, 193-6.

### Comunicazioni a congressi

NASSAR, MA., ZHAO, J., STIRLING, C., BIANCARDI, A., DREW, L., BAKER, M., MORENILLA-PALAO, C., FOULKES, T., DONIER, E., ABRAHAMSEN, B., RUGIERO, F., LEVATO, A., TOWERS, P., CHAN, K. & WOOD, JN. "Discovery and Validation of novel Pain Targets: Tissue-specific and inducible knockouts". Contributo a "The London Pain Consortium Clinical Meeting", King's College London, UK, 17 Marzo 2005.

MORENILLA-PALAO, C., NASSAR, MA., ZHAO, J., STIRLING, C., BIANCARDI, A., DREW, L., BAKER, M., FOULKES, T., DONIER, E., ABRAHAMSEN, B., RUGIERO, F., LEVATO, A., TOWERS, P., CHAN, K. & WOOD, J.N. "Discovery and Validation of novel Pain Targets: Microarrays and Real-time q-PCR". Contributo a "The London Pain Consortium Clinical Meeting", King's College London, UK, 17 Marzo 2005.

LEVATO, A., ZHAO, J., NASSAR, M.A. & WOOD, J.N. "Effects of BDNF nociceptor-specific gene deletion on neuropathic and inflammatory pain". Contributo a "VIII Workshop on Apoptosis and Medicine, Plasticity in Pain and Death", Parghelia (VV), Italy, 25-26 Maggio 2005.

LEVATO, A., ROMBOLA', L., MORRONE, L.A., CORASANITI, M.T., BAGETTA, G., WOOD, J. N. & BERLIOCCHI, L. "(-)-Linalool attenuates allodynia in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain in C57BL6 mice". Contributo a "IX Workshop on apoptosis in biology and medicine: Neuroinflammation in neuronal death and repair", Parghelia (VV), Italy, 13-16 Settembre 2006.