

1 INTRODUZIONE

1.1. I neuropeptidi: scoperta e caratteristiche

Negli anni '70 e '80 divenne evidente l'esistenza di una grande varietà di neuropeptidi sia a livello cerebrale sia in altre zone dell'organismo, e nuovi membri di questa classe di mediatori vengono aggiunti ancora oggi (Civelli et al. 2001). I mediatori endogeni di natura peptidica sono generalmente costituiti da una catena lineare da 3 a 200 aminoacidi e sono fino a 50 volte più grandi dei neurotrasmettitori classici; sono più piccoli delle proteine e possiedono una struttura tridimensionale meno complessa. Spesso, i peptidi contengono legami intramolecolari disolfurici che conferiscono alla molecola una conformazione parzialmente ciclica e possono comprendere due o più catene separate legate da legami disolfurici. La conformazione che i peptidi assumono quando sono in soluzione è scarsamente definita in quanto si tratta di molecole caratterizzate da un'elevata flessibilità. Le proteine più grandi sono caratterizzate da una conformazione più rigida, ma a causa della loro dimensione, interagiscono generalmente con più siti del recettore (Bentacur et al. 1997). La struttura di un peptide è direttamente codificata nel genoma, la cellula produce una proteina precursore *pre-pro-peptide* nella quale è contenuta la sequenza peptidica, e con essa gli enzimi proteolitici specifici che la scindono liberando il peptide attivo (Cullinan et al. 1991). Importanti sono soprattutto gli effetti di endopeptidasi che idrolizzano il pro peptide in tratti specifici della sua sequenza aminoacidica, portando alla formazione di uno o più peptidi finali dotati di attività biologica, all'interno dei granuli (Benfenati et al. 2004). In genere, sia a livello del reticolo endoplasmatico rugoso che dell'apparato di Golgi, i peptidi vanno incontro a modificazioni post-traduzionali quali l'amidazione del terminale carbossilico, la glicosilazione, l'acetilazione, la carbossilazione, la solfatazione o la fosforilazione di specifici residui (Perone et al. 1997).

Nelle caratteristiche globali la trasmissione peptidergica ha aspetti in comune con la trasmissione operata dai classici trasmettitori non peptidici. La differenza principale consiste nel fatto che nei corpi cellulari vengono sintetizzati granuli contenenti i precursori peptidici che verranno poi indirizzati nei siti di membrana plasmatica dove avverrà il processo di neurosecrezione. Questi granuli, rispetto alle vescicole sinaptiche che contengono i neurotrasmettitori classici, sono più grossi e più densi al microscopio elettronico. Una volta liberati i neuropeptidi, i granuli non possono essere ricaricati in situ, ma vengono sostituiti da nuovi granuli pre-caricati a livello del soma. Il turnover del neuropeptide è quindi meno rapido di quello dei trasmettitori classici (Cullinan et al. 1991). In generale per attivare il rilascio del neuropeptide occorrono frequenze di stimolazione del neurone più elevate di quelle richieste per la liberazione dei trasmettitori classici; una piccola parte del peptide può essere liberata con il meccanismo della secrezione costitutiva (Benfenati et al. 2004). I neuropeptidi rilasciati dal neurone non sono ricatturati dai terminali sinaptici, come le amine biogene e non sono distrutti rapidamente.

La scomparsa dei peptidi nei siti attivi è lenta, e principalmente affidata alla proteolisi enzimatica e alla caduta di concentrazione peptidica in funzione della diluizione. La soglia di attivazione per uno specifico recettore dipende strettamente dall'affinità di legame peptide-recettore. Nello stato di bassa affinità il recettore è poco sensibile al ligando e ne occorre un'elevata concentrazione per attivare il recettore stesso; viceversa se il recettore è molto sensibile al peptide. L'attività proteolitica è talvolta intensa, ma in molti casi non rappresenta la principale causa di scomparsa del messaggio peptidico. Le peptidasi possono controllare l'attività del trasmettitore peptidico in almeno tre modi:

- a) contribuiscono alla liberazione della forma attiva del peptide;
- b) alterano la specificità recettoriale del peptide;
- c) estinguono l'attività biologica del peptide (Benfenati et al. 2004).

Una volta liberati nello spazio extracellulare, i neuropeptidi possono essere esposti all'attività di endopeptidasi specifiche che generano frammenti con attività biologica e affinità recettoriale anche diversa dal peptide originario (Benfenati et al. 2004). Un aspetto singolare della trasmissione peptidergica è la localizzazione dei recettori per i peptici; spesso questi, infatti, non sono presenti a livello delle sinapsi a cui partecipano i terminali nervosi contenenti i relativi peptidi oppure possono essere presenti ma in modo non correlato con la quantità di peptide e con le azioni che esso esercita. Esistono pertanto numerosi casi di disaccordo spaziale fra sito di rilascio del peptide e sito di azione. Pertanto il peptide secreto deve raggiungere i suoi recettori che possono trovarsi a distanze anche notevoli dal sito di secrezione, e perché si possa stabilire il necessario legame peptide-recettore per la trasmissione, occorre che il peptide sia altamente selettivo e possieda elevata affinità per il recettore situato su neuroni distanti. A tale forma di trasmissione è stato dato il nome di *Volume Transmission*, o trasmissione extra-sinaptica per diffusione. L'elevata affinità necessaria spiega l'elevata numerosità dei neuropeptidi stessi e dei loro recettori in confronto a i pochi trasmettitori e recettori classici (Cella e Müller, 2004).

Le funzioni dei neuropeptidi variano dalla neurotrasmissione al ruolo di fattori di crescita. Sono presenti nelle cellule gliali, sono ormoni nel sistema endocrino, e messaggeri a livello del sistema immunitario (Baranano et al. 2001). I peptidi sono presenti in varie zone dell'organismo, dove probabilmente hanno funzioni di mediatori. Spesso sembra esserci una connessione fra gli effetti di un dato peptide in siti corporei diversi in relazioni a funzione fisiologiche coordinate. A tutt'oggi si può sostenere che il gran numero di informazioni raccolte a partire dal 1970 ha fornito unicamente pochi concetti generali circa il loro ruolo funzionale e ha indotto lo studio e lo sviluppo di nuovi farmaci sfruttando le caratteristiche di questi sistemi peptidergici al fine di poter trattare diverse patologie.

1.2 I principi della farmacologia inversa

I recettori accoppiati a proteine G (GPCR) formano una delle più vaste superfamiglie di geni (Vassilatis et al. 2003) e derivano dal concetto che i recettori che si accoppiano a proteine G per indurre risposte tramite secondi messaggeri, condividono caratteristiche strutturali simili, quali la tipologia a sette regioni transmembrana. I GPCR sono attivati da vari tipi di molecole di segnale quali monoamine, derivati di amminoacidi, peptidi così come molecole chemiotattiche, olfattive e dalla luce (Bockaert e Pin, 1999). Sono fortemente implicati nelle interazioni intercellulari. In particolare, tutti i recettori che sono attivati da peptidi bioattivi, e specialmente neuropeptidi, sono GPCR. Il riconoscimento del fatto che i GPCR condividano similarità di sequenza (Dixon et al. 1986) ha promosso l'applicazione di approcci di screening di omologia per la ricerca di nuovi recettori. Negli anni '80 e '90 tecniche di ibridizzazione a bassa stringenza e di screening di omologia basate su PCR, hanno portato all'identificazione di un centinaio di GPCR (Bunzow et al. 1988; Libert et al. 1989). Col completamento del sequenziamento del genoma umano, il numero di GPCR ha raggiunto il numero di circa 800 (Vassilatis et al. 2003).

L'identificazione dei GPCR sulla base delle similarità di sequenza, tuttavia, apre le porte ad un problema importante: la scoperta dei loro ligandi endogeni, cioè la determinazione della loro funzione fisiologica. In effetti, i primi resoconti delle ricerche su vasta scala basate sull'omologia ha portato all'identificazione di vari GPCR “orfani”, recettori in cerca dei loro ligandi (Bunzow et al. 1988; Libert et al. 1989). La soluzione a questa sfida è consistita nel fare degli screening sui GPCR nei confronti di potenziali ligandi, strategia che viene riferita come farmacologia inversa (Civelli et al. 2001). Ognuno dei recettori orfani viene fatto esprimere in cellule eucariotiche grazie alla trasfezione con cDNA e le cellule così ottenute, sono utilizzate come bersagli per determinare quale potenziale ligando si leghi al recettore orfano sia a livello della membrana sia per mezzo della sua capacità di indurre una risposta che coinvolge un secondo messaggero. Già nel 1988 si trovarono i primi GPCR “deorfanzizzati”: i recettori serotoninergico 5-HT_{1A} e dopaminergico D₂ (Bunzow et al. 1988; Fargin et al. 1988). A metà degli anni '90 numerosi gruppi si erano uniti a questa ricerca e circa 90 GPCR erano stati associati ai loro rispettivi ligandi naturali (Civelli et al. 2005). Tuttavia, mentre questo processo era in corso si riconobbe che il numero di GPCR sopravanzava il numero di ligandi conosciuti. Fu ideata una strategia finalizzata a trovare ligandi endogeni di GPCR orfani in tessuti che, si riteneva, li producessero (Civelli et al. 2001). L'identificazione di nuovi trasmettitori in grado di attivare GPCR orfani ha infatti rappresentato la “Stele di Rosetta” nella comprensione della funzione di questi recettori. L'approccio scientifico, finora risultato efficace, era la cosiddetta strategia del “recettore orfano” (Figura 1) di cui ricordiamo le fasi salienti:

- espressione del GPCR orfano, clonato in una linea cellulare eterologa;

- esposizione di questa linea cellulare trasfettata ad un estratto di tessuto che si ipotizza contenere il ligando naturale;
- registrazione delle modificazioni del secondo messaggero dopo l'eventuale attivazione del GPCR orfano; questa misura avviene confrontando parallelamente l'attività di cellule della stessa linea non trasfettata (campione di controllo);
- frazionamento del tessuto estratto e isolamento del componente attivo;
- determinazione della struttura chimica del componente attivo;
- sintesi chimica del componente attivo e comparazione con l'attività del ligando purificato, la quale dovrebbe dimostrarsi identica.

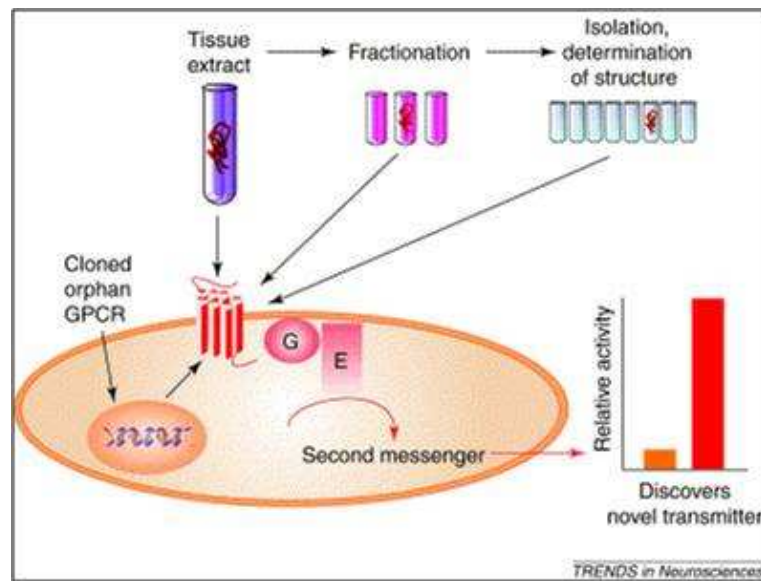


Figura 1
Strategia del recettore orfano (Civelli et al. 2001).

Questa strategia presenta due elementi incogniti: la natura chimica del trasmettitore ed il tipo di risposta del secondo messaggero indotta dall'attivazione del GPCR orfano. Queste variabili aggiunte al fatto che, anche in assenza di trasfezione di DNA, la linea cellulare esprime una varietà di recettori endogeni attivabili, rendono l'applicazione di tale strategia un processo che ha bisogno di controllo meticoloso e di costanti adeguamenti (Civelli, 1998). La deorfanzizzazione dei recettori è stata eseguita anche con l'utilizzo di miscele di ligandi sintetici in alternativa ai ligandi naturali; questo approccio viene identificato con il nome di "farmacologia inversa", come precedentemente indicato. La farmacologia inversa (Figura 2) risulta essere una versione ad alto rendimento del "metodo del recettore orfano". Vari ligandi, principalmente peptidi, lipidi e diversi composti olfattivi, mostrano caratteristiche che inducono a supporre una loro capacità di legare i GPCR.

Quindi, l'organizzazione di questi ligandi assieme alla sintesi di composti tra loro correlati, consente la costruzione di librerie di sostanze utilizzabili per la determinazione su ampia scala del legame ligando-recettore. Inoltre questo tipo di approccio tecnico permette anche

la possibilità di testare, casualmente, il legame di potenziali trasmettitori su una gamma di GPCR orfani (anche in questo caso espressi in cellule trasfettate) con la speranza che uno di essi attivi un corrispondente recettore. Questo metodo è tecnicamente più semplice rispetto alla strategia del recettore orfano, perché elimina l'esigenza di estrarre il possibile ligando dal tessuto, eseguirne il frazionamento e di determinarne la struttura.

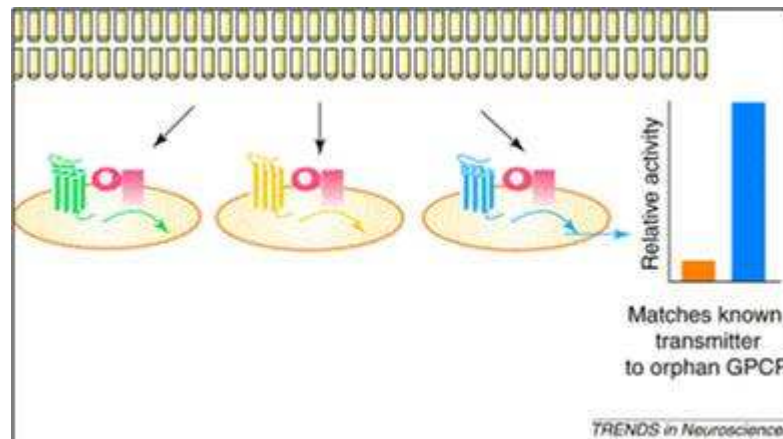


Figura 2
Farmacologia inversa (Civelli et al. 2001).

Nonostante il fatto che la tecnica, rispetto alla precedente risulti essere più semplice e veloce, il suo successo dipende dalla disponibilità di una vasta gamma di ligandi, spesso ostacolata dai costi proibitivi e dalle limitate possibilità economiche dell'ambiente accademico. Inoltre i ligandi, identificati in questo modo, non derivano direttamente da estratti di tessuto e pertanto potrebbero esistere in natura anche in forme più potenti. Se inizialmente, per la farmacologia inversa si prospettava un futuro limitato, una recente novità ha potuto drasticamente estenderne la relativa applicazione: l'ausilio delle banche genomiche e delle nuove tecnologie, le quali mirano ad automatizzare le operazioni manuali, riducendo ampiamente tempo e costi.

Applicando la strategia del recettore orfano, è stato identificato un eptadecapeptide come il ligando naturale del recettore ORL-1. E' stato denominato orfanina, e successivamente Nocicettina/Orfanina FQ (N/OFQ) e si è notato che condivide alcune somiglianze coi peptidi oppioidi nonostante la sua specificità per il recettore ORL-1 (Meunier et al. 1995; Reinscheid et al. 1995). Da allora si è dimostrato il suo coinvolgimento in varie funzioni fisiologiche come l'ansia, il dolore, la memoria e lo stress (Mogil e Pasternak, 2001). Questo successo ha aperto le porte alla ricerca di nuovi neuropeptidi. Dal 1995 più di 15 famiglie di nuovi neuropeptidi sono state scoperte utilizzando proprio la strategia del recettore orfano (Tabella 1).

	Anno di scoperta	Veglia	Altre funzioni fisiologiche
Nocicettina/Orfanina FQ (N/OFQ)	1995		Stress, ansia , dolore (Mogil and Pasternak, 2001)
Orexina/ipocretina	1998	↑	Willie et al. (2001)
Peptide Rilasciante la Prolattina (PrRP)	1998	↑	Rilascio di prolattina (Lin and Civelli, 2004)
Apelina	1998		Sconosciuta (Tatemoto et al., 1998)
Ghrelin	1999		Secrezione di GH (Hosoda et al., 2002)
Ormone di concentrazione della Melanina (MCH)	1999		Pissios & Maratos-Flier (2003)
Urotensina II	1999	↓	Vasocostrizione (Nothacker and Clark, 2005)
Neuromedina U	2000		Brighton et al. (2004)
Metastatina	2001		Soppressione di metastasi, pubertà (Funes et al., 2003; Ohtaki et al., 2001)
Neuropeptide B/W (NPB/NPW)	2002		Dolore (Kelly et al., 2005; Tanaka et al., 2003)
Procineticina 1/2	2002		Ritmo circadiano (Zhou & Cheng, 2005)
Relaxina 3	2003		Sconosciuta (Liu et al., 2003a; Liu et al., 2003b)
Neuropeptide S (NPS)	2004	↑	Ansia (Beck et al., 2005; Reinscheid et al., 2005)

Tabella 1

Nuovi neuropeptidi identificati da estratti tissutali usando la strategia del recettore orfano.

L'ultimo neuropeptide identificato con la farmacologia inversa è il Neuropeptide S la cui funzione è implicata principalmente nella modulazione dell'ansia (Vitale et al. 2008). Dato il coinvolgimento dei GPCR nelle più svariate funzioni biologiche, e che i farmaci sviluppati fino a questo momento interagiscono con un numero limitato di questi recettori, è evidente che la loro "deorfanizzazione" può portare ad un avanzamento enorme delle nostre conoscenze della fisiopatologia umana, e può fornire un numero straordinario di nuovi bersagli biologici per lo sviluppo di strategie farmacologiche innovative. La chiave per sfruttare al meglio le potenzialità terapeutiche dei sistemi peptidergici scoperti con la farmacologia inversa, è data dalla sintesi di agonisti e antagonisti specifici che possano essere impiegati per comprendere la modulazione delle risposte biologiche coinvolte. Relativamente ai sistemi peptidergici oggetto dei presenti studi: sistema N/OFQ – NOP e sistema NPS – NPSR, la ricerca di ligandi con attività agonistica ed antagonistica allo scopo di definirne i ruoli funzionali e il potenziale terapeutico è stata svolta in collaborazione con l'Università di Ferrara.

1.3 “Dolore”, termine dal significato complesso

1.3.1 Il dolore: terminologia, definizione e metodi di classificazione

L'International Association for the Study of Pain (IASP) e l'O.M.S. (Organizzazione Mondiale della Sanità), definiscono il dolore come “un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di un simile danno”. Si deduce da questa definizione che il dolore non è una sensazione come la vista o l'udito, bensì è una percezione che scaturisce non solo dal rilevamento delle modificazioni chimiche secondarie al danno tissutale, ma anche una componente soggettiva della lesività di tale danno. Ogni individuo, infatti, apprende il significato di tale parola attraverso le esperienze correlate ad una lesione durante i primi anni di vita; non tutto quello che è doloroso, è dannoso ma la percezione del dolore è reale sia se il danno è avvenuto o meno. Il dolore, che è sempre soggettivo, non può essere descritto solo come un fenomeno sensoriale, ma è l'unione tra due componenti:

- *percettiva* (la nocicezione), che costituisce la modalità sensoriale che permette la “ricezione” ed il trasporto al sistema nervoso centrale (SNC) di stimoli potenzialmente lesivi per l'organismo;
- *esperienziale*, che è lo stato psichico collegato alla percezione di una sensazione spiacevole.

Il dolore è fisiologico quando rappresenta un segnale d'allarme per una lesione tissutale, risultando essenziale per evitare un danno, mentre il dolore diventa patologico quando si auto-mantiene, perdendo il significato iniziale e diventando, a sua volta, una malattia (sindrome dolorosa) (Mannion e Woolf 2000).

Le vie nervose e biochimiche attivate dalla sensazione dolorosa creano una serie di risposte molto complesse e articolate che coinvolgono anche il sistema endocrino e il sistema immunitario. Capire il dolore o, più precisamente, i diversi tipi di dolore, è soprattutto una questione di comprensione dei suoi meccanismi fisiologici (Bonica 1990; Besson 1997); grazie alle ricerche effettuate da Besson (1997) è stato possibile classificare i diversi tipi di dolore in base alla terminologia anatomica, alle caratteristiche cliniche o ancora all'eziologia.

Sulla base di queste indicazioni si possono identificare le diverse forme di dolore (Figura 3):

- Dolore nocicettivo somatosensoriale, si origina nella pelle (dolore superficiale), oppure dal tessuto connettivale, dal muscolo, dalle ossa, dalle articolazioni o dalle membrane sinoviali (dolore profondo).
- Dolore viscerale, trae origine dai visceri e dal torace, ha spesso una localizzazione vaga ed è accompagnato da riflessi autonomi e somatici.

- Dolore neurogeno, causato da un danno o da un'inflammatione di una branca nervosa (dolore neurogeno periferico) oppure da un danno o da una malattia del sistema nervoso centrale (dolore neurogeno centrale).

- Dolore funzionale, procurato da disturbi funzionali (ad esempio mal di schiena causato da postura e movimenti abitudinali scorretti).

Questa non risulta l'unico tipo di classificazione; studi successivi distinsero le diverse forme di dolore anche in base alle risposte verso specifici farmaci analgesici. In particolare è stato osservato che il dolore di natura quasi esclusivamente nocicettiva risponde ai derivati morfïnici, mentre il dolore neuropatico e alcuni tipi di dolore viscerale rispondono in modo parziale o non rispondono ai morfïnici (Hanks et al. 1993).

Altra catalogazione del dolore si basa sulla durata della percezione, secondo la quale il dolore può essere classificato in:

- Transitorio, quando vi è l'attivazione dei nocicettori responsabili della trasmissione degli stimoli dolorosi, senza danno tissutale; il dolore scompare con la cessazione dello stimolo.

- Acuto, ovvero un dolore nocicettivo di breve durata in cui solitamente il rapporto di causa/effetto è evidente. Nel dolore acuto, per effetto di una causa esterna o interna (esempio danno tissutale), si ha una fisiologica attivazione dei nocicettori che spesso svanisce con la riparazione del danno. Esso è un sintomo d'allarme che segnala quindi un danno attuale o possibile.

- Recidivo, come spesso in cefalgie.

- Persistente, la permanenza dello stimolo nocicettivo rende il dolore "persistente".

- Cronico, è il dolore associato a profonde modificazioni della personalità e dello stile di vita del paziente che costituiscono fattori di mantenimento indipendenti dall'azione dei nocicettori; è un dolore che continua per lunghi periodi di tempo. In questi casi non ha funzione di allarme e diventa dannoso per le sofferenze che causa. Il dolore cronico, col tempo, può produrre sentimenti di rabbia, di tristezza e di disperazione; può modificare la personalità, procurare insonnia, interferire con le relazioni interpersonali e sociali (Hanks et al. 1993).

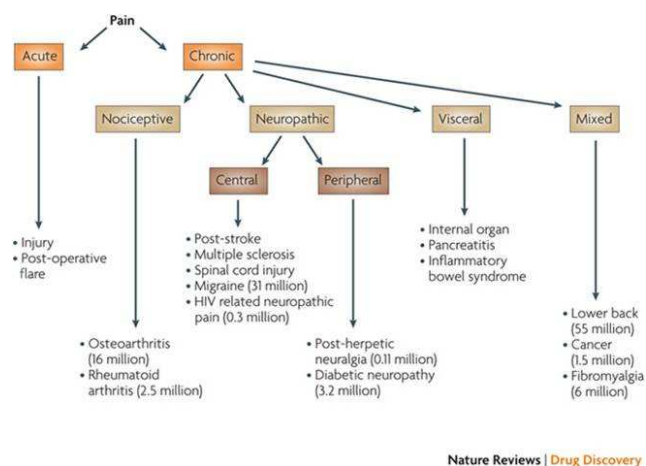


Figura 3
Classificazione del dolore per durata e sito anatomico di origine (Melnikova 2010).

1.3.2 Trasduzione del dolore: i nocicettori

Nella cute, così come in tutti gli altri tessuti, i recettori del dolore sono costituiti da terminazioni nervose libere che segnalano un danno tissutale in atto o imminente. Queste si trovano distribuite diffusamente negli strati superficiali della cute e anche in alcuni tessuti profondi. Si identificano diverse categorie di nocicettori in base al tipo di stimolo necessario per eccitare le terminazioni dolorifiche: recettori attivati da stimoli meccanici di intensità elevata o da lesioni tissutali (meccanocettori); quelli sensibili al caldo o al freddo estremi (termocettori); quelli sensibili a varie sostanze chimiche (chemocettori). Tra i diversi agenti che eccitano questi ultimi, vanno ricordate la bradichinina, la serotonina, l'istamina, gli ioni K^+ , gli acidi, le prostaglandine, l'acetilcolina e gli enzimi proteolitici. I nocicettori afferenti funzionano anche da neuroeffettori, molti di loro infatti, contengono mediatori polipeptidici che sono liberati dalle loro terminazioni periferiche, quando sono attivati. Un esempio è la sostanza P che è liberata in conseguenza ad un danno cellulare (Dray 1997).

Nella percezione del dolore sono coinvolte diverse aree del sistema nervoso centrale le quali sono funzionalmente distinte ma interagenti tra di loro con dinamiche differenti a seconda del tipo di dolore. Tra queste strutture ricordiamo la corteccia anteriore cingolata, la corteccia somatico sensoriale SI e SII, la corteccia prefrontale, la corteccia insulare, l'ipotalamo, il talamo, la sostanza grigia periacqueduttale, il cervelletto e i gangli della base. Benché tutti i recettori del dolore siano terminazioni nervose libere, essi si servono di due vie distinte per la trasmissione dei segnali dolorifici all'interno del SNC; una via per il dolore acuto-rapido (dolore descritto come localizzato e acuto), e un'altra per il dolore lento cronico o viscerale (espresso invece come più sordo e diffuso). L'informazione nocicettiva acuta-rapida nasce nei nocicettori ed è trasmessa ai neuroni delle corna posteriori del midollo spinale attraverso piccole fibre mielinizzate del tipo $A\delta$, a velocità

comprese tra 6 e 30 m/s; mentre quelle del dolore lento-cronico, invece, sono trasmesse da fibre C non mielinizzate con una velocità tra 0,5 e 2 m/s.

Le fibre dolorifiche entrano nel midollo spinale attraverso le radici posteriori e terminano sui neuroni delle corna dorsali. Anche a questo livello, sono due i sistemi attraverso cui vengono trasmessi i segnali del dolore prima di essere avviati all'encefalo (Figura 4). Le fibre A δ del dolore rapido terminano a livello delle corna posteriori, nella lamina I (lamina marginalis) e nella lamina V. In entrambe le lamine le fibre in arrivo eccitano i neuroni di secondo ordine, che con i loro lunghi assoni decussano immediatamente portandosi nel lato opposto del midollo e quindi ascendono all'encefalo con la componente laterale della via sensitiva antero-laterale, la quale è essenziale per la percezione del dolore nell'uomo. Le fibre C che trasmettono i segnali del dolore lento, terminano, invece, quasi tutte nelle lamine II e III delle corna posteriori nella zona chiamata sostanza gelatinosa; da qui i segnali per la massima parte passano attraverso uno o più neuroni ad assone breve fino a giungere nella lamina V, dove hanno origine neuroni ad assone lungo che nella maggior parte, unendosi alle fibre del dolore rapido, vanno nel lato opposto del midollo per poi risalire con la componente laterale della via sensitiva antero-laterale all'encefalo. Esiste, però, uno scarso numero di queste fibre che non si incrocia e raggiunge invece l'encefalo risalendo lungo il lato ipsilaterale del midollo (Bonica 1990).

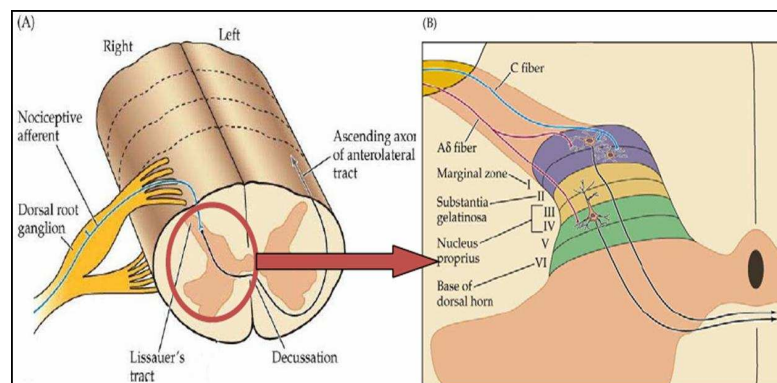


Figura 4
Rappresentazione somatotopica delle informazioni nocicettive.

1.3.3 La modulazione del dolore e i possibili interventi terapeutici

La conoscenza della modulazione endogena del dolore è di fondamentale interesse sia per l'individuazione dei meccanismi neurofisiologici e biochimici della sua trasmissione che, in particolar modo, per individuare i meccanismi con cui i farmaci interagiscono con i sistemi nocicettivi. Il sistema nervoso è capace di "controllare e regolare" il grado di "input" dei segnali dolorosi mediante l'attivazione di un sistema di controllo del dolore. La modulazione degli impulsi dolorosi avviene lungo l'intero percorso delle vie ascendenti nel

midollo spinale, nel ponte, nel mesencefalo fino a giungere al talamo. Tale sistema può essere sia in senso eccitatorio che in senso inibitorio, ed è costituito da tre componenti principali. L'area grigia periacqueduttale del mesencefalo e della parte superiore del ponte, dalla quale vengono inviati segnali al nucleo del rafe magnus, ovvero un nucleo che occupa la parte inferiore del ponte e quella superiore del bulbo. Da questo nucleo i segnali sono trasmessi al complesso inibitorio del dolore, situato nelle corna spinali dorsali; a questo livello i segnali dolorifici possono essere bloccati prima che siano inviati all'encefalo.

Il dolore è un sintomo di numerosi disordini che affliggono l'intera popolazione umana; nell'ultima decade sono stati fatti numerosi passi avanti nel capire i meccanismi di base del dolore, e sono avvenuti numerosi miglioramenti nei meccanismi farmacologici di base per l'analgesia. Questi ultimi si basano soprattutto sull'interazione fra recettori classici per gli oppioidi e molecole ad attività agonista o antagonista (Lin e Ko, 2012 *in press*).

1.3.4 I recettori classici per gli oppioidi e terapie tradizionali del dolore

L'esistenza dei recettori per gli oppioidi è stata proposta per la prima volta nel 1954 da Beckett e Casy, che studiarono la relazione tra la struttura di una serie di oppiacei di sintesi e la loro attività antinocicettiva. Questi recettori furono chiamati "*oppioidergici*" dopo aver dimostrato che i loro ligandi endogeni sono dei peptidi con effetti riconducibili ai farmaci oppiacei, quali quelli associati al dolore, depressione respiratoria, miosi, sensazione di benessere, tolleranza e dipendenza. Attraverso lo studio delle Relazioni Struttura Attività, Portoghese (1965), avevano ipotizzato, già nel 1965, due possibilità: l'esistenza di più tipi di recettori per gli oppioidi, oppure, supponendo che esistesse un solo tipo di recettore, la presenza di diversi modi di interazione tra i ligandi e i rispettivi recettori. La conferma della presenza di specifici recettori per alcaloidi oppiacei e per i relativi farmaci sintetici ha portato alla ricerca di ligandi endogeni per questi recettori e alla scoperta dell'encefalina (Hughes et al. 1975), della β -endorfina (Cox et al. 1976) e della dinorfina (Goldstein et al. 1979). La prima dimostrazione che questi recettori non formano una popolazione omogenea è stata presentata da Martin et al. (1976), i quali hanno documentato l'azione di diversi agenti analgesici mediante la somministrazione in cronico, a livello spinale nel cane, come modello che consente di discriminare l'azione dei farmaci sulle diverse risposte riflesse. Le differenti forme dei principali recettori hanno preso il nome dai diversi farmaci utilizzati nello studio, vale a dire il recettore μ (mu, per la morfina, o mu opioid receptor, MOP) e il recettore κ (kappa, per la ketociclazocina, o kappa opioid receptor, KOP). Studi successivi sull'ileo e sui vasi deferenti dei roditori, hanno portato poi alla scoperta di un terzo recettore per gli oppioidi denominato recettore δ (delta, per il deferente, o delta opioid receptor, DOP) (Lord et al. 1977).

Secondo la Società Americana del Dolore (American Academy of Pain Medicine, AAPM), il dolore è il sintomo più frequente per cui i pazienti chiedono attenzione medica, è stato

stimato che negli Stati Uniti, la prevalenza di dolore cronico è del 33,5 % o 105 milioni di persone. In termini di costi per il sistema sanitario e di tempo lavoro, la spesa è circa più di 100 miliardi di dollari US all'anno (Melnikova 2010).

La gestione attuale del dolore si basa su agenti conosciuti da molto tempo per la loro attività analgesica. Analgesici non oppioidi (paracetamolo) analgesici narcotici (oppioidi), farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) (aspirina), ed agenti termici continuano ad essere la base della gestione del dolore. I farmaci attualmente approvati, però sono spesso associati a scarsa tollerabilità, effetti collaterali sfavorevoli, preoccupazione per la sicurezza a lungo termine e potenziale d'abuso, così come disagio nella utilizzazione. Gli oppioidi, che per la maggior parte interagiscono con il recettore MOP, sono ancora considerati l'opzione terapeutica più efficace, ma provocano seri effetti collaterali, come la depressione o arresto respiratorio, costipazione e prurito. Le preoccupazioni più importanti sull'uso degli oppioidi però riguardano il rischio di dipendenza, abuso, uso non corretto, e uso voluttuario (Cicero et al. 2007; Sullivan et al. 2010; Sehgal et al. 2012). Inoltre nelle ultime due decadi si è cercato di sviluppare anche farmaci agonisti per gli altri due recettori oppioidi KOP e DOP, ma il loro effetto non può essere comparato a quello degli agonisti per MOP, tanto che nessuno è stato approvato dall'FDA (Food and Drug Administration).

1.4 Effetti antinocicettivi di somministrazioni intratecali di agonisti del recettore della Nocicettina/Orfanina FQ, mediante l'utilizzo del test del tail flick.

1.4.1 Il sistema Nocicettina/Orfanina FQ – Recettore NOP

1.4.1.1 Scoperta

Nel 1994 in seguito al clonaggio dei recettori classici per gli oppioidi, DOP (Evans et al. 1992; Kieffer et al. 1992), KOP (Yasuda et al. 1993) e MOP (Chen et al. 1993), altri gruppi di ricerca hanno identificato un recettore accoppiato a proteine G altamente omologo (Bunzow et al. 1994 Mollereau et al. 1994) a questi recettori, ma non in grado di legare i ligandi oppioidi. Sulla base di queste osservazioni il recettore è stato chiamato oppioide simile di tipo 1 (Opioid Receptor Like 1, ORL-1) (Mollereau et al. 1994). Al fine di identificare il ligando naturale di ORL-1, è stato utilizzato l'approccio della farmacologia inversa, utilizzando estratti proteici di cervello (Civelli et al. 2001). Inizialmente questo approccio si rivelò ostico, finché un anno più tardi due gruppi indipendenti di ricerca portarono all'identificazione del medesimo eptadecapeptide FGGFTRKSARKLANQ, a cui venne dato il nome di *Nocicettina/Orfanina FQ*: Nocicettina, per la sua capacità di indurre iperalgesia dopo somministrazioni sovraspinali nel topo (Meunier et al. 1995) e Orfanina FQ (Reinscheid et al. 1995), per la sua affinità nel legare il recettore precedentemente orfano di ligando (ORL-1) e sulla base del primo e ultimo residuo amminoacidico (fenilalanina, F e glutammina, Q). Nocicettina/Orfanina FQ (N/OFQ) ha una sequenza

primaria molto simile ai peptidi oppioidi endogeni, inoltre la presenza dell'amminoacido Fenilalanina (Phe) in posizione 1 piuttosto che l'amminoacido Tirosina (Tyr) fa sì che questo peptide sia altamente selettivo per il proprio recettore, non legando i recettori classici per gli oppioidi. Dopo l'identificazione di N/OFQ, in accordo con la nomenclatura IUPHAR, anche il suo recettore è stato rinominato: recettore peptidico N/OFQ, NOP (Cox et al. 2000).

1.4.1.2 Il peptide N/OFQ

Il peptide N/OFQ deriva dal precursore preproN/OFQ (ppN/OFQ) (Nothacker et al. 1996; Mollereau et al. 1996; Houtani et al. 1996; Pan et al. 1996). Il gene per ppN/OFQ è composto da quattro esoni separati da tre introni. L'esone I contiene esclusivamente la sequenza non codificante del 5', gli esoni II e III condividono la sequenza codificante per il peptide N/OFQ ed, infine, l'esone IV contiene il 3' non codificante. La sequenza genica di ppN/OFQ nei topi e nell'uomo, mostra caratteristiche strutturali molto simili ai geni che codificano per altri precursori oppioidi endogeni, come la prepro-encefalina, -dinorfina e -opiomelanocortine, suggerendo come tutti questi geni si siano evoluti dalla medesima sequenza genica ancestrale (Sundstrom et al. 2010). La sequenza amminoacidica di ppN/OFQ è altamente conservata fra le diverse specie animali, in particolare l'estremità C-terminale, in cui è contenuta la sequenza "canonica" di taglio del precursore, fra i residui lisina-arginina (Lys-Arg). Inoltre, la sequenza primaria di ppN/OFQ contiene anche altri siti di clivaggio, suggerendo che il precursore può generare altri peptidi biologicamente attivi, per esempio la nocistatina (Okuda-Ashitaka et al. 1998). Un altro peptide codificato dallo stesso precursore è conosciuto come N/OFQ II, in grado di stimolare l'attività locomotoria nei topi (Florin et al. 1997).

L'mRNA di ppN/OFQ ed il peptide N/OFQ stesso, sono distribuiti in linea di massima in tutto il SNC nel ratto (Neal et al. 1999), sono presenti in molte aree del cervello, suggerendo che la loro produzione avvenga da parte degli interneuroni. Sono particolarmente abbondanti in strutture corticali e limbiche (ippocampo, giro dentato, aree del setto e amigdala), nei nuclei ipotalamici e del tronco cerebrale, nelle corna dorsali e ventrali del midollo spinale e nei gangli delle radici dorsali. Questa distribuzione suggerisce che N/OFQ è potenzialmente implicata nella regolazione di diverse funzioni cerebrali, inclusi processi emozionali, apprendimento e memoria, locomozione, ricompensa, trasmissione del dolore e regolazioni da parte del sistema nervoso autonomo, di organi e sistemi periferici. Numerose endopeptidasi sono coinvolte nel metabolismo di N/OFQ (Noble et al. 1997; Sandin et al. 1999), infatti gli inibitori delle peptidasi sono in grado di incrementare la potenza di N/OFQ, e in alcuni casi, di provocarne l'effetto massimale sia *in vitro* che *in vivo* (Noble et al. 1997; Madeddu et al. 1999) dimostrando l'importanza del ruolo delle peptidasi nella traduzione del segnale prodotto da N/OFQ.

1.4.1.3 Il recettore NOP

Il recettore NOP appartiene alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G, caratterizzati da sette domini transmembrana ad alfa elica, e connessi fra loro, con domini a loop intra ed extra cellulari. NOP mostra un'alta omologia con gli altri recettori classici per gli oppioidi, ma non ha affinità per i loro ligandi (Calò et al. 2000). La struttura primaria di NOP è altamente conservata fra le diverse specie di mammiferi, la sequenza umana e quelle del topo risulta essere identica per una percentuale maggiore del 95%. Il gene per il recettore NOP è collocato nella regione distale del cromosoma 2 nel topo e nella regione q13.2-13.3 del cromosoma 20 nell'uomo (Mogil e Pasternak 2001; Lambert 2008). La sequenza codificante per il recettore NOP è organizzata in introni ed esoni allo stesso modo dei geni per i recettori DOP, MOP e KOP, suggerendo che tutti e quattro i geni appartengono alla stessa famiglia (Stevens et al. 2009), e tutti possono subire uno splicing alternativo che genera sottotipi recettoriali, la cui funzione biologica ancora non è nota (Pan et al. 1998; Peluso et al. 1998).

L'mRNA di NOP è espresso nelle stesse aree dell'mRNA di N/OFQ (Neal et al. 1999). La mappatura estensiva autoradiografica dimostra che la distribuzione dell'mRNA di NOP e del recettore NOP stesso è la medesima, indicando che il recettore è espresso in modo predominante nei circuiti neurali locali.

NOP è accoppiato a proteine G_i , che inibiscono l'adenilato ciclasi e la corrente intracellulare di Ca^{2+} ; inoltre, attiva i canali del K^+ (Hawes et al. 2000). Questi segnali riducono l'efficienza sinaptica, sia che il recettore si trovi a livello presinaptico riducendo il rilascio trasmettitoriale, o diminuiscono l'eccitabilità neurale quando esso è localizzato a livello postsinaptico. Inoltre diversi studi *in vitro* e *in vivo*, hanno dimostrato che l'attivazione di NOP inibisce e/o stimola il rilascio basale dei vari neurotrasmettitori, inclusi acetilcolina, dopamina, serotonina, noradrenalina, GABA, glutammato e sostanza P sia a livello centrale che periferico (Schlicker e Morari 2000). Gli effetti cellulari provocati sono di tipo inibitorio, quindi possono essere anche associati a dei circuiti disinibitori che spiegherebbero, in parte, le azioni biologiche esercitate da N/OFQ (Calò et al. 2011).

Evidenze in letteratura, dimostrano che NOP può formare degli eterodimeri con i recettori classici per gli oppioidi, soprattutto con MOP (Wang et al. 2005); ciò comporta profonde implicazioni in termini di segnale e traffico intracellulare. Per esempio eterodimeri NOP/MOP, determinano l'attenuazione dell'inibizione dei canali del Ca^{2+} , effetto normalmente associato a NOP (Evans et al. 2010). Questo tipo di meccanismo potrebbe avere importanti conseguenze per il processo nocicettivo (Calò e Guerrini, 2012). Thompson et al. (2012) hanno pubblicato la struttura cristallina di NOP e dei recettori classici per gli oppioidi. Tutte queste analisi strutturali, sono state ottenute analizzando il complesso NOP e C-24, un piccolo peptide mimetico con attività di antagonista (Goto et al. 2006), è stato possibile studiare la struttura del recettore nello stato inattivo (Figura 5).

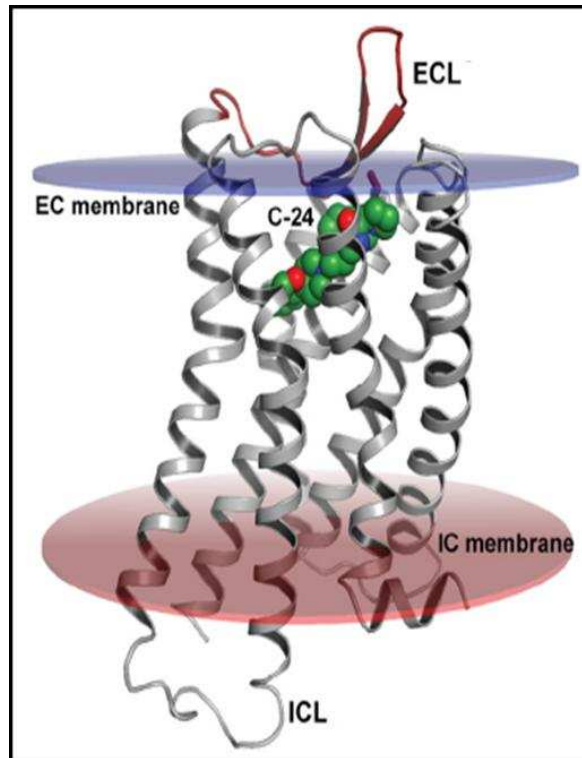


Figura 5

Rappresentazione strutturale del recettore NOP. Il recettore NOP è colorato di grigio. Sono indicati i loop extracellulari (ECL) e intracellulari (ICL), il disco di colore blu indica la membrana extracellulare (EC), mentre il disco rosso quella intracellulare (IC). Il sito di legame con il composto C-24, mimica i primi quattro residui amminoacidici della porzione N-terminale dell'antagonista UFP-101, rivela i dettagli anatomici del recettore importanti per il riconoscimento del legame con il ligando (Thompson et al. 2012).

1.4.1.4 Strumenti di ricerca disponibili per lo studio del sistema N/OFQ – NOP

Il ruolo biologico del sistema N/OFQ – NOP non è stato ancora del tutto chiarito; ciò dipende strettamente dagli strumenti di ricerca a disposizione (Tabella 2). Di particolare importanza si sono rivelati gli animali transgenici, topi knockout per il gene ppN/OFQ (Köster et al. 1999) e anche per NOP (Nishi et al. 1997), disponibili rispettivamente dal 1999 e dal 1997; recentemente si sono generati anche ratti knockout per il gene NOP (Homberg et al. 2009). In molti casi il fenotipo degli animali knockout è simile agli effetti che si possono osservare negli studi che utilizzano gli antagonisti selettivi per il recettore in animali normali. Topi e ratti NOP (-/-), dimostrano che le azioni indotte da N/OFQ sono strettamente mediate dal suo recettore.

Sono attualmente disponibili anche un'ampia scelta di ligandi per NOP, che si possono suddividere in tre gruppi basandosi sulla loro natura chimica: 1) peptidi N/OFQ - correlati 2) peptidi corti N/OFQ - non correlati e 3) piccole molecole di natura non peptidica. La serie di peptidi N/OFQ – correlati, nostro oggetto di studio, sono stati identificati e sintetizzati dal gruppo di ricerca del Dott. Girolamo Calò e del Prof. Remo Guerrini, dell'Università degli Studi di Ferrara. Le relazioni fra struttura e attività biologica di tutti i peptidi identificati, sono state studiate, utilizzando la stimolazione elettrica dei vasi deferenti del topo, poiché sensibili a N/OFQ (Berzetei-Gurske et al. 1996; Calò et al.

1996). I peptidi N/OFQ - correlati sono stati costruiti mantenendo la sequenza di N/OFQ ma più corti, al fine di conservare l'affinità (Dooley e Houghten et al. 1996), la potenza e l'efficacia del ligando naturale (Calò et al. 1996; Guerrini et al. 1997). Questi peptidi sono stati utilizzati poi come modello per studiare la relazione fra struttura e attività, per portare alla futura identificazione di molecole di interesse farmacologico, con attività di agonista o antagonista parziale o pieno (Guerrini et al. 1997; Bigoni et al. 1999). In seguito agli studi relazionali fra struttura e attività, le diverse modificazioni chimiche sono state combinate in singole molecole, portando alla sintesi di ligandi peptidici di seconda generazione per NOP, fra cui l'agonista pieno ($[(pF)Phe^4Aib^7Arg^{14}Lys^{15}]N/OFQ-NH_2$, UFP-112 (Rizzi et al. 2007; Calò et al. 2011).

I corti peptidi N/OFQ - non correlati sono stati identificati mediante screening di librerie combinate di peptidi sintetici; queste molecole sono più o meno selettive per NOP, hanno funzioni sia di antagonisti che agonisti e alcuni dei quali sono ora sottoposti a studi clinici, come per esempio ZP120 (Kapusta et al. 2005; Hadrup et al. 2004; Simonsen et al. 2008; Fischetti et al. 2009), come nuovo diuretico.

Le differenti funzioni biologiche controllate dal sistema N/OFQ – NOP e le potenzialità terapeutiche di possibili molecole che hanno la capacità di attivare o bloccare in modo selettivo NOP sono di grande interesse terapeutico. Le industrie farmaceutiche hanno sviluppato diverse molecole di natura non peptidica, mediante screening rapido automatizzato: “high throughput screening” (Largent-Milnes e Vanderah 2010; Mustazza e Bastanzio 2011) che agiscono da agonisti o antagonisti per NOP. Queste molecole sono state largamente utilizzate per studiare il ruolo del sistema N/OFQ – NOP in condizioni fisiologiche e patologiche.

Nell'ultimo anno, notevoli sviluppi si sono ottenuti nella metodologia della cristallografia a raggi X, nell'espressione e purificazione di proteine del recettore e nella stabilizzazione e cristallizzazione delle stesse. Questi sviluppi hanno permesso di determinare la struttura cristallina di diversi recettori accoppiati a proteina G (Calò et al. 2011).

Year	Milestone	Comment	References
1994	NOP receptor	Cloning of the NOP receptor	[8-11]
1995	N/OFQ	Identification of N/OFQ as the endogenous ligand of the NOP receptor	[13,14]
1996	ppN/OFQ	Cloning of the gene coding for ppN/OFQ	[15,16]
	mouse vas deferens	The electrically stimulated mouse vas deferens is a N/OFQ sensitive preparation	[23,24]
	N/OFQ(1-13)-NH ₂	The minimum N/OFQ sequence maintaining the same potency as the natural peptide	[24,26]
1997	NOP(-/-) mice	Generation of mice knockout for the NOP receptor gene	[20]
	Ac-RYYRWK-NH ₂	Identification of hexapeptides acting as selective partial agonists at NOP receptors	[38]
1998	[F/G]N/OFQ(1-13)-NH ₂	The first N/OFQ-related peptide with reduced efficacy at NOP receptors	[30]
1999	ppN/OFQ(-/-) mice	Generation of mice knockout for the ppN/OFQ gene	[19]
2000	[Nphe ¹]N/OFQ(1-13)-NH ₂	The first selective peptide antagonist	[31]
	J-113397	The first selective nonpeptide antagonist	[53]
	Ro 64-6198	The first selective nonpeptide agonist	[67]
2002	UFP-101	A potent and selective peptide antagonist	[35]
2004	SB-612111	A potent and selective nonpeptide antagonist	[56]
2009	NOP(-/-) rats	Generation of rats knockout for the NOP receptor gene	[21]

Tabella 2

Elenco delle tappe fondamentali nello studio del sistema N/OFQ – NOP (Calò e Guerrini 2012).

1.4.2 Coinvolgimento del sistema N/OFQ – NOP nella trasmissione del dolore

Basandosi sulle similarità di struttura di NOP con i recettori classici per gli oppioidi, numerosi studi sono stati condotti sul coinvolgimento di N/OFQ nella trasmissione del dolore, e continuano ancora oggi, generando risultati controversi. Infatti, N/OFQ può causare iperalgesia, allodinia, analgesia e comportamenti nocifensivi (Mogil e Pasternak 2001; Zeilhofer e Calò 2003). Fra le possibili spiegazioni a questi fenomeni opposti, c'è anche la stretta dipendenza dell'effetto osservato dalle dosi e dal tipo di via di somministrazione utilizzata. E' stato osservato che le iniezioni di N/OFQ, sovraspinali (intracerebroventricolari, i.c.v.) in concentrazioni nanomolari in topi, causano iperalgesia in risposta a stimoli termici nocivi sia con il test della piastra calda (Meunier et al. 1995) che in quello del colpo di coda (tail-flick test) (Reinscheid et al. 1995). N/OFQ ha un'azione iperalgesica, e cioè induce un aumento della sensibilità nocicettiva, opposta all'analgesia indotta da stress, dovuta ad un decremento di tale soglia (Mogil et al. 2001). Questa osservazione risultò inaspettata, poichè gli oppioidi classici, eccezione fatta per la dinorfina (Caudle e Mannes 2000), producono un effetto analgesico e/o anti-iperalgesico (Pasternak 1993). Inoltre N/OFQ, somministrata i.c.v., attenua le azioni analgesiche sia di farmaci oppioidi che non oppioidi (Mogil e Pasternak 2001) poichè N/OFQ è in grado di inibire direttamente le vie di segnale discendenti antinocicettive, attivate in modo indiretto dagli oppioidi (Pan et al. 2000). N/OFQ ha quindi proprietà anti-oppioide, in quanto è in grado di contrastare l'effetto analgesico degli agonisti oppioidi per MOP, KOP e DOP dopo somministrazioni i.c.v.. La natura pro-nocicettiva del neuropeptide sembra ulteriormente avvalorata dalla somministrazione di oligonucleotidi antisense per il recettore NOP, poichè riducendone l'espressione, si ottiene l'effetto opposto, vale a dire un innalzamento della soglia nocicettiva (Calò et al. 1996). Studi su topi NOP (-/-), confermano l'attività biologica di N/OFQ: pronocicettiva a livello sovraspinale (Nishi et al. 1997; Carra et al. 2005), antinocicettiva a livello spinale (Nazzarro et al. 2007). Questi animali mostrano una normale risposta al dolore acuto (Depner et al. 2003; Gavioli et al. 2004) mentre hanno una risposta pronocicettiva ad uno stimolo nocicettivo prolungato (per esempio nel test della formalina) (Depner et al. 2003; Rizzi et al. 2006).

Topi NOP (-/-) sono stati utilizzati per valutare anche altri effetti legati al sistema N/OFQ – NOP. Questi topi mostrano un comportamento anti-depressivo nel test del nuoto forzato (Gavioli et al. 2003) e nel test di sospensione della coda (Gavioli et al. 2004); inoltre, hanno un comportamento ansigeno incrementato rispetto a topi normali in test come "elevated plus maze" e "light dark box" (Gavioli et al. 2007), una migliore capacità locomotoria nel test "rotarod" (Gavioli et al. 2007), e hanno più alta abilità di apprendimento e memoria (Manabe et al. 1998). Questi modelli animali confermano anche l'induzione di bradicardia, ipotensione e diuresi (Burmeister, et al. 2008); ingestione di

cibo (food intake) (Rizzi et al. 2007) e inibizione dell'attività locomotoria spontanea (Depner et al. 2003). Gli stessi risultati si sono osservati in modelli animali di ratto knockout NOP(-/-) (Homberg et al. 2009; Rizzi et al. 2011), che però mostrano una sensibilità maggiore riguardo gli effetti della morfina rispetto agli animali normali (Rutten et al. 2011).

Quando N/OFQ viene somministrata a livello intratecale (i.t.) nei roditori, a basse concentrazioni (intervalli da femto a picomoli) comporta effetti pronocicettivi, mentre ad alte dosi (intervalli nanomolari) produce effetti antinocicettivi (Mogil et al 2001; Zeilhofer et al. 2003). Diversi studi hanno dimostrato che somministrazioni i.t. nanomolari di N/OFQ producono effetti antinocicettivi marcati in numerosi modelli animali di dolore sia fisico (i.e. termico o meccanico) che tonico (i.e. infiammatorio o neuropatico). L'azione antinocicettiva spinale di N/OFQ è in accordo con gli studi che ben documentano l'abilità del peptide di bloccare la trasmissione eccitatoria (rilascio di glutammato) nelle corna dorsali del midollo spinale (Zeilhofer et al. 2003). Solide evidenze sperimentali ottenute prima di tutto in modelli di topi knockout per NOP e ppN/OFQ (Depner et al. 2003), successivamente confermate con l'uso di antagonisti per NOP (Rizzi et al. 2006; Inoue et al. 2003) e di ratti knockout per NOP (Rizzi et al. 2011), dimostrano che il segnale trasdotto dal sistema N/OFQ – NOP nelle corna dorsali del midollo spinale è attivato da stimoli nocicettivi prolungati ma non da quelli acuti, confermando il proprio ruolo antinocicettivo.

Infine una serie di eleganti studi del gruppo di ricerca di Ko (2006; 2009) dimostrano che in primati non umani, somministrazioni spinali di N/OFQ o ligandi sintetici per NOP non determinano nessun effetto a basse dosi, mentre in concentrazioni nanomolari, inducono azioni antinocicettive, inibite solo da antagonisti per NOP ma non dal naloxone, e non inducono effetti collaterali come il prurito indotto dalla morfina, esprimendo un sinergismo antinocicettivo quando somministrati in associazione con la morfina stessa (Ko et al. 2006; Ko e Naughton 2009). Tali studi hanno permesso di ipotizzare, quindi, la possibilità d'uso di N/OFQ e di agonisti per NOP, come analgesici spinali innovativi nel gestire il dolore neuropatico, piuttosto che l'utilizzo degli oppioidi per i quali è evidente lo sviluppo di diversi effetti collaterali come la depressione respiratoria.

Similmente agli effetti osservati per somministrazioni spinali di N/OFQ, anche in periferia si osservano entrambi gli effetti: pro- e antinocicettivi. Per esempio, somministrazioni intradermiche di basse dosi di N/OFQ stimolano i riflessi flessori in topi. Questi effetti coinvolgono stimolazioni che rilasciano sostanza P in periferia dalle terminazioni nervose, mentre alte dosi di N/OFQ ne prevengono gli effetti (Inoue et al. 1998; 1999). Diversi gruppi di ricerca segnalano l'abilità di N/OFQ di inibire il rilascio di neuropeptidi dalle terminazioni nervose sensoriali periferiche in differenti organi come le vie aeree (Shah et al. 1998; Rizzi et al. 1999), il cuore (Giuliani e Maggi 1997) e la pelvi renale (Giuliani e

Maggi 1996; Bigoni et al. 1999). Infine in primati non umani, la co-somministrazione di N/OFQ e capsaicina nella coda inibisce la nocicezione termica in modo dose dipendente, suggerendo che l'attivazione dei recettori NOP in periferia, produce un effetto antinocicettivo (Ko et al. 2002).

1.4.3 L'agonista pieno UFP-112, caratteristiche in vitro e in vivo

Il ligando selettivo per NOP: [(pF)Phe⁴Aib⁷Arg¹⁴Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂, (Ardui et al. 2007; Rizzi et al. 2007) che chiameremo per semplicità UFP-112, è stato sintetizzato combinando differenti modificazioni chimiche nella stessa sequenza peptidica, allo scopo di incrementarne l'affinità/potenza e/o ridurre la suscettibilità alla degradazione enzimatica, da parte delle peptidasi, rispetto al ligando endogeno (Figura 6).

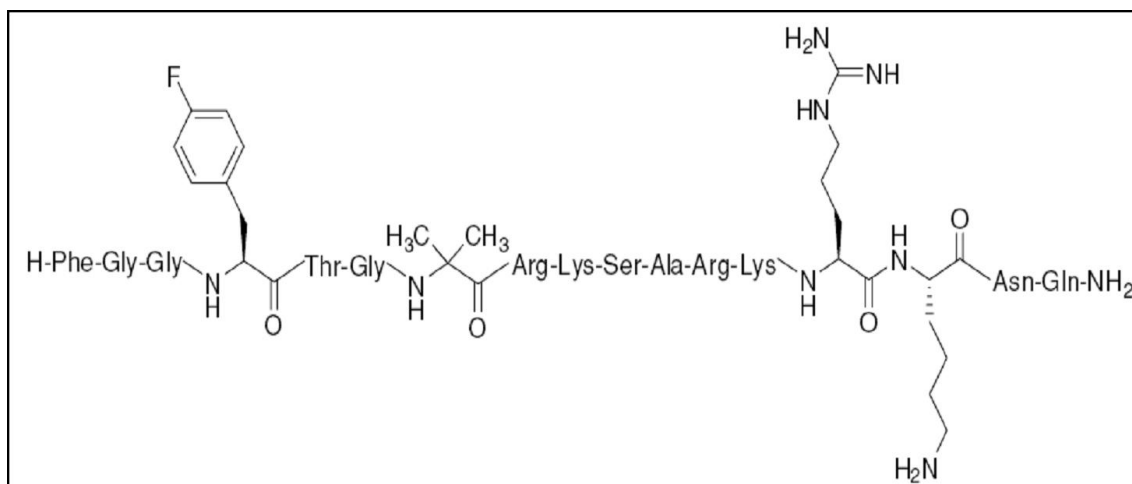


Figura 6
Struttura primaria di UFP-112 (Calò et al. 2011)

Come già dimostrato (Bigoni et al. 1999; Calò et al. 1997; Rizzi et al. 1999), l'amidazione a livello C-terminale presente nella prima generazione di peptidi N/OFQ – correlati, e mantenuta per UFP-112, fa sì che l'agonista riconosca e legghi NOP con valori di pK_i (costante di dissociazione) maggiori rispetto al ligando endogeno (Okawa et al. 1999). Inoltre l'amidazione annulla l'azione delle peptidasi, rendendo il peptide molto più resistente alla degradazione enzimatica. La modificazione (pF)Phe⁴ è stata inserita dopo una serie di studi dettagliati svolti sul residuo Phe⁴, dimostrando la funzionalità di questa sostituzione. Guerrini et al. (2001) hanno dimostrato come l'attività biologica di una serie di sostituenti peptidici dipenda in modo proporzionale dalle proprietà elettroniche dei gruppi in posizione para, e in modo inversamente proporzionale con le loro dimensioni.

La modificazione Aib⁷ (acido alfa-aminoisobutirrico, Aib) è stata riportata per prima da Zhang et al. (2002), conducendo studi di relazione fra struttura e attività, in cui l'acido alfa-aminoisobutirrico viene inserito come sostituito dei residui di Ala in posizione

7,11 e 15 della sequenza originale di N/OFQ. Grazie agli studi di binding condotti in seguito, si è potuto identificare l'importanza della sostituzione in posizione 7, per poter creare una molecola che funzioni da potente agonista pieno per il recettore NOP. Come possibile spiegazione per l'acquisizione di queste proprietà è probabile vi sia la formazione di una struttura ad alfa elica indotta da Aib (Toniolo et al. 1993). Le modificazioni Arg¹⁴Lys¹⁵ sono state riportate da Okada et al. (2000). Studi di relazione fra struttura e attività di N/OFQ dimostrano che la coppia di dipeptidi Arg-Lys in posizione 6-7, 10-11 e 14-15 giocano un ruolo molto importante nel legame con NOP (Dooley et al. 1996; Reinscheid et al. 1996). Questo è probabilmente dovuto alla formazione di legami a idrogeno ad alta energia, fra i residui basici del peptide e i residui acidi raggruppati in cluster nel secondo loop extracellulare di NOP (Topham et al. 1998). Inoltre da altri studi condotti su vasi deferenti di ratto, ottenuti somministrando diversi tipi di inibitori delle peptidasi si evince un incremento nella potenza di N/OFQ endogena, ma non di quella modificata con il dipeptide Arg¹⁴Lys¹⁵, dimostrando che queste sostituzioni conferiscono al peptide anche maggiore resistenza alla degradazione enzimatica, determinando una durata d'azione maggiore (Okada et al. 2008). La combinazione di tutte queste modificazioni osservate inizialmente in singoli esperimenti, in una stessa molecola, producono un sinergismo di effetti sulla potenza del peptide.

I diversi studi condotti *in vitro* dimostrano chiaramente che UFP-112 si comporta come agonista pieno per NOP, poiché mostra il suo massimo effetto in contemporanea presenza di N/OFQ. UFP-112 è altamente selettivo per NOP come dimostrato da studi di binding su vasi deferenti e polmoni, dall'utilizzo di antagonisti per NOP e di topi NOP (-/-). L'agonista per NOP esercita un'azione iniziale lenta ma duratura nel tempo (Calò et al. 2011), ha un'elevata affinità per il recettore e mostra una elevata potenza in studi funzionali. Infine studi condotti in cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC, "high performance liquid chromatography") per valutare l'emivita di UFP-112 e N/OFQ nel plasma e omogenati di cervello nel topo mostrano che N/OFQ ha maggiore emivita nel plasma (circa 1 ora) rispetto ai dati ottenuti nell'omogenato (circa 3 minuti) mentre UFP-112 mostra un'emivita di circa tre volte maggiore rispetto a N/OFQ in entrambi i campioni biologici (Rizzi et al. 2007).

Sono stati condotti esperimenti *in vivo* sul topo, per la valutazione degli effetti di UFP-112 nella modulazione della trasmissione del dolore (Rizzi et al. 2007). Gli esperimenti prevedono somministrazioni i.c.v. o i.t. di UFP-112 e valutazioni mediante il "tail-withdrawal" test, i risultati mostrano che UFP-112 produce un effetto pro nocicettivo in modo dose dipendente dopo somministrazioni i.c.v. ed effetti antinocicettivi se somministrato per via i.t., utilizzando lo stesso intervallo di concentrazioni. Questo dimostra che UFP-112 mima l'azione di N/OFQ; inoltre si osserva una potenza d'azione circa 100 volte maggiore rispetto al peptide naturale, con effetto più duraturo nel tempo (Rizzi et al. 2007).

Studi sugli effetti di UFP-112 sulla trasmissione del dolore in primati non umani sono attualmente in corso nel laboratorio del Dr. Ko nel dipartimento di Farmacologia, dell'Università del Michigan Medical School, Ann Arbor, USA. I dati preliminari, riportati da una comunicazione personale del Dr. Ko, dimostrano che somministrazioni i.t. di UFP-112 sono in grado di produrre un effetto antinocicettivo dose-dipendente, effetti simili a quelli provocati da N/OFQ e bloccati dall'antagonista J-113397. Inoltre, in questo studio, UFP-112 si dimostra circa 10 volte più potente rispetto a N/OFQ, e induce effetti prolungati nel tempo (4.5 ore circa).

Complessivamente, questi dati, dimostrano che le azioni antinocicettive di N/OFQ e UFP-112 sono simili sia in modelli animali di topo che in primati non umani. Inoltre questi risultati suggeriscono che i recettori NOP sono presenti anche a livello spinale e che rappresentano un target promettente ed innovativo per farmaci analgesici. Alla luce di queste indicazioni dovranno proseguire gli studi per approfondire le caratteristiche di UFP-112, *in vivo*.

In risposta a somministrazioni i.t. di N/OFQ nel topo, un'ulteriore azione biologica descritta è la riduzione dell'attività locomotoria spontanea (Reinscheid et al. 1995). Questi effetti sono stati successivamente confermati da studi nel ratto (Devine et al. 1996) nel quale il coinvolgimento del sistema N/OFQ – NOP è stato ulteriormente dimostrato con l'uso di antagonisti (Calò et al. 2002; Rizzi et al. 2001) e con animali knockout (Nishi et al. 2001). In confronto all'effetto indotto da N/OFQ, UFP-112 possiede un effetto inibitorio, anche nel ratto, con un periodo di tempo maggiore (circa 6 ore).

Sono stati condotti altri numerosi studi *in vivo*, utilizzando modelli animali diversi, al fine di valutare i tipi di effetti indotti da UFP-112 che in linea di massima si dimostra capace di potenziare gli effetti indotti da N/OFQ da sola, con maggiore durata dell'effetto; sia nella regolazione dell'ingestione di cibo (Rizzi et al. 2007; Rizzi et al. 2007), nelle funzioni gastrointestinali (Broccardo et al. 2007), cardiovascolari e renali (Rizzi et al. 2007), e nell'assunzione di alcool (Economidou et al. 2006) (Tabella 3).

Test/Assay	N/OFQ action	Effective dose	UFP-112 action	Effective dose	References
Tail-withdrawal (m, icv)	↓ TW latencies	1 nmol	↓ TW latencies	0.01 nmol	[94]
Tail-withdrawal (m, it)	↑ TW latencies	1 nmol	↑ TW latencies	0.01 nmol	[94]
Locomotion (m, icv)	↓ spontaneous LA	10 nmol	↓ spontaneous LA	0.1 nmol	[94]
Rotarod (dyskinetic r, icv)	↑ motor performance	0.1 nmol	↑ motor performance	0.01 nmol	[125]
AIM (dyskinetic r, icv)	attenuation of AIM	0.1 nmol	attenuation of AIM	0.01 nmol	[125]
Food intake (Swiss m, icv)	↑ food intake	1 nmol	↑ food intake*	0.01 nmol	[94]
Food intake (NOP(+/+)m, icv)	↑ food intake	1 nmol	↑ food intake*	0.01 nmol	[94]
Food intake (NOP(-/-)m, icv)	inactive	1 nmol	inactive	0.01 nmol	[94]
Food intake (r, icv)	↑ food intake	2.1 nmol	↑ food intake*	0.03 nmol	present article
Ethanol intake (mSP r; icv)	↓ ethanol consumption	500 ng	↓ ethanol consumption	10 ng	[129,134]
HR and BP (r, iv bolus)	↓ HR and BP	10 nmol/kg	↓ HR and BP*	0.1 nmol/kg	[94]
Diuresis (r, iv bolus)	inactive	10 nmol/kg	↑ diuresis	0.1 nmol/kg	[94]
Gastric emptying (r, icv)	↓ gastric emptying	100 pmol	↓ gastric emptying	2 pmol	[140]
Gastric secretion (r, icv)	↓ acid secretion	500 pmol	↓ acid secretion	30 pmol	[140]
Gastric secretion (r, ip)	↑ acid secretion	1000 pmol	↑ acid secretion	30 pmol	[140]
Gastric damage (r, icv)	↓ alcohol- induced lesions	1000 pmol	↓ alcohol-induced lesions	100 pmol	[140]
Gastric damage (r, ip)	↓ alcohol- induced lesions	2000 pmol	↓ alcohol-induced lesions	20 pmol	[140]
Gastric damage (r, ip)	↓ stress-induced lesions	1 µg/kg/h	↓ stress-induced lesions	0.3 µg/kg/h	[141]
Colon propulsion (r, icv)	↑ mean expulsion bead time	10 pmol	↑ mean expulsion bead time*	10 pmol	[142]
Colon propulsion (r, ip)	↑ mean expulsion bead time	10 nmol	↑ mean expulsion bead time*	1 pmol	[142]
Castor oil-induced diarrhea (r, icv)	↓% rats with diarrhea	3000 pmol	↓% rats with diarrhea	300 pmol	[142]
Castor oil-induced diarrhea (r, ip)	↓% rats with diarrhea	100 pmol	↓% rats with diarrhea	10 pmol	[142]
CRF-induced fecal output (r, icv)	↓ n fecal pellet	500 pmol	↓ n fecal pellet	50 pmol	[142]
CRF-induced fecal output (r, ip)	↓ n fecal pellet	500 pmol	↓ n fecal pellet	250 pmol	[142]
RS-induced fecal output (r, icv)	↓ n fecal pellet	100 pmol	↓ n fecal pellet	2 pmol	[142]

m, mouse; r, rat; gp, guinea-pig; mSP r, Marchigian Sardinian alcohol-preferring rats; icv, intracerebroventricular; it, intrathecal; iv, intravenous; TW, tail-withdrawal; LA, locomotor activity; AIMS, abnormal involuntary movements in hemiparkinsonian rats that become dyskinetic after chronic treatment with L-DOPA; HR, heart rate; BP, blood pressure; CRF, corticotropin releasing factor; RS, restraint stress; *indicates that the maximal effects elicited by UFP-112 in these assays are significantly higher than those produced by N/OFQ.

Tabella 3

Profilo farmacologico *in vivo* di UFP-112 (Calò et al. 2011).

In conclusione UFP-112 è un agonista puro potente e selettivo per NOP, particolarmente resistente alla degradazione enzimatica e capace di produrre effetti *in vivo* duraturi nel tempo. UFP-112 rappresenta un utile strumento di ricerca per studi atti all'identificazione di potenziali agonisti per NOP come classe innovativa di farmaci analgesici. Inoltre, la natura peptidica di UFP-112 non limita la sua utilità, e la possibilità di sviluppare farmaci per le condizioni in cui non è richiesta una somministrazione sistemica. Questo include anche stati di dolore cronico in pazienti intolleranti o refrattari a oppioidi sistemici, dove i peptidi possono però essere somministrati solo utilizzando pompe impiantate a livello intratecale.

1.4.4 Coinvolgimento del sistema N/OFQ – NOP nel sistema nervoso centrale ed in periferia

Agendo sia a livello del SNC che periferico, N/OFQ modula la funzionalità di diversi organi e sistemi inclusi: cuore, vasi sanguinei, vie aeree, reni, vescica urinaria, sistema gastrointestinale e immunitario (Lambert 2008). N/OFQ è in grado di indurre bradicardia e ipotensione (Champion e Kadowitz 1997), possiede proprietà vasorilassanti (Champion et al. 1998), stimola la diuresi (Kapusta et al. 1997), controlla funzioni gastrointestinali sotto condizioni sia fisiologiche che patologiche (Osinski e Brown 2000), modula funzioni immunitarie (Gavioli e Romão 2011) e inibisce alcune riflessi mediati da fibre sensoriali come la tosse e la minzione. Su queste osservazioni, sono stati sviluppati diversi agonisti

per NOP, ora sottoposti a studi clinici, come agenti antitussivi (McLeod et al. 2011) e come farmaci innovativi per trattare incontinenze urinarie (del Popolo et al. 2012).

Fra gli effetti provocati da N/OFQ maggiormente studiati vi è la sua capacità di reprimere comportamenti stress-correlati e di indurre effetti ansiolitici. Studi pilota in questo campo dimostrano un'azione ansiolitica di N/OFQ in vari test comportamentali sensibili alle benzodiazepine (Jenck et al. 1997). Risultati simili sono stati riportati da somministrazioni sistemiche di Ro 64-6198 un potente e selettivo agonista del recettore NOP, sintetizzato da Roche (Jenck et al. 2000). Inoltre, gli effetti ansiolitici di Ro 64-6198, sembrano non essere accompagnati da sviluppo di tolleranza dopo somministrazioni prolungate per più di due settimane (Dautzenberg et al. 2001). Studi su animali knockout avvalorano queste osservazioni. Topi ppN/OFQ(-/-) mostrano maggiore tendenza a sviluppare comportamenti ansiogeni se esposti ad ambienti ostili, e incrementano i livelli di corticosterone stress-indotto, nel plasma (Koster et al. 1999).

Topi NOP (-/-) mostrano invece fenotipo ansioso meno marcato nelle stesse condizioni di ansia-correlate (Gavioli et al. 2007). Il meccanismo mediante il quale N/OFQ esibisce i suoi effetti ansiolitici non sono del tutto chiari, ma ci sono numerose evidenze del coinvolgimento della via di segnale del recettore GABA_A (Gavioli et al. 2008; Uchiyama et al. 2008), oltre all'implicazione dei sistemi serotoninergico e del fattore di rilascio delle corticotropine (Corticotropine Releasing Factor, CRF) (Gavioli e Calò, 2006).

Interessanti studi clinici suggeriscono che i livelli plasmatici di N/OFQ aumentano in pazienti depressi (Gu et al. 2003). Poco si conosce riguardo i possibili meccanismi coinvolti negli effetti antidepressivi degli antagonisti NOP. Inoltre è stato riportato in letteratura che N/OFQ è in grado di inibire il rilascio di noradrenalina e serotonina dalla corteccia frontale, nel locus coeruleus e dorsal raphe (Gavioli e Calò, 2006). Condizioni croniche di stress/disperazione stimolano il rilascio di N/OFQ, che può ridurre il segnale monoaminergico sia a livello pre che post sinaptico. L'uso di alcuni antagonisti per N/OFQ – NOP può ripristinare i livelli normali di noradrenalina e serotonina. Così gli antagonisti per NOP, possono agire a diversi livelli e con differenti meccanismi, raggiungendo risultati finali, come per esempio le concentrazioni di monoamine in sinapsi corticali, simili a quelli ottenuti dagli altri antidepressivi classici (Gavioli e Calò, 2006; Vitale et al. 2009).

1.5 Antagonismo funzionale tra Nocicettina/Orfanina FQ e il Fattore di Rilascio delle Corticotropine in condizioni legate a stati di ansia, nel ratto: coinvolgimento del sistema serotoninergico.

1.5.1 Asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene

Il principale meccanismo adattativo che il nostro organismo mette in atto in condizioni di stress è l'attivazione dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Surrene (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis, HPA). In risposta a uno stress fisico o psicologico, i neuroni del nucleo

paraventricolare dell'ipotalamo secernono in maggiore quantità una sostanza denominata fattore rilasciante la corticotropina (CRF), che coordina e modula tutta la risposta adattativa agli stimoli correlati ad emergenza/stress. CRF, attraverso il circolo portale ipotalamo-ipofisario stimola il rilascio dell'ormone adrenocorticotropo (Adreno Cortico Tropic Hormone, ACTH) dalla neuroipofisi. L'ACTH induce la produzione e il rilascio di ormoni glucocorticoidi da parte della corticale del surrene (Figura 6).

L'ipotalamo riceve afferenze dal sistema nervoso centrale, informazioni relative a volemia, temperatura, osmolarità del plasma e concentrazione degli ormoni prodotti dalle ghiandole endocrine, che ne regolano il funzionamento tramite meccanismi di feedback. Perciò possiamo dire che l'ipotalamo è il principale trasduttore delle informazioni nervose in stimoli endocrini ed è responsabile della regolazione del bioritmo, della termoregolazione, della sintesi proteica, del metabolismo basale, della fame, della sete, del catabolismo proteico e dell'attività riproduttiva. L'ipofisi o ghiandola pituitaria è correlata all'ipotalamo sia morfologicamente che funzionalmente. Essa è composta da due parti: l'adenipofisi, ghiandola secernente ormoni proteici e la neuroipofisi, estensione dell'ipotalamo. Per mediare tutte le attività fino ad ora descritte, i neuroni dei vari nuclei ipotalamici secernono una serie di fattori di rilascio e d'inibizione i quali a loro volta rilasciano corticotropine che, attraverso il sistema portale ipotalamo-ipofisi, arrivano all'adenipofisi dove regolano la trascrizione del gene pro-opio-melanocortina (POMC) che codifica per un precursore dell'ACTH stimolando il suo rilascio nel sangue.

L'ACTH, regolato dal CRF, trasportato a livello della corticale del surrene, mediante interazione col proprio recettore, induce la sintesi e il conseguente rilascio nel plasma di glucocorticoidi come il cortisolo nell'uomo e corticosterone nel ratto. Si è visto come, in condizioni di stress psico-fisico di forte intensità, la concentrazione plasmatica di glucocorticoidi aumenti con conseguente incremento della gittata cardiaca, innalzamento della gluconeogenesi epatica, riduzione delle difese immunitarie, diminuzione della sintesi di collagene che favorisce osteoporosi e metabolismo di acidi grassi. Definiamo questi effetti come catabolici perché hanno la finalità unica, nel caso in cui l'organismo sia sottoposto a stress, di fornire i giusti strumenti atti ad affrontare tale variazione subita per ritornare così all'omeostasi propria dell'organismo (Holsboer 2000).

La funzionalità dell'asse HPA si basa su un meccanismo di autoregolazione a feedback negativo sull'attività delle cellule ipotalamiche e ipofisarie che comporta una limitazione nel rilascio di ACTH. La regolazione dei glucocorticoidi è dunque sotto il controllo dell'ACTH ipofisario, che a sua volta viene regolato con il feedback negativo dei glucocorticoidi stessi. Per esplicare la propria azione i glucocorticoidi devono interagire con i loro recettori che sono diversi in caso di interazione con i mineralcorticoidi (MR) o con i glucocorticoidi (GR). In entrambi i casi l'espressione dei recettori avviene da un singolo gene: quello per l'MR trascrive per due RNA messaggeri ma la proteina è unica, mentre il gene per GR produce due tipi di recettori, α e β . Sono presenti sia nei tessuti

periferici che nel sistema nervoso centrale e non solo a livello ipotalamico. A livello dell'asse HPA entrambi i recettori mediano il feedback negativo. MR svolgono un ruolo importante nella variazione del ritmo circadiano, nella risposta allo stress, mentre la risposta principale dei GR è quella di ridurre l'attività dell'asse indotta da stress (Schule 2007). L'attività dell'asse è regolata, oltre che da un meccanismo di feedback inibitorio, anche da diverse aree del sistema limbico quali ippocampo, corteccia prefrontale e amigdala. Queste aree, a loro volta, comunicano tra di loro e regolano finemente la risposta del cervello ai diversi stimoli emotivi. Ecco dunque che, se sottoposti a stress, si generano variazioni temporanee e/o permanenti dell'ippocampo; perciò in definitiva si notano, in specifiche situazioni, delle alterazioni dell'asse HPA tali da dare come unica risposta cambiamenti patofisiologici, che possono addirittura sfociare in disturbi dell'ordine della depressione maggiore. Sono numerose le evidenze cliniche e sperimentali che mostrano come l'asse HPA gioca un ruolo decisivo nello sviluppo di stati di ansia e depressione.

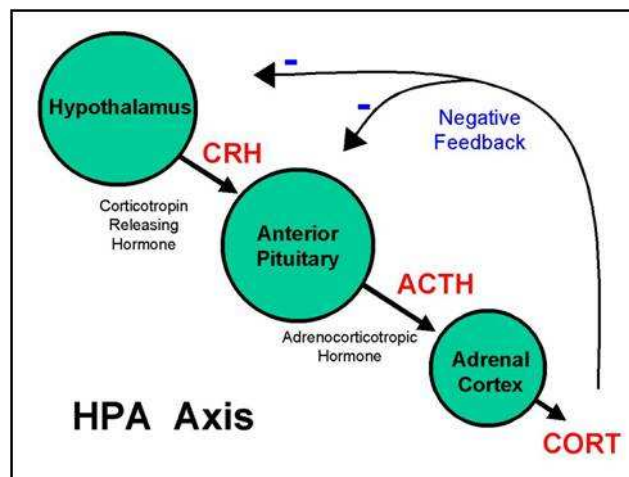


Figura 6
Meccanismi di retroazione negativa relativi all'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA axis).

1.5.2 Il sistema Serotoninergico

1.5.2.1 Il neurotrasmettitore serotonina

La risposta adattativa allo stress modulato dal CRF non riguarda solo la secrezione di ormoni dell'ipofisi ma coinvolge, attraverso connessioni nervose dirette, la maggior parte dei neurotrasmettitori. In particolare, un aumento di CRF determina un incremento nella produzione di catecolamine: nello specifico di noradrenalina e serotonina.

La serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT), così chiamata dal suo scopritore Rapport et al. (1948) agisce da messaggero, neuromodulatore ma essa è conosciuta soprattutto come importante neurotrasmettitore del sistema nervoso centrale. Il suo precursore è il triptofano, un aminoacido introdotto con la dieta, che deriva dalla degradazione delle proteine. Esso viene captato dai neuroni per mezzo di un processo di trasporto attivo e

convertito dalla triptofano-idrolasi a 5-idrossitriptofano (5-HTP) e quindi decarbossilato a 5-HT da una carbossilasi non specifica. Dopo il suo rilascio, la maggior parte della serotonina viene recuperata da un sistema di ricaptazione inibito da molti farmaci antidepressivi come i triciclici.

5-HT è un neurotrasmettitore inibitorio, con ruolo determinante nei processi neurobiologici, tra i quali la regolazione del sistema sonno-veglia. Infatti i disturbi del sonno, sono i primi segni di stress e sono dovuti ad un abbassamento dei livelli di tale neurotrasmettitore (Elhwueg 2004). Le sue funzioni sono concertate da neuroni serotonergici localizzati sulla linea mediana del tronco cerebrale a livello del bulbo, ponte e mesencefalo dove si ritrovano addensati soprattutto nel nucleo del rafe dorsale (DRN) e mediano (MRN) da cui le proiezioni neuronali serotonergiche innervano diverse aree: la corteccia, il talamo, l'amigdala, i nuclei della base, il pallido, il nucleo accumbens, e l'ippocampo, l'ipotalamo, la neuroipofisi (Davis et al. 1995); dunque, una disfunzione a quest'ultimo livello è associata alla depressione (Deakin 1996) (Figura 7).

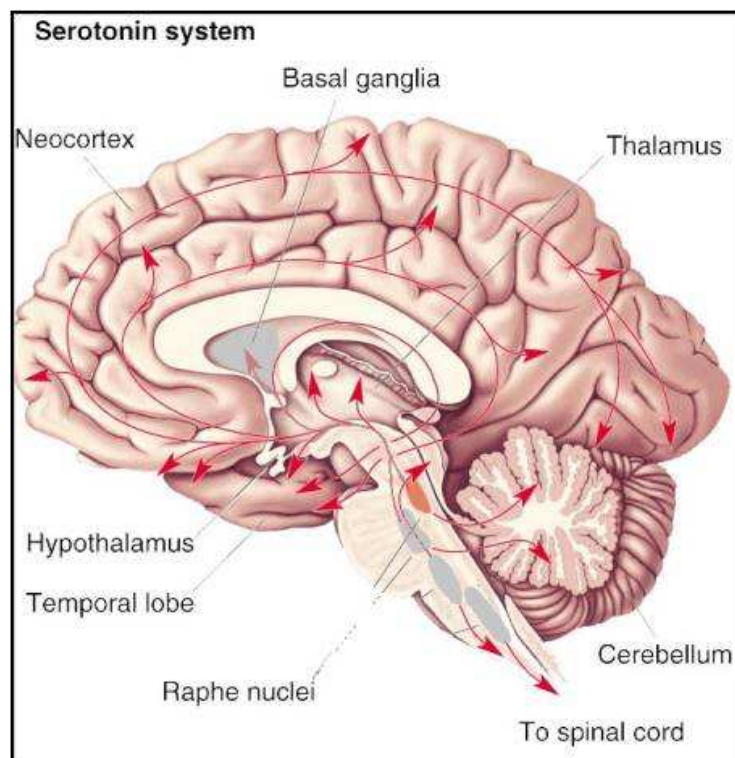


Figura 7
Il sistema serotonergico nell'uomo.

1.5.2.2 I recettori serotonergici

I recettori della 5-HT sono raggruppati in sette classi 5-HT₁₋₇, e appartengono tutti alla superfamiglia di recettori accoppiati a proteine G (Hoyer et al. 2002) ad eccezione del recettore 5-HT₃, che è un canale regolato da ligandi ionici. Tutti vengono espressi nel SNC e ognuno esplica diverse funzioni. Ai fini dello studio condotto, ci siamo soffermati sui

recettori di tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}. Il sottotipo recettoriale 5-HT₁ è accoppiato a proteine *Gai/Gao*; mentre il sottotipo 5-HT₂ è accoppiato a proteine *Gaq* (Bockaert et al. 2006) (Figura 8). I recettori 5-HT₁ trasducono effetti inibitori; si comportano, da autorecettori, inibendo la liberazione di 5-HT, che può portare ad una riduzione dell'ansia e dell'aggressività (Gonzalez-Heydrich e Peroutka 1990). Altri recettori 5-HT₁ post-sinaptici traducono segnali di attivazione sulla funzione surrenale e ipotalamico-pituitaria, aumentando il rilascio di adrenocorticotropina e prolattina (Lesch et al. 1989). Di essi si riconoscono il sottotipo 5-HT_{1A} espresso dai neuroni dei nuclei del rafe. Sono anche diffusamente distribuiti nel sistema limbico e si ritiene che rappresentino il principale bersaglio dei farmaci utilizzati nel trattamento dell'ansia e della depressione. I recettori 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} si trovano prevalentemente localizzati nei gangli della base e gli agonisti che agiscono su quest'ultimi recettori sono utilizzati nella cura dell'emicrania (Peroutka e Sleight 1991). I recettori 5-HT₂ si distinguono in 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, e sono rappresentati soprattutto dal sottotipo 5-HT_{2A}. Esercitano un effetto eccitatorio a livello postsinaptico, sono numerosi nella corteccia frontale e nel sistema limbico (Gonzalez-Heydrich e Peroutka, 1990), e possono essere associati a fenomeni psicotici (Costall et al. 1989; Chen et al. 1992). Si presume, infatti, siano il target di vari farmaci allucinogeni. Inoltre essi risultano primariamente implicati in condizioni legate all'ansia, visto che un blocco dei sottotipi recettoriali 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}, mediante antagonisti selettivi, comporta un chiaro effetto ansiolitico sia nel ratto che nel topo (Griebel et al. 1997).

Il sistema serotonergico è altresì importante soprattutto nel controllo della secrezione di ormoni steroidei; infatti, variazioni dei livelli plasmatici di questi ormoni sono indice dell'efficacia terapeutica di farmaci serotonergici in alcuni disturbi della sfera psichica. A tale proposito una stimolazione serotonergica mediata prevalentemente dai recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} porta alla secrezione di ACTH e dunque di ormoni della corticale del surrene, i quali possono per contro modulare negativamente l'attività dei neuroni serotonergici. L'interazione tra i due sistemi controlla il ritmo circadiano, lo stress, l'ansia, la depressione e i disturbi dell'alimentazione.

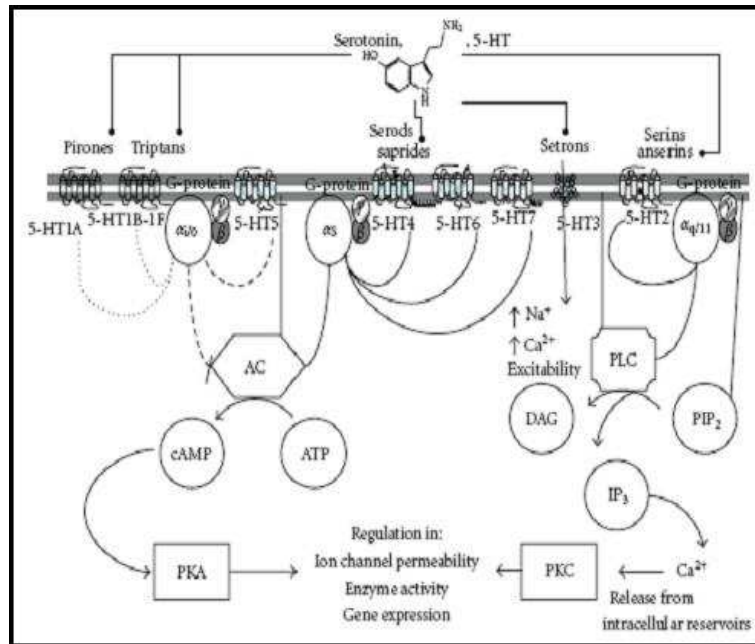


Figura 8
 Vie di segnali intracellulari principali mediate dalla serotonina (Berumel et al. 2011).

1.5.2.3 Implicazioni del sistema serotoninergico in stati di ansia

In modelli animali esposti a diversi tipi di fattori stressanti, ad esempio il restringimento di cibo o l'elettroshock, è stato osservato un incremento del turnover di 5-HT nella corteccia prefrontale, nel nucleus accumbens, nell'amigdala e nell'ipotalamo laterale (Inoue et al. 1994). Stimoli che richiamano condizioni di paura, sembrano avere un maggiore impatto sul sistema serotoninergico nella corteccia prefrontale. Il sistema serotoninergico viene influenzato, a seconda dei vari tipi di stress, determinando effetti di tipo ansiogeno o ansiolitico; ciò dipende molto dal tipo di recettore per la 5-HT e quindi della via di segnale specifica che viene stimolata. Per esempio se la 5-HT viene iniettata nell'amigdala determina un potenziamento di comportamenti condizionati alla paura mentre, se le stesse concentrazioni di 5-HT sono iniettate nella zona grigia periacqueduttale, questi comportamenti vengono inibiti (Graeff et al. 1993).

Sempre Graeff et al. (1993), hanno postulato che l'innervazione serotoninergica nell'amigdala e nell'ippocampo mediano gli effetti ansiogeni mediante l'attivazione dei recettori 5-HT_{2A}, mentre l'attivazione dei recettori 5-HT_{1A} nell'ippocampo inibiscono tali comportamenti. In supporto a questa ipotesi, topi 5-HT_{1A} (-/-) mostrano un incremento nell'ansia e nella paura, mentre somministrazioni croniche di agonisti parziali di 5-HT_{1A} esercitano effetti ansiolitici sia in roditori che in pazienti che hanno disturbi ansiosi generalizzati (Ramboz et al., 1998). Sia condizioni di stress che somministrazioni di glucocorticoidi esercitano i loro maggiori effetti sull'espressione dei recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}. È noto che la regolazione dell'espressione dei recettori 5-HT_{1A}, dipende da ACTH che esercita condizioni di inibizione tonica nell'ippocampo, e in generale in tutte le zone del cervello, in cui sono espressi i recettori per i mineralocorticoidi (Meaney et al. 1991).

La densità di 5-HT_{1A} si riduce in risposta a stress cronico o in risposta a somministrazioni di glucocorticoidi, mentre essa aumenta dopo surrenectomia. Contrariamente l'espressione dei recettori 5-HT_{2A} aumenta in seguito a stress cronico e dopo somministrazioni croniche di glucocorticoidi, mentre si riducono in risposta a surrenectomia (Watanabe et al. 1993). E' evidente che i recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} giocano un ruolo reciproco nella mediazione degli effetti dello stress. Sono state fatte molte ipotesi sull'azione regolatoria dei glucocorticoidi sui recettori per la 5-HT. Quindi 5-HT, i suoi recettori e anche i glucocorticoidi sono rilevanti nella psicopatologia dell'ansia.

1.5.3 Il sistema N/OFQ – NOP nell'ansia

Numerose evidenze sperimentali che utilizzano modelli animali di ansia, riportano effetti ansiolitico-simili in risposta a somministrazioni i.c.v., a dosi relativamente basse, di N/OFQ (Jenck et al. 1997). Successivamente anche altri studi dimostrano gli effetti ansiolitici del ligando naturale N/OFQ in topi in elevated plus-maze test (Gavioli et al. 2002). E' stato inoltre dimostrato che gli effetti ansiolitico-simili dell'agonista per NOP, Ro64-6198, sono sensibilmente bloccati dall'antagonista J-113397 e assenti in topi NOP (-/-) (Varty et al. 2005), ciò dimostra l'esclusivo coinvolgimento di NOP nella mediazione degli effetti ansiolitici di N/OFQ. Studi su animali knockout evidenziano una implicazione anche del sistema N/OFQ – NOP nel controllo dell'ansia. Utilizzando test ansiometrici, topi pp N/OFQ (-/-) mostrano un fenotipo ansiogenico (Koster et al. 1999). Fernandez et al. (2004), riportano, contrariamente a quanto affermato fino ad ora, che somministrazioni di N/OFQ in ratti, in dosi simili agli studi condotti da Jenck e colleghi, inducono un effetto ansiogenico simile. Non ci sono differenze in termini di trattamenti dei modelli animali e condizioni sperimentali utilizzati, nei due gruppi di ricerca tali da poter attribuire la spiegazione degli effetti opposti. Inoltre, fra i parametri comportamentali valutati con elevated plus maze test il gruppo di Fernandez et al. (2004), riportano una riduzione del tempo speso nelle braccia aperte e chiuse dei ratti, indicatori dell'attività locomotoria, in risposta solo alle alte dosi di N/OFQ. Vitale et al. (2006), documentano questa diversità di effetti, in modelli animali di ratti, sottoposti a somministrazione di N/OFQ i.c.v. in un intervallo di concentrazioni tra 0,75 nmolare e 1,5 nmolare. Si osservava una riduzione nel numero di entrate nelle braccia chiuse e del tempo speso nelle braccia aperte. Questi risultati sono stati interpretati come dovuti all'inibizione locomotoria da parte di N/OFQ.

Successivamente, Vitale e Arletti (2006), dimostrano che somministrazioni ripetute i.c.v. di N/OFQ in ratti a dosi tra 0,5 nmoli e 10 nmoli, promuovono effetti ansiolitico-simili senza modificare il numero delle entrate nelle braccia chiuse, poiché gli animali svilupparono tolleranza agli effetti ipoloomotori di N/OFQ. Complessivamente, questi risultati dimostrano che gli effetti di N/OFQ osservati nell'elevated plus maze test possano dipendere da influenze sull'attività locomotoria degli animali, dovuti all'utilizzo di alte dosi del peptide. Inoltre è importante considerare il metodo utilizzato per misurare l'ansia e

la paura, poiché esistono delle differenze sostanziali. Indipendentemente da queste considerazioni, sono numerose le evidenze che suggeriscono che N/OFQ può avere azioni anti-stress generali, in differenti modelli comportamentali stress correlati, come l'anoressia indotta da CRF (Ciccocioppo et al. 2004), la dipendenza dall'alcool (Martin-Fardon et al. 2000), o l'analgia stress-indotta (Rizzi et al. 2001b).

In questi modelli si osserva una riduzione o un totale blocco degli effetti, in risposta a somministrazioni i.c.v. di N/OFQ a dosi relativamente basse. In letteratura esistono scarse informazioni riguardo gli effetti degli antagonisti per NOP in condizioni di ansia. E' stato dimostrato che in ratti sottoposti a stress cronico moderato (Vitale et al. 2009) e valutati con elevated plus mazed test, N/OFQ è in grado di indurre effetti ansiolitico-simili in modo dose dipendente, e che tali effetti possono essere prevenuti utilizzando l'antagonista specifico per NOP, UFP-101 che da solo non è in grado di modificare il comportamento degli animali. Questi risultati dimostrano che il sistema peptidergico N/OFQ non controlla in modo tonico i comportamenti legati all'ansia. In letteratura poco è ancora noto relativamente ai possibili meccanismi con cui N/OFQ esprima i propri effetti ansiolitico-simili.

Studi *in vitro* dimostrano che N/OFQ è un potente inibitore del rilascio di numerosi trasmettitori, fra cui la 5-HT (Schlicker e Morari 2000), che gioca un ruolo cruciale nel controllo dell'ansia e della paura (Millan, 2003). Inoltre i farmaci comunemente utilizzati per il trattamento dell'ansia come le benzodiazepine, sono capaci di ridurre la neurotrasmissione serotoninergica nella corteccia frontale (Wright et al. 1992; Rex et al. 1993). Infine agonisti per i recettori 5-HT_{1A} e selettivi per il re-uptake di 5-HT, vengono largamente utilizzati per trattamenti di pazienti affetti da disturbi di ansia (Nutt 2005). Esistono diverse relazioni fra il sistema N/OFQ – NOP e il sistema serotoninergico; i recettori NOP sono co-localizzati in neuroni serotoninergici nei nuclei del rafe dorsale (Le Maitre et al. 2005); l'attivazione di questi recettori producono un incremento nella corrente intracellulare di K⁺ (Vaughan and Christie 1996) che è sensibile all'antagonista UFP-101 (Gavioli et al. 2004). Inoltre basse dosi di N/OFQ incrementano il turnover di 5-HT nell'ippocampo (Kamei et al. 2004) ed il blocco farmacologico di 5-HT_{1A} previene gli effetti ansiolitico-simili indotti da N/OFQ, in hole-board test (Kamei et al. 2004). La capacità di N/OFQ di contrastare gli effetti ansiogeni indotti dal CRF (Jenck et al. 1997) è un'ulteriore dimostrazione dei suoi effetti ansiolitici. N/OFQ esercita un potente antagonismo funzionale contro l'anoressia indotta dal CRF (Ciccocioppo et al. 2001), e le sue azioni sono mimate dall'agonista per NOP, Ro 64-6198 (Ciccocioppo et al. 2002). Evidenze sperimentali da studi condotti con microiniezioni, indicano che i nuclei della base e la stria terminale sono le aree cerebrali in cui N/OFQ opera il suo antagonismo funzionale (Ciccocioppo et al. 2003). Altri studi condotti utilizzando iniezioni di CRF i.c.v. nel ratto, dimostrano che N/OFQ e CRF interagiscono secondo meccanismi specifici che coinvolgono l'area della stria terminale (Rodi et al. 2008). L'idea che questa interazione

funzionale sia fortemente implicata nel controllo di stati di ansia e stress è supportato indirettamente da altre evidenze sperimentali riportate in differenti studi: i recettori NOP e per CRF sono co-espressi nella stria terminalis (Chalmers et al. 1995; Neal et al. 2001) e CRF è in grado di indurre effetti ansiogenico-simili mediante il proprio recettore localizzato sempre nella stessa area (Sahuque et al. 2006). E' ragionevole dunque, ipotizzare che l'effetto di N/OFQ possa essere mediato da neurotrasmettitori, che sono direttamente coinvolti nel controllo dell'ansia e sono capaci di antagonizzare le risposte ansiogenico-simili indotti da CRF, come quelli serotoninergici. Questo rapporto di antagonismo funzionale che esiste fra N/OFQ e CRF necessita di ulteriori chiarimenti anche allo scopo di capire il meccanismo con cui N/OFQ eserciti i suoi effetti ansiolitici-simili.

1.6 Neuropeptide S stimola la chemiotassi e la fagocitosi di monociti umani attivando il suo recettore (NPSR).

1.6.1 Il sistema Neuropeptide S (NPS) – Recettore NPSR

1.6.1.1 Il Neuropeptide S (NPS)

Il Neuropeptide S (NPS) è l'ultimo peptide endogeno identificato attraverso le tecniche di farmacologia inversa (Xu et al. 2004). L'identificazione di NPS come ligando endogeno del recettore accoppiato a proteine G precedentemente definito "orfano", identificato come GPCR154, è stato il primo ad essere riportato, sotto brevetto, in letteratura (Xu et al. 2004). NPS è un peptide costituito da 20 amminoacidi, la cui sequenza primaria nell'uomo è SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS (Tabella 4). Tale sequenza è altamente conservata fra i vertebrati; in particolar modo è sempre conservata la Serina, amminoacido nella porzione ammino-terminale da cui deriva il nome del neuropeptide stesso (Reinscheid 2007). Le poche variazioni nella sequenza, riguardano soprattutto la porzione carbossi-terminale come nel caso del ratto (*Rattus norvegicus*, utilizzato in ricerca come modello animale), la sequenza varia solo per 4 amminoacidi rispetto al peptide umano, come è possibile vedere in tabella IUPHAR database. Contrariamente la porzione ammino-terminale (costituita dai primi 7 amminoacidi), è identica in tutte le specie suggerendo che possa rappresentare il "core" bioattivo del peptide (Reinscheid 2007) (Figura 9).

Species	Amino Acid Sequence
human	SFRNGVGT GM KKTSF Q RAKS
mouse	SFRNGVGS G AKKTSF R RAK Q
rat	SFRNGVGS G VKKTSF R RAKS

Tabella 4

Sequenze amminoacidiche di NPS in 3 specie, uomo, topo e ratto. In rosso sono evidenziati gli amminoacidi che cambiano fra queste specie (Xu et al. 2004).

Il peptide precursore per NPS (ppNPS) è un tipico precursore neuropeptidico che contiene un segnale idrofobico all'inizio della sequenza peptidica matura costituito da un paio di residui amminoacidici basici (Lisina e Arginina) (Reinscheid e Xu 2005). L'espressione del RNA messaggero del precursore nel cervello mostra una distribuzione molto delimitata in specifiche aree; molti dei neuroni che esprimono ppNPS, si trovano nelle regioni adiacenti il tronco cerebrale: il nucleo sensoriale del trigemino, il nucleo parabranchiale laterale e l'area del locus coeruleus (Xu et al. 2007). Studi d'ibridazione con doppia marcatura dimostrano che la maggior parte delle cellule esprimenti NPS nell'area del locus coeruleus è costituita da neuroni glutammatergici, alcuni sono colinergici mentre nessuno produce GABA. Nel nucleo principale sensoriale del trigemino molti dei neuroni che esprimono NPS utilizzano glutammato come neurotrasmettitore. Nel nucleo parabranchiale laterale, infine, le cellule positive all'NPS co-esprimono il fattore di liberazione per la corticotropina (Xu et al. 2007). Sembra che l'NPS sia prodotto contemporaneamente a neurotrasmettitori eccitatori e su questa base è stato ipotizzato che potrebbe fornire un input eccitatorio supplementare ai bersagli postsinaptici di tali neuroni (Xu et al. 2007).

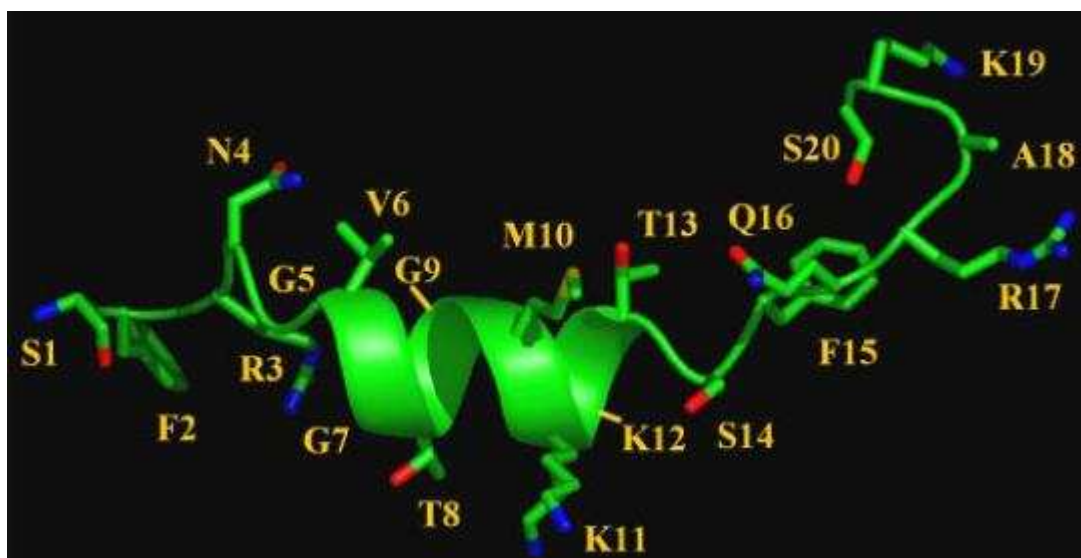


Figura 9

Caratterizzazione della struttura di NPS umano mediante tecnica NMR (Dyson et al. 1998)

1.6.1.2 Il recettore per NPS (NPSR)

Il recettore per NPS, chiamato NPSR (Neuropeptide S Receptor), è un tipico recettore accoppiato a proteine G che mostra però poca omologia con gli altri recettori GPCR. In studi condotti su cellule esprimenti il recettore ricombinante NPSR, NPS, legandosi al proprio recettore, è in grado di attivare contemporaneamente entrambe le vie di accumulo del Ca^{2+} intracellulare e cAMP. Questi dati indicano quindi che NPSR può trasdurre il segnale mediante l'attivazione delle proteine G_s e G_q incrementando l'eccitabilità cellulare. Il sottotipo G_s è in grado di attivare l'adenilato ciclasi nella sintesi di cAMP, aumentandone la concentrazione intracellulare e determinando così l'attivazione della proteina chinasi PKA dipendente da cAMP. Il sottotipo G_q , invece, è in grado di attivare la fosfolipasi C_β (PLC), la quale a sua volta attiva, tramite il fosfatidil inositolo 4,5-bisfosfato (PIP_2), l'apertura dei canali del Ca^{2+} aumentandone il livello intracellulare e stimolando, di conseguenza, altre vie di segnale dipendenti da altre proteine d'amplificazione del segnale, come la proteina chinasi dipendente da Ca^{2+} , PKC. Sono stati condotti numerosi studi sulle isoforme del recettore hNPSR Asn107 e hNPSR Ile107; quest'ultima mostra un'affinità di legame per NPS simile all'isoforma Asn107 ma dotata di potenza maggiore (Reinscheid et al. 2005).

A differenza del ppNPS, NPSR è ubiquitariamente distribuito nell'area cerebrale. Infatti, sono stati riscontrati alti livelli d'espressione dell'RNA messaggero del recettore nella corteccia, così come nei nuclei olfattori, nel talamo, nell'ipotalamo, nell'amigdala e nel subiculum (Xu et al. 2007; Xu et al. 2004), aree coinvolte nella trasmissione di stimoli dal tronco cerebrale alla corteccia (Figura 10). Questo profilo d'espressione suggerisce l'implicazione del sistema NPS – NPSR nella regolazione di molteplici funzioni centrali.

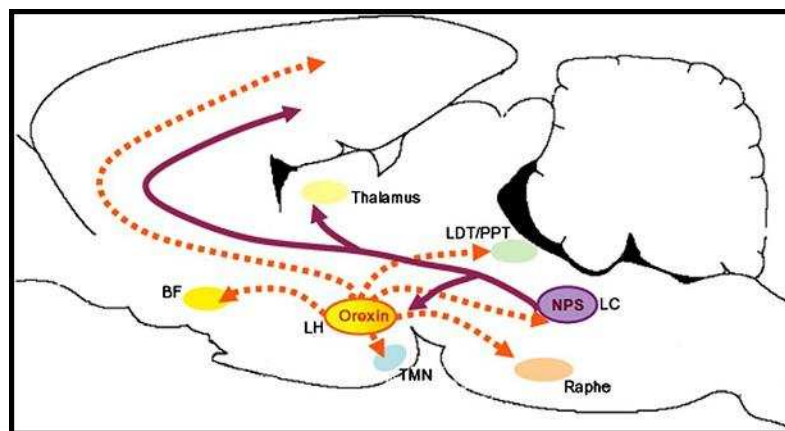


Figura 10
Proiezioni neuronali di NPS nel ratto (Chung e Civelli 2006)

1.6.1.3 Gli effetti biologici mediati dal sistema NPS – NPSR

Gli studi condotti per la caratterizzazione *in vitro* del sistema NPS – NPSR, dal gruppo di ricerca di Guerrini et al. (2010), indicano che in risposta a stimolazione con NPS, le cellule di topo provenienti dai soli tessuti gastrointestinali, genitourinari e respiratori risultano sensibili, dal momento che si misura un aumento della corrente intracellulare del Ca^{2+} . I soli tipi cellulari periferici che risultano essere sensibili a NPS sono i macrofagi, che riducono la propria adesione e incrementano la loro attività fagocitica e chemiotattica (Pulkkinen et al. 2006). Questi studi, insieme ad analisi genetiche condotte sul recettore, che provano l'evidenza per associazione dei polimorfismi del gene NPSR con malattie croniche infiammatorie del sistema respiratorio e gastrointestinale, indicano che il sistema NPS – NPSR può avere un ruolo chiave nella modulazione di una risposta dell'immunità innata e nelle malattie croniche infiammatorie delle barriere epiteliali di organo.

Le informazioni disponibili riguardanti gli effetti biologici *in vivo* di NPS comprendono:

- l'attività locomotoria;
- l'*arousal* e il sonno;
- l'ansia e il tono dell'umore;
- il potenziale di abuso/dipendenza;
- il comportamento alimentare;
- l'apprendimento e la memoria;
- la modulazione del dolore.

Attività locomotoria: nel principale studio eseguito da Xu et al. (2004) si riporta che la somministrazione i.c.v. di NPS nel topo stimola l'attività locomotoria. Tale effetto si manifesta a basse dosi del peptide, sia nel gruppo di topi controllo sia negli animali allenati nei differenti test utilizzati: "open field", "elevated plus maze test" e "light-dark box". Molti studi ne confermano successivamente la validità nel topo (Roth et al. 2006; Leonard et al. 2008; Pañeda et al. 2009) e nel ratto (Smith et al. 2006), suggerendo che l'aumento della locomozione rappresenti un fenomeno consolidato alle varie condizioni sperimentali e in diverse specie animali. E' stata inoltre dimostrata l'implicazione dell'NPSR nella stimolazione locomotoria attraverso l'uso dell'antagonista non peptidico del recettore il SHA 68, suggerendo che il sistema endogeno non preveda il controllo tonico del comportamento locomotorio dell'animale (Okamura et al. 2008).

Arousal e sonno: studi elettroencefalografici sul ratto hanno dimostrato che iniezioni i.c.v. di NPS riducono tutte le fasi del sonno, promuovendo il risveglio (Xu et al. 2004). L'*arousal*, inteso come un comportamento in cui l'animale si trova in uno stato di veglia dimostrando attenzione e reattività nei confronti dell'ambiente, è promosso dall'azione di NPS, nel topo (Rizzi et al. 2008).

È stato inoltre dimostrato che l'*arousal* prodotto da NPS è dovuto all'attivazione selettiva dell'NPSR; infatti la sua azione viene neutralizzata dal peptide antagonista per NPSR [D-Cys (tBu)⁵]NPS, in modo dose-dipendente; inoltre, ha ridotto il tempo di sonno indotto dal diazepam nel topo NPSR(+/-) ma non nel topo NPSR(-/-) (Camarda et al. 2009). Questi risultati indicano che il sistema NPS – NPSR non è tonicamente attivato per mantenere lo stato di veglia.

Ansia e tono dell'umore: studi condotti su somministrazioni i.c.v. di NPS nel topo, mostrano chiari effetti ansiolitici utilizzando differenti test ansiometrici convalidati (Xu et al. 2004), osservazioni successivamente confermate (Rizzi et al. 2008; Pañeda et al. 2009) ed estese ad ulteriori test (Leonard et al. 2008). L'azione ansiolitica di NPS è dovuta ad un effetto autentico poiché i livelli di ansia sono misurati come comportamento attivo (Xu et al. 2004; Pañeda et al. 2009). Inoltre, l'effetto di NPS sul comportamento emozionale sembra limitarsi allo stato d'ansia, dal momento che il peptide è risultato inattivo in test sensibili agli effetti degli antidepressivi (Leonard et al. 2008). Gli effetti inibitori presinaptici esercitati da NPS sul rilascio di 5-HT e di noradrenalina dalla corteccia (Raiteri et al. 2009) possono essere coinvolti nell'effetto ansiolitico di questo peptide.

Il sistema NPS – NPSR potrebbe controllare tonicamente i livelli d'ansia, dal momento che chiari effetti ansiogeni sono stati osservati nel topo nell'"open field test" in risposta a iniezione nell'amigdala di SHA 68 (Jüngling et al. 2008). Tali risultati evidenziano il profilo comportamentale piuttosto unico di NPS che ha sia effetti ansiolitici che stimolatori dello stato di *arousal*. Questa particolarità è condivisa soltanto con la nicotina, capace di aumentare l'*arousal*, la veglia, gli effetti anti-stress e ansiolitici. È interessante constatare che il trattamento cronico con nicotina nei ratti incrementa sia NPS che l'espressione di NPSR nel tronco cerebrale e NPSR nell'ipotalamo (Lage et al. 2007). In questo modo la nicotina potrebbe produrre alcuni dei suoi effetti attraverso la regolazione del sistema NPS – NPSR.

Potenziale di abuso/dipendenza: il profilo particolare di NPS sopra citato, insieme all'espressione di NPSR nelle aree del cervello interessate dagli effetti di gratificazione delle sostanze d'abuso, ha spronato lo studio degli effetti di NPS sulla tossicodipendenza. Negli studi di "conditioned place preference" sul topo, NPS non modifica il comportamento dell'animale. Tuttavia, NPS ha bloccato sia l'acquisizione che l'espressione della "place preference", indotta dalla morfina. Questi risultati hanno rivelato la partecipazione di NPS nell'attività di gratificazione della morfina stessa (Li et al. 2009). Gli effetti di NPS inoltre sono stati valutati sull'assunzione dell'etanolo in modelli animali di ratto alcool preferenti e in ratti controllo. NPS somministrato i.c.v. ha ridotto l'assunzione di etanolo negli animali alcool-preferenti ma non nei controlli. Il peptide non ha alterato il comportamento ansioso, né l'attività motoria generale in questi ratti, ma tuttavia ha indotto un effetto ansiolitico (Badia-Elder et al. 2008). Molto recentemente, due

studi complementari hanno indagato il ruolo di NPS nel comportamento della ricerca compulsiva di sostanze d'abuso. L'astinenza da cocaina è stata valutata nel topo da Pañeda et al. (2009): iniezioni i.c.v. di NPS ristabiliscono, in modo dose-dipendente, il comportamento di ricerca della droga una volta estinto. L'astinenza da etanolo è stata studiata nel ratto da Cannella et al.(2009). Negli esperimenti di auto-somministrazione, i tassi di risposta stabili osservati per il rinforzo dell'etanolo non sono stati modificati da iniezioni i.c.v. di NPS. Questi studi suggeriscono che il sistema NPS – NPSR possa essere un bersaglio importante per la ricerca sull'abuso di droghe.

Comportamento alimentare: numerosi studi hanno dimostrato che NPS può ridurre l'assunzione di cibo, inducendo un segnale anoressizzante nel cervello. La prima evidenza di tale azione di NPS è stata fornita da Beck et al. (2005) e successivamente confermata da Smith et al. (2006): iniezioni di basse dosi di NPS nel nucleo paraventricolare produce consistenti effetti anoressizzanti. NPS può interessare i processi relativi all'appetito negli individui iperfagici e ipofagici in modo differente a seconda del paradigma sperimentale utilizzato. Il meccanismo con cui NPS regola l'assunzione di cibo è attualmente sconosciuto. Gli unici dati disponibili che suggeriscono un coinvolgimento di NPSR nell'azione anoressizzante sono quelli descritti da Ciccocioppo et al. (2006): è stato dimostrato che l'agonista parziale di NPSR [Ala³]NPS neutralizza l'effetto inibitorio di NPS sull'ingestione di dieta altamente appetibile nel ratto. Sono necessari ulteriori studi per chiarire il coinvolgimento del sistema NPS – NPSR nella regolazione del comportamento alimentare.

Apprendimento e memoria: risultati recenti dimostrano un ruolo nella regolazione della memoria da parte del sistema NPS – NPSR. NPS facilita l'estinzione delle risposte condizionate dalla paura una volta somministrato nell'amigdala nel topo (Jüngling et al. 2008). Inoltre, l'iniezione dell'antagonista SHA 68, nelle stesse condizioni sperimentali, ha prodotto effetti opposti che aumentano la risposta di immobilità/freezing nel topo dopo stimolo condizionato. Questi risultati hanno dimostrato che il sistema NPS – NPSR nell'amigdala svolge un ruolo importante facilitando l'estinzione dei ricordi negativi (Xu et al. 2004). Topi NPSR(-/-) hanno mostrato deficit significativi in diversi modelli sperimentali. Inoltre, NPS ha migliorato la prestazione cognitiva nel “novel object recognition task test” (Okamura et al. 2008) e scoperte molto recenti hanno dimostrato che NPS, iniettato i.c.v., facilita la memoria spaziale nel topo al test di Morris (Han et al. 2009).

Modulazione del dolore: recentemente Li et al (2009) hanno studiato le possibili azioni di modulazione del dolore indotte dalla somministrazione i.c.v. di NPS nel topo, utilizzando i test della retrazione della coda e della piastra calda, dove si dimostra che NPS causa effetti antinocicettivi dose-dipendenti. In entrambi i test, l'azione di NPS è risultata sensibile all'antagonista del peptide [D-Cys (tBu)⁵]NPS (Li et al. 2009). Questi risultati hanno

rivelato che NPS potrebbe produrre gli effetti antinocicettivi attraverso il suo recettore e che il sistema oppioide non è coinvolto in questa azione.

Esiste quindi in letteratura, la prova convincente che il sistema NPS – NPSR regoli molteplici funzioni biologiche, comprendenti l'attività locomotoria, l'*arousal* e il ritmo sonno/veglia, lo stress e l'ansia, l'assunzione di cibo, la tossicodipendenza, i processi legati alla memoria e probabilmente anche la trasmissione del dolore.

1.6.1.4 Utilizzo di antagonisti peptidici e non peptidici come strumenti di ricerca per lo studio del sistema NPS – NPSR

Subito dopo l'identificazione del sistema NPS – NPSR, diversi gruppi di ricerca hanno iniziato numerosi studi al fine di identificare la sequenza bioattiva di NPS, e i suoi residui amminoacidici più importanti, coinvolti nel riconoscimento di NPSR. Si tratta di studi classici Ala- e D-scan e studi condotti con le porzioni tronche ammino e carbossi-terminali di NPS (Bernier et al. 2006; Reinscheid et al. 2005; Roth et al. 2006). La sostituzione sistematica di amminoacidi della sequenza primaria di NPS, con residui di Alanina, fornisce informazioni sul contributo di ogni singolo residuo all'attività biologica di NPS. I risultati di questi studi (Figura 11) dimostrano che le posizioni 2,3,4 e 7 sono cruciali affinché NPS espliciti la propria azione biologica (Bernier et al. 2006). Allo stesso modo questi studi mettono in evidenza il ruolo critico della sequenza Fenilalanina²-Arginina³-Aspartato⁴ (Phe²-Arg³-Asn⁴), e confermano l'importanza del residuo Glicina in posizione 7, per il riconoscimento con NPSR. Gli studi condotti con metodi D-scan, sono applicati per avere informazioni sul contributo dato dalla chiralità di ogni singolo amminoacido, e confermano i risultati ottenuti con gli studi Ala-scan (Reinscheid et al. 2005). Gli studi condotti sulle porzioni ammino e carbossi-terminali sono effettuati al fine di identificare gli amminoacidi cruciali per il legame con NPSR e la sua attivazione.

Complessivamente i risultati hanno indicato che la sequenza Valina-Glicina rispettivamente in posizione 6 e 7, sono importanti per l'attività biologica di NPS, e che i residui amminoacidici dalla posizione 11 alla 20 nella porzione carbossi-terminale, non sono fondamentali per l'attività *in vitro*, ma sono necessari per avere effetti *in vivo* (Reinscheid et al. 2005). Infine suggerimenti importanti per il disegno di nuovi ligandi peptidici, si sono ottenuti studiando le conformazioni osservate con analisi in NMR (Tancredi et al. 2007) che mostrano che la sequenza Glicina⁵-Valina⁶-Glicina⁷ (Gly⁵-Val⁶-Gly⁷), rappresenta una regione peptidica flessibile importante per indurre e/o stabilizzare la conformazione bioattiva di NPS. Al contrario la conformazione ad alpha elica intorno alla posizione 7 non è compatibile con l'attività biologica di NPS, anzi è preferibile che non sia presente in questo intorno, infine le modificazioni della Glicina in posizione 5 possono essere critiche per il disegno di ligandi per NPSR con una efficacia ridotta (Guerrini et al. 2010).

Per approfondire le conoscenze relative alle funzioni biologiche di NPS, differenti gruppi di ricerca hanno svolto studi di chimica farmaceutica volti ad identificare tratti della sequenza peptidica capaci di riconoscere e legare il recettore. Da questi è emerso che il tratto N-terminale riveste un'importanza cruciale per l'attività biologica; in particolar modo gli aminoacidi Phe²-Arg³-Asn⁴ si sono rivelati necessari per avere elevata potenza nel legame con NPSR e per determinare la sua attivazione. La sequenza Gly⁵-Val⁶-Gly⁷ sembra essere importante per il mantenimento della conformazione bioattiva del peptide.

Nel contesto di questi studi si può osservare che la sostituzione [D-Ala⁵]NPS produce un peptide che si comporta come un agonista parziale per NPSR. Tale osservazione è risultata critica per l'identificazione di antagonisti peptidici per NPSR, infatti, successivamente gli studi di struttura-attività si sono concentrati sul residuo di Glicina in posizione 5, dimostrando che la sua sostituzione con D-amminoacidi che posseggono un corto braccio lipofilo della catena genera potenti, puri e selettivi antagonisti per NPSR, fra questi spicca il [(tBu)D-Gly⁵]NPS.

Attualmente sono disponibili alcuni strumenti per poter studiare questo sistema peptidergico NPS – NPSR: 1) modelli farmacofori 2) antagonisti peptidici con moderata potenza 3) antagonisti non peptidici potenti 4) topi knockout per NPSR. Ovviamente sono necessari ulteriori strumenti di ricerca per studiare più a fondo il ruolo biologico del sistema peptidergico NPS – NPSR. Attualmente, per le conoscenze al riguardo, si può indicare come gli agonisti per NPSR possono essere usati per trattare sonno, stati di ansia, memoria e disordini da assunzione di cibo; invece antagonisti per NPSR potrebbero rappresentare un nuovo target terapeutico per il controllo di dipendenza da diverse sostanze e per modulare la risposta immunitaria.

Tra questi nel presente studio sono stati utilizzati il [(tBu)D-Gly⁵]NPS ed il [D-Cys(tBu)⁵]NPS, le cui proprietà antagoniste *in vitro*, relativamente alla mobilizzazione del Ca²⁺, hanno dimostrato che il primo è più potente del secondo. È inoltre stato pubblicato recentemente che i sostituenti biciclici della piperazina rappresentano la prima generazione di antagonisti non-peptidici di NPSR (Roth et al. 2006). Tra questi il SHA 68 (3-ossi-1,1-difenil-tetraidro-ossazolo [3,4-a] piperazina-7-carbossi-4-fluoro-benzilamide) è stato utilizzato nel presente studio.

Con lo scopo di incrementare la potenza del peptide, sono stati studiati diversi derivati di NPS che presentano amminoacidi diversi in conformazione chirale D nella posizione 5 ([D-Xaa⁵]NPS). Camarda et al. (2009), hanno identificato la molecola [D-Cys(tBu)⁵]NPS come ligando peptidergico di NPSR e lo hanno caratterizzato farmacologicamente *in vitro* e studiato gli effetti *in vivo*. Essi dimostrano che [D-Cys(tBu)⁵]NPS si comporta da peptide antagonista puro con potenza moderata, competitivo e selettivo per NPSR. Infatti [D-Cys(tBu)⁵]NPS risulta essere inattivo sia come agonista o come antagonista nei confronti di tutti gli altri GPCR. Questo effetto potrebbe anche essere dovuto all'elevata omologia

fra [D-Cys(tBu)⁵]NPS ed il ligando endogeno stesso, poiché rispetto alla sequenza peptidica di NPS, viene sostituito un solo residuo amminoacidico (Camarda et al. 2009). Inoltre l'attività di antagonista puro di [D-Cys(tBu)⁵]NPS, è stata confermata anche *in vivo*: questo antagonista peptidico è in grado di bloccare gli effetti prodotti da somministrazioni di NPS sulla stimolazione della locomozione (Guerrini et al. 2009), l'arousal (Camarda et al. 2009) e gli effetti antinocicettivi sovraspinali (Li et al. 2009). Successivamente, si sono identificati numerosi peptidi antagonisti per NPSR, di prima generazione.

Per ottenere ulteriori informazioni sulla selettività di azione del [tBu-D-Gly⁵]NPS, Guerrini et al. (2009), hanno condotto diverse valutazioni per determinare l'azione agonista o antagonista del peptide mediante saggi di mobilitazione del Ca²⁺, utilizzando come target diversi recettori umani accoppiati a proteine G. Dai risultati si è potuto concludere che [tBu-D-Gly⁵]NPS è un potente antagonista puro e selettivo per NPSR. Inoltre lo studio conferma le osservazioni strutturali elencate in precedenza: 1) la potenza antagonista del peptide è inversamente proporzionale alle dimensioni e alla carica della catena dell'amminoacido inserito in posizione 5, D-Xaa5; 2) tBu e i suoi derivati sulfidrilici direttamente legati con il carbonio in posizione alfa costituiscono la migliore posizione chimica per incrementare la potenza antagonista.

SHA 68 è il primo antagonista non peptidico selettivo per NPSR, chimicamente è classificato come molecola biciclica piperazinica, ed è l'unico ligando di natura non peptidica di cui esistono studi anche *in vivo* riportati in letteratura. SHA 68 mostra una maggiore affinità di legame per NPSR che presenta l'amminoacido Aspartato in posizione 107, (Asn 107) rispetto alla variante con Isoleucina (Ile 107). Questa osservazione sottolinea quindi l'importanza per il legame recettoriale, che ha il residuo amminoacidico in posizione 107 di NPSR. Questo è di particolare interesse poiché Reinscheid et al. (2005), hanno dimostrato come questa variazione polimorfica di NPSR Asn vs Ile, non comporta differenze nell'affinità di legame da parte di molecole agoniste per NPSR ma ne incrementa l'efficacia. Inoltre Ile in posizione 107 stabilizza la conformazione recettoriale che promuove l'attivazione del recettore da parte di un agonista, mentre Asn in posizione 107 facilita il legame dell'antagonista al recettore. Usando la struttura dei composti piperazinici biciclici, quindi, sarebbe possibile sviluppare composti che mostrino una spiccata selettività per una o per l'altra isoforma del recettore NPSR umano, e queste isoforme potrebbero aiutare ad individuare nuove molecole specifiche per il genotipo recettoriale specifico, al fine di sviluppare farmaci specifici per diverse patologie. Sono diversi gli studi in letteratura svolti allo scopo di valutare queste differenze nel genotipo recettoriale. Okamura et al. (2007), hanno mostrato come l'isoforma Asn 107 sia molto meno rappresentativa in soggetti maschi che soffrono di disturbi di panico, quindi antagonisti selettivi per l'isoforma Ile 107 possono essere sviluppati per il trattamento di questi disordini. Inoltre, genotipi recettoriali specifici sono stati ripetutamente associati con

asma o altri disordini immunologici, ma attualmente il ruolo funzionale di NPSR in queste patologie rimane sconosciuto (Laitinen et al. 2004; Feng et al. 2006; Malerba et al. 2007; D'Amato et al. 2007).

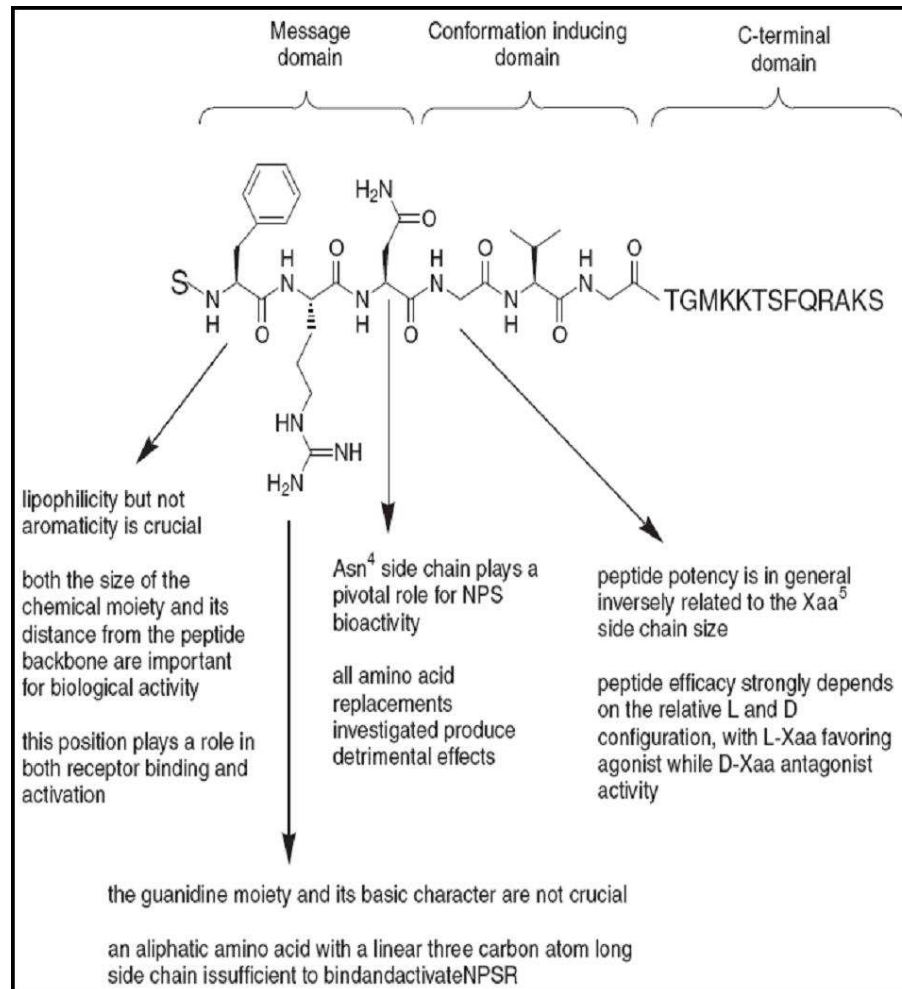


Figura 11

Elenco delle modificazioni e degli studi di struttura-attività sul peptide NPS. Il dominio con attività biologica (Phe²-Arg³-Asn⁴) è cruciale per il legame e l'attivazione al recettore NPSR. La conformazione indotta dal dominio (Gly⁵-Val⁶-Gly⁷) gioca un ruolo chiave per il modellamento attivo di NPS: cambiamenti nella chiralità del carbonio α in posizione 5 hanno un enorme impatto sull'efficienza del peptide. Il dominio C-terminale è necessario per avere l'attività biologica *in vivo* (Guerrini et al. 2010).

1.6.2 La comunicazione "neuroimmunitaria": ruolo dei neuropeptidi nell'infiammazione

In letteratura sono sempre più numerosi gli studi che dimostrano come l'attivazione dell'asse HPA, abbia delle implicazioni immunologiche: dopo stress acuto, per esempio, l'attivazione del sistema nervoso simpatico, comporta la rapida redistribuzione delle cellule del sistema immunitario nell'organo target che ha subito lo stress (Rogausch et al. 1999; Elenkov et al. 2000). Questa risposta dipende dalla concentrazione dei mediatori immunitari, come citochine o peptidi, e dalla presenza di recettori specifici per questi mediatori, posti sulla superficie delle cellule del sistema immunitario. Tale meccanismo, è

tipico della risposta immunitaria innata così come di quella specifica, dopo esposizione a stress (Ziemssen e Kern 2008). I recettori coinvolti, inoltre, sembrano essere diversi a seconda del tipo di risposta: se acuta o cronica, e pro-infiammatoria oppure anti-infiammatoria.

Gli effetti e le implicazioni dei mediatori dello stress sono stati discussi innumerevoli volte. Il sistema immunitario innato può favorire una risposta di tipo T helper tipo cellulare 1 (Th1) o T helper tipo cellulare 2 (Th2). Durante una risposta di tipo Th1, vengono attivati i macrofagi, che secernono differenti mediatori pro-infiammatori (per esempio IL-1, Inf- γ), mentre una risposta di tipo Th2 è caratterizzata dalla produzione di anticorpi e di mediatori anti-infiammatori (per esempio IL-10), che inibiscono la risposta Th1. L'ipotesi di uno sbilanciamento della risposta immunitaria Th1/Th2 per esempio, è stata formulata sulla base di esperimenti condotti su culture cellulari, con l'obiettivo di spiegare la risposta di ipersensibilità dell'organismo allo stress, come la distruzione del tessuto cellulo-mediata, da parte dell'attivazione delle cellule B, che normalmente, proteggono il nostro organismo con la produzione di anticorpi. La corrispondente risposta pro-infiammatoria cellulare e quella anti-infiammatoria umorale, sono largamente utilizzate come sinonimi del termine di "effettori" nei meccanismi di stress. Inoltre l'ipotesi di uno sbilanciamento nella risposta di tipo Th1/Th2, che aggrava i processi infiammatori e la pregressa presenza di patologie nel soggetto, sono punti importanti per valutare il coinvolgimento neuroimmunitario nella patogenesi di disturbi, in patologie ad infiammazione croniche e anche nel cancro (Steinman 2007; Coffman 2006) (Figura 12).

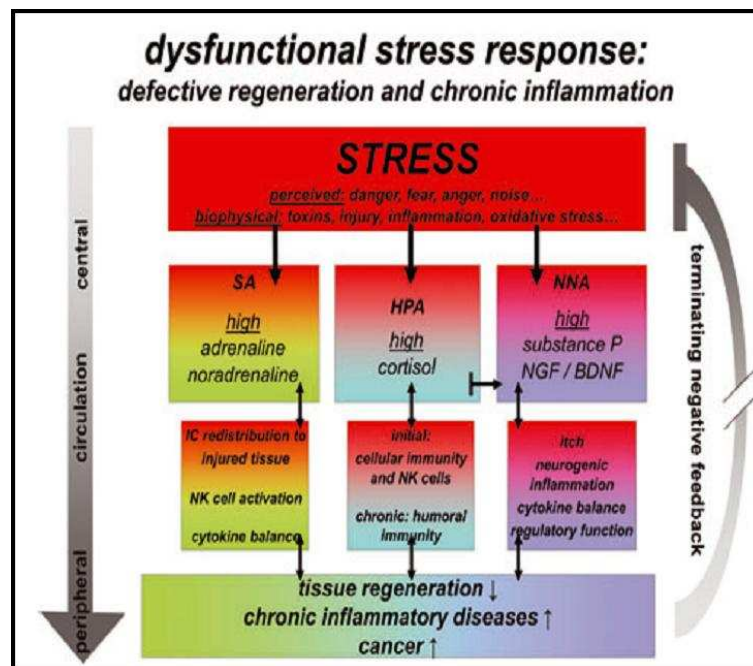


Figura 12

Rappresentazione schematica degli effetti immunologici mediati dalla risposta neuroendocrina allo stress e la loro potenziale implicazione durante le patologie croniche (Peters et al. 2012)

Dalla scoperta di neurotrofine e neuropeptidi si sono accumulati numerosi dati scientifici che documentano un promettente ruolo di questi mediatori, nei meccanismi correlati allo stress, e nella dimostrazione di un asse neuro-immunitario. Tale asse dipende da segnali neurotrofici e coinvolge le fibre nervose peptidergiche, ed è sempre co-attivato dall'asse del sistema nervoso simpatico e dall'asse HPA (Liezmann et al. 2011; Rosenkranz, 2007). I mediatori coinvolti nelle interazioni neuroimmunitarie, come per esempio la sostanza P, si ritrovano localizzati nelle zone in cui le fibre nervose incontrano le cellule del sistema immunitario; ciò avviene un po' ovunque nell'intero organismo umano, ma principalmente hanno un ruolo importante a livello degli organi periferici, o nelle componenti immunitarie nei tessuti periferici (Steinhoff et al. 2003; Mignini et al. 2003). A seguito di stress, i cambiamenti immunologici risultanti sono molto complessi e includono sia effetti pro-infiammatori che anti-infiammatori (Liezmann et al. 2011; Elenkov e Chrousos 2002).

Una delle prime azioni descritte per i neuropeptidi come mediatori del sistema immunitario è stata la loro capacità di attivare dei meccanismi dell'infiammazione neurogena, in cui vi è un rilascio di neuropeptidi, capaci di indurre successivamente la degranolazione di mastcellule, che inducono l'aumento della permeabilità endoteliale dei vasi, la fuoriuscita da tali vasi del plasma e l'infiltrazione delle cellule del sistema immunitario nella zona del tessuto infetto. Questo insieme di effetti spiega la gravità della risposta immunitaria di patologie croniche (Singh et al. 1999; Harvima et al. 2010). Inoltre i neuropeptidi facilitano il passaggio da un tipo di risposta immunitaria innata o specifica ad un'altra.

Sulla base delle citate conoscenze, in questo studio ci siamo occupati di valutare le implicazioni del neuropeptide, oggetto di nostro interesse, NPS, come modulatore della risposta immunitaria.

1.6.3 Il sistema NPS – NPSR come modulatore della risposta immunitaria

Numerosi studi dimostrano che il sistema NPS – NPSR può giocare un ruolo nella modulazione della risposta immunitaria innata e in patologie con una componente di infiammazione cronica, soprattutto delle barriere epiteliali di organo. Infatti il peptide NPS ed il suo mRNA, sono co-localizzati in epiteli bronchiali e del colon suggerendo che NPSR potrebbe essere attivato da meccanismi autocrini e paracrini (Pulkkinen et al. 2004; Vendelin et al. 2005). La migrazione dei leucociti nel tessuto rappresenta la chiave del processo nella patogenesi di malattie a componente infiammatoria. Dati ottenuti in trial clinici hanno mostrato che l'inibizione di leucociti migranti in organi target rappresenta un effettivo approccio terapeutico per patologie in cui l'infiammazione ha effetti dannosi (Rossi et al. 2008). Interessanti studi *in vitro*, su linee cellulari di macrofagi di tipo RAW 264.7, mostrano che NPS è capace di modulare la fagocitosi di macrofagi; infatti, la prestimolazione con NPS ne incrementa la fagocitosi in modo dose dipendente. Inoltre la stimolazione con NPS (1 μ M) di macrofagi murini decrementa l'adesione cellulare e

incrementa la migrazione, suggerendo come NPS sia un agente chemiotattico (Pulkkinen et al. 2006).

Studi relativi al sistema immunitario del maiale, affermano la presenza del recettore NPSR nei tessuti immunitari, inclusi timo, milza, linfonodi del tratto gastrointestinale e nelle tonsille del palato molle, inoltre NPS è in grado di attivare e modulare la proliferazione dei linfociti (Yao et al. 2009). Evidenze sperimentali ottenute da studi genetici umani dimostrano anche una stretta associazione fra i polimorfismi del gene per NPSR con malattie con componente infiammatoria cronica che coinvolgono il sistema respiratorio (Laitien et al. 2004) e gastrointestinale (D'amato et al. 2007). NPS e il suo recettore potrebbero avere un ruolo nella patogenesi dell'asma: si è dimostrato infatti che polimorfismi a singolo nucleotide di NPSR sono associati ad un aumento della prevalenza di asma (Bernier et al. 2006). Tessuti periferici e rivestimenti epiteliali di diversi organi esprimono isoforme di NPSR, indicate come A e B incluse la mucosa intestinale e la pelle, e NPSR appare essere sovraregolato nell'infiammazione (Sundman et al. 2010). Inoltre NPS incrementa la proliferazione di linfociti splenici e potenzia le funzioni dei macrofagi degli alveoli polmonari, tuttavia da solo esso non induce un effetto rilevante nella produzione di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , ma ne incrementa la produzione in modo significativo se viene aggiunto LPS, mostrando un effetto sinergico e dimostrando così che NPS è in grado di modulare la risposta infiammatoria solo in presenza di antigeni esogeni (come LPS) (Yao et al. 2011).

La chemiotassi è un processo fondamentale in cui le cellule migrano in una direzione specifica quando sono esposte a determinati gradienti chimici esterni (Figura 13). E' una capacità esibita da numerose varietà di tipi cellulari e coinvolgono strategie distinte che dipendono dalle cellule e dalle condizioni ambientali. Diversi membri di famiglie di neuropeptidi esercitano azioni chemiotattiche sui monociti umani circolanti nel sangue. Inoltre il sistema immunitario influenza il sistema nervoso centrale. A livello molecolare, ormoni, neurotrasmettitori, neuropeptidi e citochine, ed i loro recettori sono importanti membri della stessa superfamiglia che consente la comunicazione neuro-immune (Wrona et al. 2006).

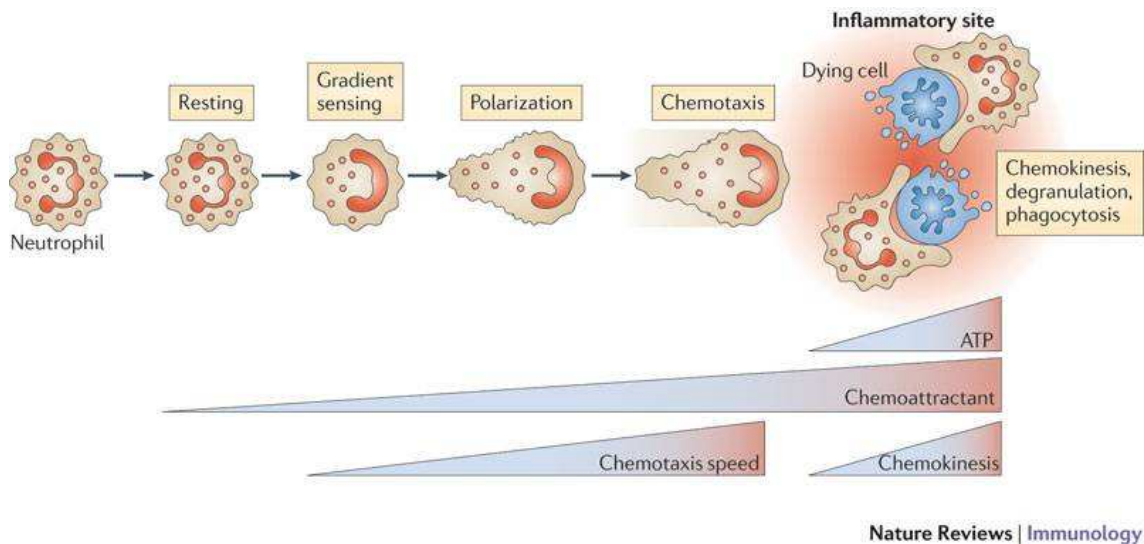


Figura 13
 Illustrazione dei principali passaggi e meccanismi del processo di chemiotassi.

Un altro meccanismo, fra i più importanti, di difesa dell'ospite contro l'invasione di microrganismi esterni è la fagocitosi, seguita dall'uccisione e la digestione intracellulare del microrganismo da parte delle cellule fagocitiche (Figura 14). Queste ultime nell'organismo umano sono rappresentate da due categorie di cellule: i leucociti polimorfonucleati e i fagociti mononucleati. Il processo di fagocitosi può essere separato in diversi passaggi fondamentali: opsonizzazione delle particelle da parte dei fattori del complemento del siero, il riconoscimento da parte delle cellule fagocitiche di questi fattori del complemento ed il successivo contatto con la superficie cellulare, l'internalizzazione del microrganismo, la sua uccisione e digestione grazie all'utilizzo di enzimi litici intracellulari (Van Furth et al. 1979).

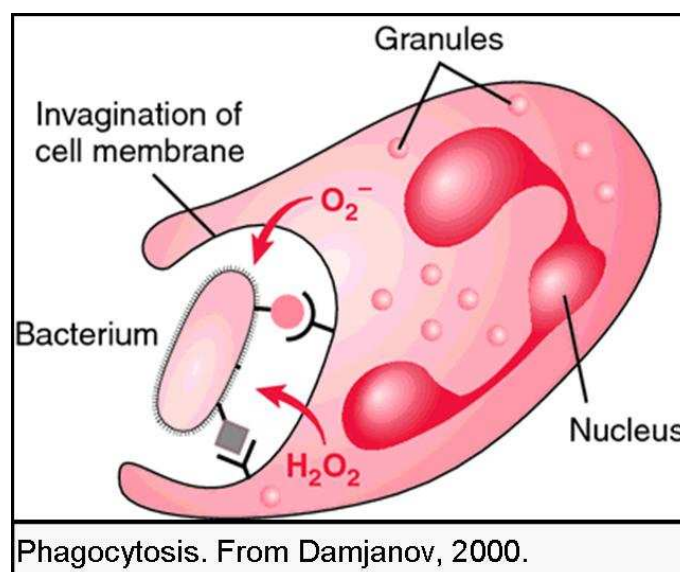


Figura 14
 Illustrazione dei principali passaggi e meccanismi del processo di fagocitosi.

In questo studio abbiamo valutato l'abilità di NPS di influenzare la chemiotassi e la fagocitosi di monociti umani, confrontando l'effetto con un peptide pro-infiammatorio di riferimento utilizzato in letteratura formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) (Le et al. 2002). Inoltre gli antagonisti peptidici, [D-Cys(tBu)⁵]NPS, [tBu-d- Gly⁵]NPS, e non peptidico SHA 68, per NPSR sono stati utilizzati al fine di caratterizzare farmacologicamente l'effetto indotto da NPS.

2 SCOPO

Progressi significativi sono stati fatti nella comprensione del ruolo dei neuropeptidi, questo soprattutto grazie all'identificazione dei sottotipi recettoriali peptidergici. La ricerca dei ligandi dei GPCR orfani ha avuto un grosso impatto nella farmacologia di base e nella terapia. La deorfanziazione dei GPCR ha rivoluzionato la scoperta di nuovi trasmettitori. La chiave per sfruttare al meglio le potenzialità dei GPCR dipende dalla possibilità di sintetizzare agonisti/antagonisti specifici a partire dal ligando endogeno al fine di definirne i ruoli funzionali ed il potenziale terapeutico.

Considerate queste premesse l'obiettivo di questa tesi è stato quello di indagare il ruolo di due sistemi neuropeptidici: N/OFQ – NOP e NPS – NPSR, dei loro analoghi di sintesi di natura peptidica o non peptidica, con attività di agonisti e antagonisti, ottenuti grazie a numerosi studi in condizioni patologiche che coinvolgono funzioni integrate superiori del sistema nervoso centrale (ansia e dolore) e aspetti della risposta immunitaria (chemiotassi e fagocitosi).

Effetti antinocicettivi di somministrazioni intratecali di agonisti del recettore della Nocicettina/Orfanina FQ, mediante l'utilizzo del test del tail flick.

Lo scopo della prima area di ricerca della presente tesi è stato quello di approfondire l'attività di N/OFQ sulla trasmissione analgesica valutando:

- l'effetto analgesico di N/OFQ a livello spinale, somministrando il peptide per via intratecale (*i.t.*) e sottoponendo il ratto al test del tail flick test (battito di coda);
- l'attività di un nuovo peptide, sintetizzato dall'Università degli studi di Ferrara, UFP-112, nel ratto sempre utilizzando il test del tail flick. UFP-112 deriva da modificazioni chimiche della struttura di N/OFQ per incrementarne la potenza o la resistenza alla degradazione di peptidasi endogene.

La parte fondamentale del lavoro è stata quella di mettere a punto una metodica valida di cateterizzazione intratecale e quindi somministrare i farmaci a livello spinale. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in parallelo con il farmaco di riferimento, morfina, di cui si conoscono ampiamente gli effetti analgesici.

Inoltre questi dati preliminari sono utili per selezionare una dose adeguata di UFP-112 al fine ultimo di verificare il possibile sviluppo di tolleranza in futuri studi in cronico.

Antagonismo funzionale tra Nocicettina/Orfanina FQ e il Fattore di Rilascio delle Corticotropine in disturbi legati a stati di ansia, nel ratto: coinvolgimento del sistema serotoninergico

Lo scopo della seconda area di ricerca della presente tesi è stato quello di:

- confermare il ruolo ansiolitico di N/OFQ nella regolazione delle risposte comportamentali allo stress tramite l'utilizzo di due test ansiometrici ("elevated plus maze", EPM, e "conditioned defensive burying", CDB);
- valutare il coinvolgimento dell'asse HPA alle nostre condizioni sperimentali, mediante l'utilizzo di CRF;
- verificare il possibile antagonismo funzionale fra N/OFQ e CRF in condizioni legate all'ansia;
- analizzare le possibili modificazioni del sistema serotonergico, a livello centrale, dovute all'azione dei peptidi in esame come spiegazione del possibile antagonismo funzionale.

Per le valutazioni biochimiche sono state scelte la corteccia frontale ed il ponte in quanto rappresentano le principali aree cerebrali di partenza e di arrivo che coinvolgono i neuroni serotonergici dei sistemi maggiormente implicati nella modulazione della risposta allo stress.

Stimolazione della chemiotassi e della fagocitosi di monociti umani da parte del Neuropeptide S, coinvolgimento del recettore (NPSR).

L'ultima area di ricerca riguarda NPS; lo studio è stato condotto allo scopo di valutare il coinvolgimento del sistema NPS – NPSR come modulatore della risposta immunitaria in situazioni di infiammazione. Sono quindi stati presi in esame due meccanismi di difesa primaria: la chemiotassi e la fagocitosi.

E' stato valutato:

- l'effettivo ruolo di modulatore del sistema NPS – NPSR nei principali meccanismi di risposta immunitaria. E' stato studiato secondo i criteri di farmacologia classica bloccando il segnale trasmesso dal recettore NPSR, tramite l'utilizzo di antagonisti di natura peptidica: [(tBu)D-Gly5] NPS, [D-Cys(tBu)5] NPS e non peptidica: SHA 68 (3-ossi - 1,1 - difenil - tetraidro-ossazolo [3,4 - a] pirazina-7-carbossi-4-fluorobenzilamide);
- come possibile target terapeutico di nuove molecole di sintesi, con attività di antagonisti, il ruolo di NPSR, al fine di curare patologie con una componente infiammatoria cronica.

Componente importante dello studio, è stato ottimizzare le metodiche dei saggi di chemiotassi e fagocitosi, e definire le giuste concentrazioni delle sostanze utilizzate, al fine di riprodurre condizioni sperimentali simili a situazioni *in vivo*. E' stata utilizzata come sostanza di riferimento fMLP (formyl-Met-Leu-Phe), un peptide di 3 amminoacidi, di sintesi, che deriva dal lipopolisaccaride batterico (LPS), sostanza pro-infiammatoria ampiamente conosciuto in letteratura (Le et al. 2002).

3 MATERIALI E METODI

3.1. *Animali*

Nelle aree di ricerca *in vivo* della presente tesi di dottorato, sono stati utilizzati ratti maschi di razza Wistar, forniti dalla ditta Harlan Italy (Corezzana, MI), stabulati in gabbie singole di Plexiglas in condizioni controllate (libero accesso a cibo ed acqua, cicli di 12-h di buio/luce, temperatura 22°C, umidità al 60%) del peso per ognuno di circa 180-200 g all'inizio degli esperimenti. Le direttive etiche per condurre un'indagine sperimentale su animali coscienti sono state adeguatamente eseguite e tutte le procedure sono state condotte in accordo ai regolamenti etici CEE per la ricerca sugli animali (Consiglio CEE 86/609; D.Lgs. 27/01/1992, No. 116).

3.1.1 Effetti antinocicettivi di somministrazioni intratecali di agonisti del recettore della Nocicettina/Orfanina FQ, mediante l'utilizzo del test del tail flick.

3.1.1.1 Chirurgia degli animali impianto del catetere a livello intratecale

È stata usata come metodica la cateterizzazione dello spazio sub-aracnoideo lombare per la somministrazione di farmaci a livello spinale, apportando alcune modifiche alla tecnica di Størkson et al. (1996). Gli animali sono stati anestetizzati con ketamina e xilazina (115+2 mg/kg) per via intraperitoneale (i.p.), rasati sulla parte dorsale lombare e quindi opportunamente posizionati su un tavolo operatorio. Con un bisturi è stata effettuata un'incisione longitudinale a livello pelvico. Successivamente sono state sollevate le spine iliache ventrali dell'animale, causandone l'inarcamento (cifosi) della parte lombare della colonna vertebrale. L'ago guida è stato posizionato a circa 2-4 mm di distanza laterale rispetto alla colonna vertebrale dell'animale ed inserito perpendicolarmente nello spazio tra la L5 e L6 della colonna vertebrale (Figura 15).

La corretta localizzazione intratecale è stata confermata da un colpo di coda o dalla retrazione della zampa posteriore, riflesso involontario del ratto. Attraverso l'ago guida è stato poi inserito il catetere. Quest'ultimo è costituito da un tubicino di polietilene (PE-10, Beckton Dickinson, diametro esterno 0.6 mm, interno 0.28 mm) lungo circa 14 cm, di cui 4 cm sono stati inseriti nello spazio sub-aracnoideo. Dopo l'operazione si lasciano trascorrere quattro giorni, per permettere un corretto recupero all'animale dall'intervento; poi sono stati effettuati i trattamenti sperimentali.

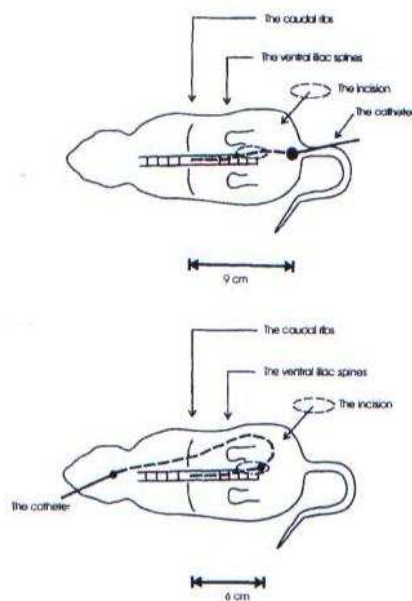


Figura 15
Rappresentazione schematica per l'impianto di cannule *i.t.*

3.1.1.2 Metodiche di studio per il dolore: la scelta del corretto test nocicettivo

È impossibile sapere se le sensazioni provate da un animale in seguito ad uno stimolo nocicettivo siano paragonabili quantitativamente al dolore sentito dall'uomo in circostanze simili. Non è privo di validità però supporre che l'animale che prova a sfuggire o si ribella squittendo a uno stimolo doloroso, stia vivendo esperienze soggettive che sottostanno a meccanismi del tutto simili a quelli che spingono l'uomo a sottrarsi a un dolore. È lecito allora supporre che una sostanza antinocicettiva nell'animale possa essere un analgesico anche nell'uomo. La sperimentazione clinica è però più complessa a causa della presenza di fattori comunemente definiti "psicologici" e che nell'uomo giocano un ruolo molto importante, reso evidente dalla facilità con cui si ha un aumento della soglia del dolore somministrando solo il placebo.

L'indagine pre-clinica non è di aiuto in questo ultimo caso poiché non è possibile valutare, con gli esperimenti sugli animali, quanto l'effetto placebo contribuisca all'esito complessivo dell'analgesico. Quando si saggia sull'animale una sostanza con probabile azione analgesica è molto importante che sia usato uno stimolo doloroso adatto, capace di fornire risposte ben definite e quantitativamente valutabili.

3.1.1.3 Metodi di studio dell'attività antinocicettiva: *i test*

I metodi esistenti per lo studio dei meccanismi nocicettivi, possono essere suddivisi in quattro tipi principali: meccanici, termici, elettrici e chimici. Il test che verrà usato nel seguente progetto di tesi, fa parte di quelli di tipo termico: il test del colpo di coda (test del tail-flick).

- Metodi meccanici: consistono nel pinzettare l'orecchio di una cavia o di un ratto, la coda di un topo, la zampa di un ratto; ciò provoca una risposta allo stimolo dolorifico che consiste nell'allontanamento dell'animale, nello spostamento della coda o nella retrazione della zampa. Si tratta, quindi, di un test qualitativo che esamina risposte difensive altamente dipendenti dal tipo di stimolo nocivo.
- Metodi elettrici: la stimolazione del nervo trigemino o della polpa dentaria attraverso scariche elettriche, sono oggi considerate criticabili e cadute in disuso.
- Metodi chimici: consistono nell'iniettare sostanze chimiche irritanti nel peritoneo oppure nelle zampe posteriori dell'animale. Nel caso del peritoneo, il roditore, in risposta al dolore addominale, si contorce e il risultato del test viene valutato in base al numero di stiramenti che vengono eseguiti in 10 minuti dall'animale. Invece nel caso della zampa, essa si gonfia e la valutazione viene fatta in base al numero di retrazioni della zampetta infiammata.
- Metodi termici: i piccoli animali da laboratorio sono molto sensibili agli stimoli termici ed è per questo che test come la piastra calda, il test del colpo di coda e il test dell'immersione della coda sono molto usati.
 - ✓ Test dell'immersione della coda (tail-immersion): prevede l'immersione della coda di roditori in un bagno d'acqua termostata a 58°C. Il parametro di valutazione è rappresentato dal tempo in secondi che intercorre dall'immersione al momento in cui l'animale, avvertendo calore, toglie la coda dall'acqua.
 - ✓ Test della piastra calda: gli animali sono posti su una superficie metallica riscaldata artificialmente e mantenuta a temperatura costante di $54 \pm 0.4^\circ\text{C}$ (Socrel DS Ugo Basile, Comerio, VA, Italia). Si registra il tempo (in secondi) di latenza al leccamento delle zampe o al salto.
 - ✓ Test del colpo di coda (tail-flick) (Vedi paragrafi successivi).

3.1.1.4 Test del tail flick (o test del colpo di coda)

Il procedimento è di D'Amour e Smith (1941) modificato da Dewey nel 1970 e Tian et al. nel 1997. L'apparecchiatura consiste di una fonte di calore radiante (raggio infrarosso), una fotocellula, un timer e un regolatore di potenza calorica. La coda viene collocata in corrispondenza del raggio luminoso in modo da impedire che la luce arrivi alla fotocellula. Il raggio di luce ed il timer vengono attivati con un semplice pulsante. Il raggio termico colpisce la coda dell'animale in un punto subterminale; quando il ratto avverte dolore allontana la coda con scatto (da cui il nome di tail-flick). Il raggio non più impedito dalla coda, può colpire la fotocellula sottostante provocando il blocco del cronometro e dell'emissione del raggio stesso (Figura 16).

Il tempo massimo di esposizione della coda del ratto al raggio termico è di 20 secondi, oltre il quale si rischia il danno dei tessuti dell'animale.



Figura 16
Apparecchiatura per il tail flick test e posizionamento dell'animale sul raggio termico.

Sono stati determinanti la latenza di base (BL) prima e dopo l'operazione chirurgica e prima di qualsiasi trattamento. Il tempo di latenza (TL) dopo il trattamento ogni 15, 30, 60, e 120 minuti. La percentuale del massimo effetto possibile (% MPE) è stata calcolata secondo la formula:

$$\% \text{ MPE} = [(TL-BL)/(20-BL)] \times 100$$

dove TL è il tempo di latenza dopo il trattamento, BL è il tempo di latenza di base, e 20 è il tempo in secondi massimo di interruzione del test. Immediatamente dopo l'ultima misurazione della soglia del dolore (T=120) gli animali vengono sottoposti ad iniezione i.t. con lidocaina allo 0,2% seguita dalla soluzione fisiologica, che provoca la paralisi immediata della parte posteriore dell'animale; ciò viene effettuato per verificare la corretta posizione del catetere spinale. Tutti gli animali che non hanno mostrato risposta alla lidocaina sono stati esclusi dall'analisi dei dati.

3.1.1.5 Schema di trattamento

Prima della somministrazione dei diversi farmaci, ogni animale è stato sottoposto al del test del colpo di coda per la registrazione delle latenze di base (latenza pre-farmaco e post-operazione) (tempo: T=0). Gli animali sono stati suddivisi in tre grossi gruppi di trattamento:

- 1) il primo gruppo è stato suddiviso in sottogruppi di sette animali, a cui sono state somministrate per via intratecale (i.t) dosi crescenti di N/OFQ (1, 10 o 100 nmoli/ratto) tramite una prima iniezione di un volume di 10 µl seguiti da altri 10 µl di soluzione fisiologica sterile, per facilitare la fuoriuscita dal catetere del trattamento.
- 2) il secondo gruppo è stato suddiviso in sottogruppi di sette animali. Ogni sottogruppo è stato trattato con 10 µl di dosi crescenti di morfina (0.1, 1, 3 o 10 nmoli/ratto) sempre seguiti da 10 µl di soluzione fisiologica sterile.
- 3) all'ultimo gruppo, anch'esso suddiviso in sottogruppi di trattamento, sono stati iniettati 10 µl di dosi crescenti di UFP-112, (1, 3, 5 o 10 nmoli/ratto).

Gli animali controllo sono stati trattati con doppia somministrazione di soluzione fisiologica sterile.

Quindici minuti dopo l'ultimo trattamento, gli animali sono stati sottoposti al test del tail flick per valutare la modificazione della soglia algogena; in specifico il test è stato ripetuto all'intervallo di 15, 30, 60, 90 e 120 minuti dalla somministrazione.

Negli animali trattati con soluzione fisiologica, non si sono evidenziate differenze, per cui i dati sono stati raggruppati e definiti come controlli. Alla fine dell'esperimento, alcuni ratti sono stati trattati con lidocaina per via intratecale, al fine di verificare il corretto posizionamento del catetere.

3.1.1.6 Analisi statistica

L'effetto analgesico è stato valutato ed espresso sia come percentuale del massimo effetto possibile (% MPE) sia come media dell'area sotto la curva (AUC) per gli intervalli di tempo in cui è stato eseguito il test, ovvero da 15 a 120 minuti. Tutti i dati sono espressi come media ± E.S.M. L'analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal *post hoc* test di Bonferroni è stata utilizzata per la valutazione degli effetti analgesici spinali di nocicettina, UFP-112 e morfina alle diverse dosi utilizzate. Il livello di significatività è stato posto a $P < 0.05$.

3.1.2 Antagonismo funzionale tra Nocicettina/Orfanina FQ e il Fattore di Rilascio delle Corticotropine in condizioni legate a stati di ansia, nel ratto: coinvolgimento del sistema serotoninergico.

3.1.2.1 Impianto delle cannule

Sono state impiantate cannule d'acciaio (Plastic One; Roanoke, VA, USA) nel ventricolo cerebrale destro per la somministrazione di farmaci a livello centrale. Gli animali sono stati anestetizzati con ketamina più xylazina (115+2 mg/kg) per via intraperitoneale (i.p.),

farmaci forniti dalle ditte farmaceutiche Gellini, (Aprilia Italia) e Bayer, (Milano Italia), rispettivamente. I ratti sono quindi stati posti su un apparecchio stereotassico che ha permesso di inserire le cannule secondo le coordinate: $Ap=-0.8$, $L=1.4$; $V=3.25$ seguendo le indicazioni dell'atlante stereotassico (Paxinos e Watson 1997). Le cannule sono state mantenute in loco con cemento acrilico dentistico e con delle viti poste nell'osso cranico. Le cannule sono state tenute pervie da un filo d'acciaio, posto nel lume delle stesse, che è stato rimosso al momento del trattamento. Dopo l'operazione gli animali, in gabbia singola, sono stati trasportati in una stanza insonorizzata e a temperatura controllata per la durata di 5-7 giorni. Le iniezioni per via intracerebroventricolare (i.c.v.) sono state fatte in un volume di liquido pari a 5 μ l. Al termine degli esperimenti alcuni ratti sono stati anestetizzati e decapitati e la corretta posizione delle cannule è stata verificata con un'iniezione di blu di metilene.

3.1.2.2 Schema di trattamento

Dopo una settimana di recupero dall'impianto delle cannule, gli animali sono stati suddivisi in 6 gruppi (di 7 animali ciascuno) e sono stati trattati seguendo il presente schema di trattamento:

- 1) gli animali controllo vengono pre-trattati con soluzione fisiologica sterile, ripetuta dopo 10 minuti.
- 2) due gruppi di ratti sono stati pre-trattati con N/OFQ (0,5 nmole/ratto i.c.v.) 10 minuti prima del trattamento successivo con soluzione fisiologica sterile o CRF (1 μ g/ratto);
- 3) altri due gruppi di ratti sono stati pre-trattati con una concentrazione di N/OFQ di 1 nmole/ratto (i.c.v.) 10 minuti prima del trattamento successivo con soluzione fisiologica sterile o CRF (1 μ g/ratto).
- 4) l'ultimo gruppo di animali è stato pre-trattato con soluzione fisiologica sterile e dopo 10 minuti con CRF (1 μ g/ratto).

Tutti gli animali trattati con N/OFQ hanno subito un pre-trattamento con la stessa dose della sostanza due ore prima dei trattamenti veri e propri.

Dieci minuti dopo l'ultima somministrazione, gli animali sono stati sottoposti ai test comportamentali: EPM e CDB. Immediatamente dopo il termine del test dell'EPM (considerato meno stressante di quello del CDB) i ratti sono stati decapitati, e sono stati prelevati i cervelli; in particolare i campioni di corteccia frontale e del ponte sono stati mantenuti congelati a -80°C per la valutazione dei livelli di 5-HT, del suo metabolita 5-HIAA e il loro rapporto (5-HIAA/5-HT), utilizzando la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Inoltre è stata valutata la densità recettoriale del sottotipo 5-HT_{1A}

mediante tecnica binding utilizzando un ligando radiomarcato specifico ^3H -8-OH-DPAT, e 5-HT come spiazzante.

3.1.2.3 Test ansiometrici

Nell'uomo il termine ansia descrive uno stato emotivo spiacevole legato all'attesa di eventi inevitabili o al presentarsi di situazioni nuove e inaspettate. Qualcosa di molto simile all'ansia si genera anche in un animale posto in condizione a lui avverse. In esso, come nell'uomo, l'ansia si riflette in un comportamento caratteristico e complesso. Farmaci noti per la loro azione ansiolitica sull'uomo, quali le benzodiazepine, se somministrati ad un animale posto in situazioni ambientali ansiogene, ne ripristinano una risposta comportamentale normalizzata eliminando il condizionamento dei suddetti fattori. Da qui la possibilità di predire l'attività ansiolitica di un farmaco studiando come la stessa sostanza modifichi il comportamento dell'animale di fronte a determinati test, detti ansiometrici. Nella presente tesi sono stati utilizzati i seguenti test comportamentali: l'elevated plus maze (EPM) ed il conditioned defensive burying (CDB).

3.1.2.4 Test dell'elevated plus maze – EPM

Il test è stato proposto per l'identificazione selettiva di farmaci ad azione ansiolitica e ansiogenica. L'apparato consiste in due braccia aperte e due chiuse ognuna di 55×10 cm, con un pavimento scuro, unite da una piattaforma centrale comune, chiamata arena (10×10 cm) (Figura 17).

Le braccia aperte non hanno pareti laterali e non hanno nulla ai terminali; quelle chiuse hanno delle pareti di plexiglas di 40 cm. Il labirinto è elevato rispetto alla terra di 80 cm. Dal quinto giorno dopo l'intervento, ogni animale, dopo il trattamento, è sottoposto al test.

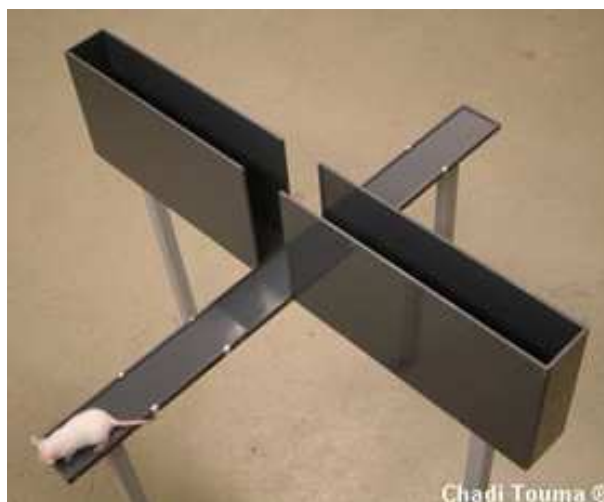


Figura 17
Apparato per il test dell'elevated plus maze – EPM.

Il ratto viene posizionato nell'arena, con il muso rivolto al braccio aperto e il suo comportamento viene osservato per 5 minuti dallo sperimentatore. Al termine del tempo, l'animale viene rimosso e il labirinto viene pulito per il successivo ratto. Vengono registrati diversi parametri relativi all'ansia, come il tempo impiegato dall'animale a muoversi in ogni porzione del labirinto (indice per la valutazione dell'attività locomotoria). Altri comportamenti considerati sono: il numero di entrate e il tempo speso nelle braccia chiuse, in quelle aperte e nell'arena.

3.1.2.5 Conditioned defensive burying – CDB

Questo test si avvale delle ben note reazioni difensive mostrate dal ratto in laboratorio, come il “*freezing*” (immobilità), la fuga e l'attacco. In particolare, nel CDB gli animali esaminati sviluppano un comportamento specifico: in presenza di materiale da lettiera e sottoposti ad un breve shock elettrico i ratti mostrano la tendenza a seppellire la fonte che può fornire la scossa. Questa reazione è stata proposta come nuovo paradigma per lo studio di agenti ansiolitici.

In questo test è utilizzata una gabbia rettangolare in plexiglas (27×38×38 cm) con segatura sul pavimento alta di 5 cm. La sonda, elettrificata in modo continuo, consiste in un pezzo di legno ricoperto da un filo metallico ed è posizionata in modo da protrudere per 10.3 cm ed essere sollevata dalla base di 7.5 cm. Il contatto con la suddetta provoca una scossa da 1 mA (Figura 18). Gli animali vengono abituati a stare nella gabbia contenente la sonda, in assenza di corrente elettrica, per 15 minuti per 4 giorni consecutivi.

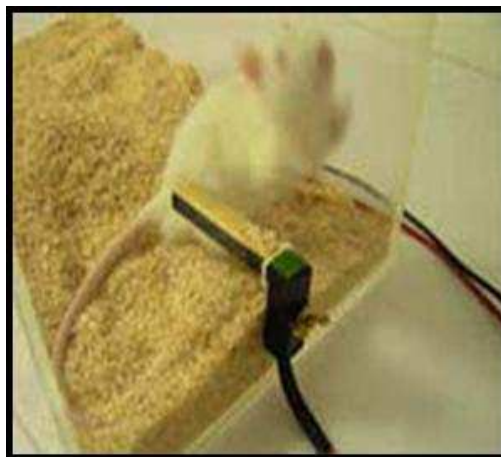


Figura 18
Apparato per il conditioned defensive burying – CDB.

Al 5° giorno i ratti sono valutati individualmente per 30 minuti; l'altezza della segatura viene misurata all'inizio e alla fine del test. I parametri comportamentali osservati sono: latenza alla prima scossa, latenza al primo episodio di *burying* (ricoprimento della sonda con la segatura), numero totale di scosse ricevute, altezza della segatura e durata di

ricoprimento (Pinel e Treit 1978). In particolare, la latenza intesa come tempo che intercorre tra la prima scossa e il primo episodio di burying riflettono inversamente la reattività dell'animale, mentre il tempo cumulativo speso nel burying suggerisce, in maniera specifica, il livello dello stato di ansia.

3.1.2.6 Determinazione dei livelli di serotonina e acido indolacetico

Per il dosaggio della 5-HT e del suo metabolita 5-HIAA, si è fatto riferimento, con le opportune modifiche apportate nel nostro laboratorio, al metodo cromatografico messo a punto da Grossi et al. (1990) che prevede l'utilizzo di strumentazione HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione) con detector elettrochimico.

L'apparecchiatura è costituita da: HPLC Beckman Gold connesso con detector elettrochimico Coulochem II ESA (ESA Inc., Bedford, MA, USA) corredato di cella analitica (modello 5011), interfaccia analogico: modulo 406 e pompa: modulo 118; colonna Hypersil 3 ODS (Octa-Decil-Silano) 10 cm x 4,6 mm e precolonna C18. Quest'ultima possiede lo stesso impaccamento della colonna di lavoro e adsorbe irreversibilmente le impurezze del solvente evitando il deterioramento della colonna successiva. Per il condizionamento della colonna e della cella si è proceduto conservando la colonna in Metanolo/H₂O 70/30. Tale miscela è stata utilizzata per equilibrare la colonna per 45 minuti, per altri 45 minuti con H₂O e infine con la fase mobile di lavoro, lasciando in ricircolo tutta la notte antecedente l'analisi.

La lettura dei campioni biologici, prevede l'utilizzo di una fase mobile composta di: Metanolo/Acetonitrile/ NaH₂PO₄ 50 mM (sciogliere 3,45 g di fosfato diidrogeno di sodio in 500ml di H₂O e portare a pH 2,8 con H₃PO₄ 50%) 15/8/77 + 0,02% di SOS + 0,2 mM EDTA con aggiunta di 100 µl di trietilammina per migliorare l'efficienza dell'analisi. La fase mobile viene in ultimo filtrata sotto vuoto con filtri 0,22 µm forniti dalla ditta Millipore e degassata con elio per evitare la formazione di bolle all'interno dello strumento. Le caratteristiche della lettura dei diversi campioni sono: eluizione: isocratica (utilizzo di un unico solvente); flusso: 0,8 ml/min costante; detector: cella analitica E1 – 100 mV, E2 +250 mV; R 1µA, filter 5 sec, offset 0%, output 1V. Acquisizione: canale B, display factor 10, data hertz 2, range 1V, offset 0%. Pressione: circa 1,60 Kpsi, temperatura ambiente. Il volume d'iniezione è di 20 µl di campione, manuale tramite siringa per HPLC da 100 µl. Il tempo di ritenzione di 5-HT è di circa 7 minuti mentre quello di 5-HIAA è di circa 2,5 minuti; quindi il tempo di una corsa totale dura circa 10 minuti. Tra una iniezione e quella successiva trascorrono circa 20 minuti. Le iniezioni dei campioni sono state fatte alternando un giorno di analisi ad un giorno per la pulizia dello strumento, al fine di migliorarne l'efficienza.

3.1.2.7 Valutazione delle caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A}

Le caratteristiche dei siti di legame 5-HT_{1A} sono state valutate in conformità con quanto già precisato da Dugovic et al. (1989), apportando le opportune modifiche. Sia per la corteccia frontale che per il ponte è stato eseguito lo stesso protocollo di preparazione del campione biologico: le aree cerebrali sono omogenate aggiungendo 5 ml di saccarosio ghiacciato a 25 M con l'ausilio di un pestello Teflon (120 r.p.m.) e successivamente sottoposti a centrifugazione a 1300 g per 10 minuti a 4 °C. Questa procedura è stata di conseguenza ripetuta per tutte le combinazioni di surnatante e saccarosio diluite con 10 ml di 50 nM TRIS-HCl a pH 7.7. Le sospensioni così ottenute sono centrifugate a 3500 g per 10 minuti. Quindi, i pellet sono risospesi in 20 ml di tampone TRIS-HCl e centrifugato a 50000 g per 10 minuti. Infine i pellet sono stati omogenati e diluiti in TRIS-HCl. Le aliquote di membrana sono state trasferite in provette di plastica contenenti ³H-8-OH-DPAT (6 concentrazioni crescenti sciolte in 10% di etanolo), 5-HT (per la misura del binding non-specifico) o tampone TRIS a 37 °C per 15 minuti. La sospensione è stata filtrata a pressione ridotta attraverso filtri Whatman preventivamente bagnati per 5 minuti in soluzione di polietilenimmina 0.5% usando una pompa sottovuoto e sottoponendola a due lavaggi con 5 ml di tampone TRIS ghiacciato. I filtri sono stati trasferiti nei vials contenenti 6 ml di Packard Optifluor, e conservati al buio per 20 ore ad una temperatura di 4 °C prima della conta finale, effettuata con un contatore di particelle beta.

³H-8-OH-DPAT, il ligando selettivo per il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}, è stato utilizzato nell'intervallo di concentrazioni da 0.18 nM a 6 nM.

3.1.2.8 Analisi statistica

Tutti i valori sono espressi come medie \pm E.S.M. L'analisi della varianza (ANOVA) a due vie, seguita dal *post hoc* test di Bonferroni, è stata utilizzata per la valutazione degli effetti di N/OAQ, CRF e la loro interazione nei test comportamentali e nella determinazione dei livelli di 5-HT e 5-HIAA. Per la valutazione delle caratteristiche recettoriali del sottotipo 5-HT_{1A}, il numero massimo di recettori (B_{max}) e la costante di dissociazione (K_D) sono stati calcolati secondo il metodo Scatchard (1949) usando una curva di saturazione ottenuta utilizzando 6 concentrazioni di ligando marcato. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato; le B_{max} e le K_D risultanti, elaborate ed espresse come media \pm E.S.M, sono state confrontate fra di loro con il *post hoc* test di Bonferroni, preceduto da ANOVA a due vie. Il livello di significatività è stato posto a $P < 0.05$.

3.1.3 Stimolazione della chemiotassi e della fagocitosi di monociti umani da parte del Neuropeptide S, coinvolgimento del recettore (NPSR).

3.1.3.1 Preparazione dei monociti umani

Per i saggi di chemiotassi e fagocitosi sono stati isolati i monociti umani dal sangue intero periferico di volontari sani mediante la separazione su gradiente ottenuto per centrifugazione utilizzando Lympholyte-H (Cederlane Burlington, NC, USA). Dopo la centrifugazione avvenuta a $800 \times g$ per 20 minuti, i monociti vengono rimossi delicatamente, mediante pipetta Pasteur sterile, dall'interfaccia che si forma tra il plasma (di evidente colore paglierino) e il gradiente Lympholyte-H e riposti in una nuova provetta. Le cellule così isolate vengono lavate un paio di volte con PBS, infine vengono contate con la camera di Neubauer e risospese in terreno fresco RPMI 1640 (EuroClone Milano, Italy) supplementato con 0.1% BSA (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Germany), fino ad una concentrazione finale di 1.5×10^6 monociti/ml.

3.1.3.2 Saggio di migrazione, utilizzo della Camera di Boyden

L'attività migratoria dei monociti umani è stata valutata utilizzando la camera di Boyden con 48 pozzetti (Neuroprobe, Gaithersburg, MD, USA), i cui compartimenti superiore ed inferiore sono separati da un filtro in polivinilpirrolidone senza policarbonato (Neuro Probe, Gaithersburg, MD 20877 USA), con pori di $5 \mu\text{m}$ di diametro attraverso i quali i monociti dovrebbero migrare e quindi passare dal compartimento superiore del pozzetto a quello inferiore, se attratti da sostanze dotate di possibile attività chemiotattica.

Una sospensione di 7.5×10^4 monociti in $50 \mu\text{l}$ viene riposta nel compartimento superiore di ogni pozzetto della camera di Boyden, mentre nel compartimento inferiore dei pozzetti vengono depositate le diverse sostanze di cui si vuole valutare la capacità chemiotattica.

La migrazione dei monociti viene valutata dopo incubazione di 90 minuti a 37°C in presenza di 5% di CO_2 con i diversi chemioattrattanti.

3.1.3.3 Schema di trattamento

Inizialmente ci siamo occupati di definire una curva del tipo concentrazione – effetto utilizzando diverse concentrazioni di NPS, in un intervallo fra 10^{-12} e 10^{-5} M. Come sostanza di riferimento viene utilizzato un peptide noto di 3 amminoacidi, formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) (Sigma, San Louis, MO, USA), il cui potere chemiotattico viene ampiamente descritto in letteratura ed utilizzato come controllo positivo, alla concentrazione di 10^{-8} M (Le et al. 2002).

Per valutare un possibile ruolo di NPSR nella risposta chemiotattica, gli antagonisti peptidici [D-Cys(tBu)⁵]NPS e [tBu-D-Gly⁵]NPS, e non peptidici SHA 68, sono stati aggiunti alla sospensione di monociti 30 minuti prima di NPS e sono rimasti a contatto con le cellule per l'intero periodo di incubazione.

3.1.3.4 Colorazione del filtro e analisi al microscopio ottico

Dopo l'incubazione la superficie superiore del filtro è stata pulita per rimuovere possibili residui di cellule non migrate. Il filtro è stato successivamente fissato e colorato con Diff-Quik (Baxter, IL, USA). Il numero di monociti che effettivamente hanno migrato, richiamati dalla sostanza chemiotattica (passando dal compartimento superiore a quello inferiore del pozzetto rimanendo così adesi ai pori del filtro) sono stati contati in 5 campi visivi differenti, al microscopio ottico con un ingrandimento 400X.

3.1.3.5 Saggio di fagocitosi

I monociti umani freschi sono stati risospesi in mezzo di coltura RPMI 1640 (EuroClone Milano, Italy) alla concentrazione di 2×10^6 cellule/ml, sono stati incubati a 37°C in leggera agitazione per un ora, con NPS 10^{-5} M in Eppendorf sterile. Dopo questa incubazione sono stati aggiunti gli Escherichia Coli (100 batteri per monocita), precedentemente inattivati al calore, colorati con Bleu di Toluidina e opsonizzati con siero AB. L'incubazione procede per 30 minuti a 37°C in leggera agitazione. Tutti i trattamenti con gli antagonisti per NPSR [D-Cys(tBu)⁵]NPS 10^{-3} M, [tBu-D-Gly⁵]NPS 10^{-3} M o SHA 68 10^{-5} M precedono il trattamento con NPS 10^{-5} M di 30 minuti.

Per l'opsonizzazione i batteri E. Coli, sono stati incubati per 30 minuti a 37° C in leggera agitazione (in rapporto 1:400) con siero AB ottenuto da sangue intero di volontario sano. Il sangue è stato fatto coagulare per 1 ora circa a temperatura ambiente, centrifugato a 1100 g per 20 minuti ed il surnatante è stato raccolto.

I monociti sono poi stati depositati sul vetrino mediante Cytospin, colorati mediante colorazione May Grünwald (500 µl per 5 minuti), risciacquati in acqua e, una volta asciugati, colorati mediante colorazione Giemsa (1 ml per 30 minuti); eliminato il colorante in eccesso con acqua, i vetrini sono stati fissati in Xilolo e osservati al microscopio ottico con ingrandimento ad immersione ad olio 100X.

3.1.3.6 Analisi statistica

I dati per i saggi di chemiotassi, sono espressi come media del numero di cellule migrate per campo \pm E.S.M, di otto esperimenti per determinare la curva del tipo dose – effetto per l'agonista NPS e di 5 esperimenti per gli antagonisti.

I dati per i saggi di fagocitosi, sono espressi come percentuali di cellule fagocitanti (che hanno cioè inglobato almeno un batterio di E. Coli colorato) di 5 esperimenti (medie \pm E.S.M).

Per entrambi i test, l'analisi della varianza (ANOVA) a una via, seguita dal *post hoc* test di Bonferroni, è stata utilizzata per la valutazione degli effetti del solo NPS. ANOVA a due vie seguita dal *post hoc* test Bonferroni è stato usato per valutare gli effetti degli antagonisti peptidici e non peptidici. Il livello di significatività è stato posto a $P < 0.05$.

4 RISULTATI

4.1 Effetti antinocicettivi di somministrazioni intratecali di agonisti del recettore della Nocicettina/Orfanina FQ, mediante l'utilizzo del test del tail flick.

4.1.1 Curva dose effetto della nocicettina

N/OFQ, sia alla dose di 100 nmoli/ratto che alla dose intermedia di 10 nmoli/ratto, mostra un aumento significativo dei valori di % MPE nel tail flick test; alla dose più alta si osserva un effetto analgesico già dopo 15 minuti dalla somministrazione che diminuisce dopo i 30 minuti, mantenendo la significatività rispetto ai controlli fino alla fine dell'esperimento (120 minuti). Alla dose intermedia, N/OFQ mostra, invece, un valore di % MPE significativamente più elevato solo dopo 30 minuti dalla somministrazione mentre, alla dose di 1 nmole/ratto, essa non modifica i valori di % MPE rispetto ai controlli ($P > 0.05$).

Un'ulteriore analisi fatta con il *post hoc* test di Bonferroni ha confermato che solo la dose maggiore di N/OFQ ha avuto un effetto analgesico significativo per l'intera durata del test ($P < 0.05$) (Figura 19). In conclusione, N/OFQ mostra un effetto analgesico dose-dipendente innalzando la soglia algogena in modo significativo alla dose più alta da noi utilizzata, risultato valutato anche mediante l'area sotto la curva (AUC) che permette di confrontare le azioni analgesiche nel tempo (AUC di N/OFQ 100 nmoli/ratto = 3688.6 ± 529.4 - % MPE x min - vs AUC dei controlli = 418.8 ± 62.3 , $P < 0.01$).

4.1.2 Curva dose effetto della morfina

I nostri risultati indicano che la morfina, come composto di riferimento, sia alla dose di 3 nmoli/ratto che di 10 nmoli/ratto, mostra un aumento significativo dei valori di % MPE nel test del tail flick già dopo 15 minuti dal trattamento; entrambe le dosi presentano un effetto massimo dopo 30 minuti, che decresce successivamente, mantenendosi significativo rispetto ai controlli fino alla fine dell'esperimento (120 minuti) ($P < 0.05$) (AUC della morfina, 3 nmoli/ratto = 2627.6 ± 416.9 e AUC della morfina, 10 nmoli/ratto = 5827.2 ± 861.4 vs AUC controlli, $P < 0.01$). Alle dosi di 0.1 nmoli/ratto e 1 nmoli/ratto, la morfina non modifica i valori di % MPE rispetto ai controlli ($P > 0.05$) (Figura 20).

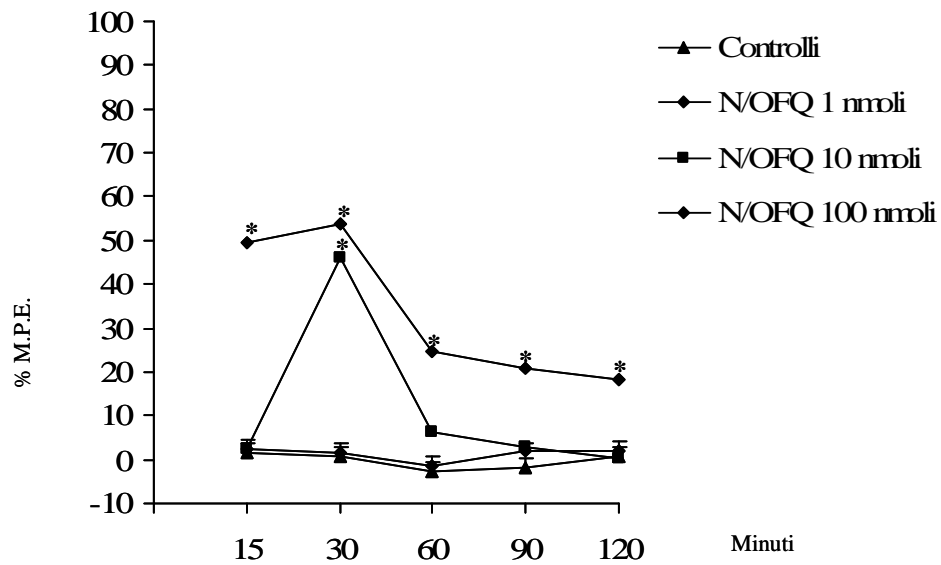
4.1.3 Effetto analgesico dell'agonista peptidico UFP-112

Per UFP-112, sono stati condotti dapprima esperimenti preliminari con quattro differenti dosi del composto, scelte per valutare il tipo e l'intensità di effetti indotti, anche sulla base di risultati sperimentali ottenuti sul topo (Rizzi et al. 2007). I risultati definitivi, con somministrazioni i.t. su ratti, hanno mostrato come la dose di 5 nmoli (AUC di UFP-112, 5nmoli/ratto = $5227,3 \pm 846$ vs AUC dei controlli, $P < 0,01$) sia risultata molto efficace già a partire da 15 minuti dopo il trattamento, dopo 30 minuti e si mantiene a livelli

submassimali, per tutta la durata dell'esperimento (120 minuti). Questo effetto è comparabile a quello osservato nella Figura (20) , per la dose di morfina (10 nmoli/ratto) utilizzata come analgesico di riferimento. La dose di 3 nmoli di UFP-112 raggiunge l'effetto massimale a 30 minuti e successivamente si riduce progressivamente perdendo la significatività nei confronti dei controlli. Infine la dose minore utilizzata non risulta essere significativa rispetto ai controlli. (Figura 21). In relazione ai risultati di efficacia ottenuti da questo primo esperimento, la dose massima analizzata, di 10 nmoli/ratto, non risulta utilizzabile per un futuro trattamento nonostante abbia effetto analgesico massimale fin da 15 minuti dopo la somministrazione perchè comporta effetti collaterali di breve durata e intensità che compromettono però la validità del test.

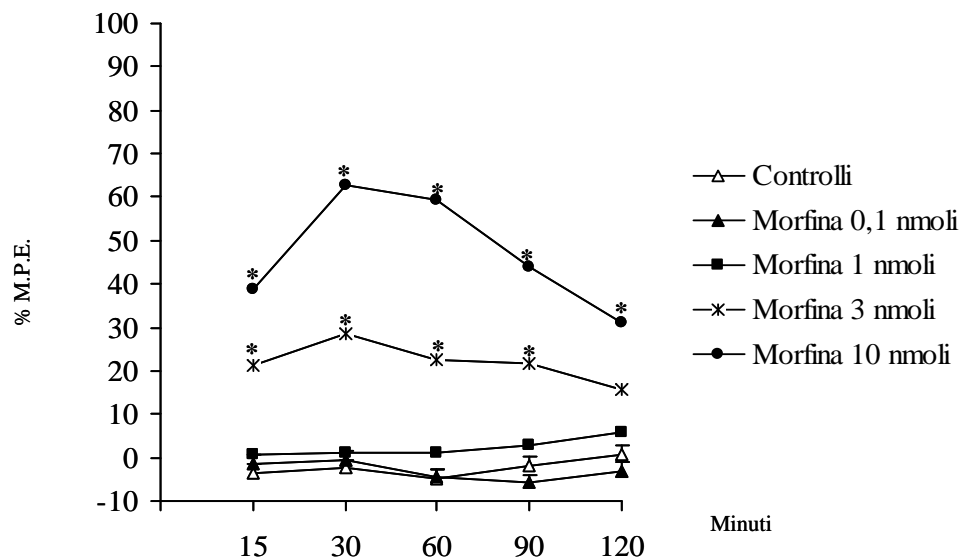
In conclusione, UFP-112 mostra un effetto analgesico dose-dipendente aumentando la soglia algogena in modo significativo alle dosi più alte di 5 e 10 nmoli da noi utilizzate.

Figura 19: Curve dose-effetto di N/OFQ



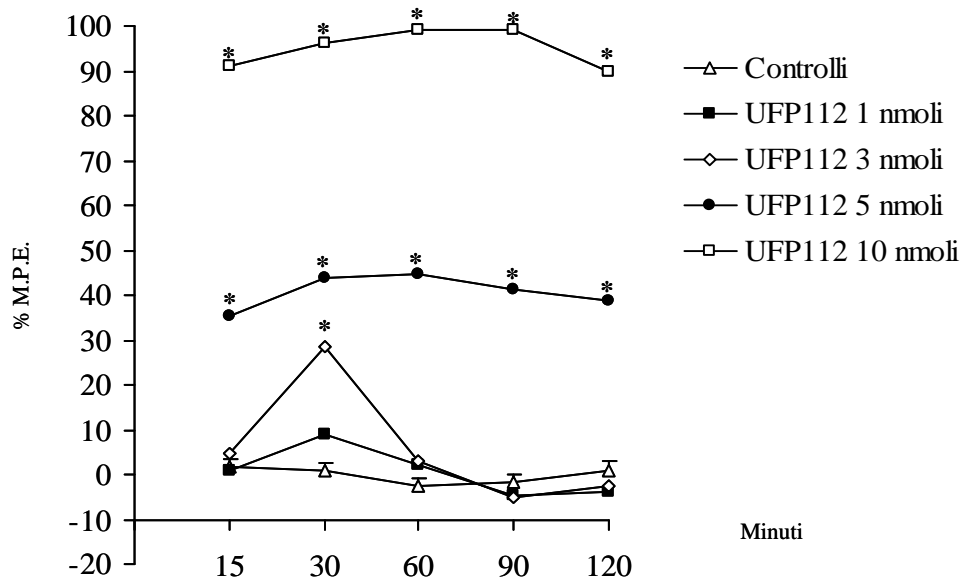
ANOVA seguita dal Test di Bonferroni. * $P < 0.05$ vs Controlli stesso tempo.

Figura 20: Curve dose-effetto della morfina



ANOVA seguita dal Test di Bonferroni. * $P < 0.05$ vs Controlli stesso tempo.

Figura 21: Curve dose-effetto UFP-112



ANOVA seguita dal Test di Bonferroni. * P < 0.05 vs Controlli stesso tempo.

4.2 Antagonismo funzionale tra Nocicettina/Orfanina FQ e il Fattore di Rilascio delle Corticotropine in condizioni legate a stati di ansia, nel ratto: coinvolgimento del sistema serotoninergico.

4.2.1 Test dell'elevated plus maze

4.2.1.1 Effetto di somministrazioni di N/OFQ o CRF

Nei ratti trattati in acuto con iniezioni intracerebroventricolari di N/OFQ da sola alla dose di 0,5 nmoli/ratto non si rivela alcun tipo di cambiamento comportamentale nell'elevated plus maze e tutti i parametri considerati non risultano diversi da quelli ottenuti nei ratti controllo trattati con soluzione fisiologica. La dose più alta utilizzata di N/OFQ, 1 nmoli/ratto, induce un aumento significativo nel tempo speso nelle braccia aperte, e nel numero di entrate nelle stesse e, di conseguenza una riduzione nel del tempo speso nelle braccia chiuse, rispetto ai ratti controllo ($P < 0.01$); la stessa dose aumenta anche l'attività motoria dei ratti nelle braccia aperte (Tabella 5). Questi effetti si verificano in maniera dose-dipendente e sono considerati come una risposta di tipo ansiolitico, come già dimostrato precedentemente per N/OFQ.

Il gruppo di ratti trattati con CRF da solo, alla dose di 1 nmole/ratto mostra un aumento significativo di tutti i valori comportamentali normalmente associati a situazioni di ansia provate dall'animale: un marcato aumento del tempo speso, dell'attività motoria e del numero di ingressi nelle braccia chiuse, rispetto agli animali controllo; di conseguenza si ha una riduzione del tempo speso, del numero di ingressi nelle braccia aperte e una ridotta attività motoria in esse (Tabella 5).

Tutti gli animali trattati con le sole somministrazioni di N/OFQ o in co-somministrazione con CRF, sono stati pre-trattati 2 ore prima degli esperimenti con N/OFQ (stessa dose) al fine di superare possibili effetti di ipomotilità indotti da N/OFQ che possono interferire con le risposte comportamentali, come già dimostrato in altri lavori *in vivo* (Vitale et al. 2006). Dopo questo pre-trattamento, non è stata infatti osservata alcuna riduzione nell'attività locomotoria, nel test dell'EPM e si è riscontrato un effetto ansiolitico del nostro peptide.

Le dosi di trattamento sono state scelte in base a esperimenti condotti in modelli animali nel ratto al fine di valutare gli effetti ansiolitici di N/OFQ (Vitale et al. 2006) e altri effetti come quello anoressizzante, indotto da CRF (Ciccocioppo et al. 2003).

4.2.1.2 Effetto di co-somministrazioni di N/OFQ e CRF

Sono stati valutati gli effetti comportamentali della co-somministrazione di N/OFQ (0,5 nmoli/ratto o 1 nmole/ratto), e CRF: quest'ultimo somministrato alla dose di 1 nmole/ratto, 10 minuti dopo il primo trattamento. In entrambi i casi, N/OFQ è in grado di antagonizzare gli effetti ansiogeni indotti dalla singola somministrazione con CRF. In particolare la

somministrazione di N/OFQ, 1 nmole/ratto, prima di CRF, riporta tutti i parametri comportamentali a livelli simili a quelli osservati per i ratti controllo. La dose minore di N/OFQ utilizzata (0,5 nmole/ratto) non è in grado di antagonizzare gli effetti ansiogeni indotti da CRF, poiché il tempo speso nelle braccia aperte, il numero di ingressi nelle medesime e l'attività locomotoria permangono inferiori rispetto ai ratti controllo (Tabella 5).

4.2.2 Test del conditioned defensive burying

4.2.2.1 Effetto di somministrazioni di N/OFQ o CRF

Nel test del conditioned defensive burying, sono stati riportati come parametri comportamentali solo la durata del tempo di burying, la latenza che intercorre fra la scossa ed il primo episodio di burying e l'altezza della segatura con la quale la sonda viene ricoperta. Somministrazioni della dose più bassa di N/OFQ (0,5 nmoli/ratto) non risultano modificare tali parametri rispetto ai ratti del gruppo di controllo; al contrario la dose più alta N/OFQ, 1 nmole/ratto, aumenta significativamente, il tempo di latenza e contemporaneamente riduce la durata del burying e l'altezza della segatura di ricoprimento. Somministrazioni di CRF, 1 nmole/ratto, determinano una riduzione nel tempo di latenza ed un aumento della durata di burying e dell'altezza della segatura di ricoprimento (Tabella 6).

4.2.2.2 Effetto di co-somministrazioni di N/OFQ e CRF

Gli effetti comportamentali osservati anche nel CDB, come per quelli dell'EPM, dimostrano che la somministrazione di N/OFQ alla dose di 1 nmole/ratto, 10 minuti prima della somministrazione di CRF, 1 nmole/ratto, è in grado di riportare i parametri comportamentali presi in esame a valori confrontabili a quelli osservati nel gruppo degli animali controllo; al contrario la N/OFQ, 0,5 nmoli/ratto, somministrata 10 minuti prima di CRF, non è in grado di antagonizzarne gli effetti determinando un comportamento simile a quello indotto dal solo CRF (1 nmole/ratto) (Tabella 6).

4.2.3 Valutazione del turnover di serotonina

Nella corteccia frontale, i campioni che derivano da animali a cui è stata somministrata N/OFQ alla dose di 1 nmole/ratto, dopo analisi in HPLC, mostrano un significativo decremento dei livelli di 5-HT, non modificano i livelli del metabolita 5-HIAA e di conseguenza vi è un aumento nel valore del rapporto fra 5-HIAA/5-HT rispetto ai campioni derivanti dal gruppo di animali controllo. Al contrario somministrazioni di CRF alla dose di 1 nmole/ratto, non comportano variazioni nei livelli di 5-HT, del metabolita 5-HIAA e dunque nel loro rapporto. CRF è però in grado di antagonizzare i cambiamenti dovuti a N/OFQ riportando i parametri esaminati a livelli confrontabili con i risultati ottenuti dal gruppo di animali controllo (Tabella 7).

Nel ponte, le somministrazioni di N/OFQ, alla dose di 1 nmole/ratto, risultano invece inefficaci nell'indurre cambiamenti nel sistema serotoninergico, poiché non determinano modificazioni nei livelli di 5-HT o 5-HIAA. CRF, alla dose di 1 nmole/ratto, determina un decremento significativo dei livelli di 5-HT, un aumento significativo dei livelli del suo metabolita 5-HIAA e di conseguenza un aumento del rapporto 5-HIAA/5-HT. La somministrazione dei due peptidi riporta tutti i parametri rilevati nel sistema serotoninergico a valori confrontabili con quelli osservati nei campioni degli animali di controllo (Tabella 8).

4.2.4 Effetti sulle caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A}

I dati ottenuti sulle caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A}, mediante analisi di binding recettoriale, hanno mostrato dopo trattamento con N/OFQ, un aumento significativo del numero dei suddetti recettori (densità recettoriale, B_{max}), coinvolti nella modulazione dell'ansia a livello della corteccia frontale, ma una riduzione della loro affinità (costante di dissociazione, K_D) per il ligando endogeno 5-HT. I trattamenti con solo CRF, al contrario, non inducono nessun tipo di cambiamento al sistema serotoninergico a livello della corteccia frontale (Tabella 9).

I dati ottenuti sulle caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A} nella seconda area cerebrale analizzata, il ponte hanno evidenziato, dopo somministrazione di CRF, una riduzione della densità recettoriale (B_{max}) ma un aumento dell'affinità dei recettori 5-HT_{1A} per il loro ligando endogeno (K_D). I trattamenti con sola N/OFQ, al contrario, non inducono nessun tipo di cambiamento al sistema serotoninergico a livello del ponte (Tabella 10).

Tutte le modificazioni nei parametri biochimici osservate sono riportate a valori confrontabili con quelli rilevati nel gruppo degli animali di controllo dopo somministrazioni di N/OFQ 1 nmole/ratto, seguita da CRF alla dose di 1 nmole/ratto.

Tabella 5: Parametri comportamentali valutati nell'elevated plus maze test.

Treatment	Time spent in the closed arms (s)	Time spent in the open arms (s)	Closed arm entry counts	Open arm entry counts	Motor activity in the closed arms (s)	Motor activity in the open arms (s)
Saline + Saline	172,4±18,1	68,3±7,5	3,5±1,0	4,1±0,9	42,6±5,2	18,3±2,0
Saline + CRF 1 nmol	237,2±20,3*	26,2±2,3*	6,6±0,7*	1,8±0,3*	75±8,2*	5,7±0,6*
N/OFQ 0.5 nmol + Saline	176,8±16,4	56,2±8,2	3,2±0,9	2,8±0,6	48,7±5,9	15,6±2,1
N/OFQ 0.5 nmol + CRF 1 nmol	213,6±20,8	38,2±2,1*	4,8±0,5	1,6±0,2*	70,2±6,5*	7,7±1,0*
N/OFQ 1 nmol + Saline	102,7±11,5*	118,5±10,9*	3,2±0,7	7,8±0,9*	24,7±3,6	44,4±5,2*
N/OFQ 1nmol + CRF 1 nmol	133,6±13,7	87,9±7,9	2,7±0,4	3,4±0,5	33,1±4,2	21,9±3,2

Valori espressi come media ± E.S.M. di 10 ratti per gruppo.* P<0.05 rispetto agli animali controllo (saline+saline).

Tabella 6: Parametri comportamentali valutati nel conditioned defensive burying test.

Treatment	Duration of buryng (s)	Latency to bury following the shock (s)	Height of buried bedding (cm)
Saline + Saline	71,5±6,3	106,5±11,0	4,7±0,4
Saline + CRF 1 nmol	244,6±25,1*	34,6±2,5*	8,2±1,3 *
N/OFQ 0.5 nmol + Saline	62,5±5,9	109,4±12,4	2,9±0,7
N/OFQ 0.5 nmol + CRF 1nmol	183,9±20,1*	45,7±4,3*	7,8±0,5 *
N/OFQ 1 nmol + Saline	28±1,6*	125,3±12,6	1,9±0,3*
N/OFQ 1 nmol + CRF 1 nmol	67,3±5,4	148,4±13,6	3,8±0,8

Valori espressi come media ± E.S.M. di 10 ratti per gruppo.* P<0.05 rispetto agli animali controllo (saline+saline).

Tabella 7: Effetti di somministrazioni di CRF o N/OFQ su 5-HT, il metabolita 5-HIAA e sul loro rapporto, nella corteccia frontale.

<i>FRONTAL CORTEX</i>	<i>5-HIAA</i> ng/g tissue	<i>5-HT</i> ng/g tissue	<i>5-HIAA/5-HT</i>
Saline + Saline	331,6 ± 21,5	429,1 ± 29,9	0,77 ± 0,06
Saline + CRF 1 µg	371,1 ± 32,5	448,4 ± 21,7	0,82 ± 0,07
N/OFQ 1 nmol + saline	355,2 ± 27,8	234,4 ± 13,9 *	1,5 ± 0,11 *
N/OFQ 1 nmol + CRF 1 µg	303,1 ± 23,7	396,4 ± 28,4	0,76 ± 0,05

Valori espressi come media ± E.S.M. di 10 ratti per gruppo di trattamento. * P<0.05 vs controlli (saline+saline).

Tabella 8: Effetti di somministrazioni di CRF o N/OFQ su 5-HT, il metabolita 5-HIAA e sul loro rapporto, nel ponte.

<i>PONS</i>	<i>5-HIAA</i> ng/g tissue	<i>5-HT</i> ng/g tissue	<i>5-HIAA/5-HT</i>
Saline + Saline	278,3 ± 10,9	571,5 ± 48,1	0,50 ± 0,04
Saline + CRF 1 µg	505 ± 41,7 *	325,4 ± 39,4 *	1,50 ± 0,11 *
N/OFQ 1 nmol + saline	230,1 ± 22,5	416 ± 53,7	0,55 ± 0,08
N/OFQ 1 nmol + CRF 1 µg	298,3 ± 25,8	589,7 ± 57,9	0,49 ± 0,03

Valori espressi come media ± E.S.M. di 10 ratti per gruppo di trattamento. * P<0.05 vs controlli (saline+saline).

Tabella 9: Effetti delle somministrazioni di CRF o N/OFQ sulle caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A} nella corteccia frontale di ratto.

<i>FRONTAL CORTEX</i>	<i>B_{max}</i> (fmol/mg protein)	<i>K_D</i> (nM)
Saline + Saline	264,2 ± 15	1,9 ± 0,3
Saline + CRF 1 µg	281,5 ± 17,2	1,6 ± 0,2
N/OFQ 1 nmol + saline	451,8 ± 28,9 *	3,2 ± 0,6 *
N/OFQ 1 nmol + CRF 1 µg	301,3 ± 27,1	1,8 ± 0,2

Valori espressi come media ± E.S.M. di 10 ratti per gruppo di trattamento. * P<0.05 vs controlli (saline+saline).

Tabella 10: Effetti delle somministrazioni di CRF o N/OFQ sulle caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A} nel ponte di ratto.

<i>PONS</i>	<i>B_{max}</i> <i>(fmol/mg protein)</i>	<i>K_D</i> <i>(nM)</i>
Saline + Saline	193,7 ± 19,3	2,9 ± 0,9
Saline + CRF 1 µg	81,5 ± 5,2 *	1,5 ± 0,4 *
N/OFQ 1 nmol + saline	207,4 ± 14,8	2,6 ± 0,7
N/OFQ 1 nmol + CRF 1 µg	201,1 ± 22,3	2,2 ± 0,8

Valori espressi come media ± E.S.M. di 10 ratti per gruppo di trattamento. * P<0.05 vs controlli (saline+saline).

4.3 Neuropeptide S stimola la chemiotassi e la fagocitosi di monociti umani attivando il suo recettore (NPSR).

4.3.1 Effetto di NPS sulla chemiotassi dei monociti umani.

Per valutare gli effetti di NPS sulla chemiotassi di monociti umani è stata costruita una curva concentrazione-risposta nell'intervallo da 10^{-12} M a 10^{-5} M. Come sostanza di controllo positivo con attività chemiotattica è stato utilizzato fMLP (da solo) alla concentrazione di 10^{-8} M nel terreno di coltura. I risultati mostrati in Figura 22 mostrano che la migrazione "random" dei monociti umani nel solo terreno di coltura ha un valore di 20.6 ± 1.2 (n° di cellule per campo analizzato), parametro che aumenta fino ad un valore di 98.9 ± 3.0 in presenza di fMLP. NPS da solo induce un significativo effetto chemiotattico a partire dalla concentrazione di 10^{-9} M, indicato dal valore 35.9 ± 4.7 , con un incremento concentrazione dipendente fino a 10^{-5} M, con un valore di 80.0 ± 4.2 , che è simile alla risposta chemiotattica evocata da fMLP alla concentrazione di 10^{-8} M. NPS non produce infatti, una classica curva concentrazione-risposta con "andamento a campana" ("bell-shaped") come la maggior parte dei peptidi noti, alle nostre condizioni sperimentali.

4.3.2 Effetti degli antagonisti sulla chemiotassi indotta da fMLP e NPS.

Questa serie di esperimenti hanno l'obiettivo di valutare il coinvolgimento di NPSR nell'effetto chemiotattico indotto da NPS sui monociti umani. Differenti antagonisti di natura peptidica o non peptidica sono stati analizzati da soli nel mezzo di coltura o in presenza di NPS o fMLP. Gli antagonisti peptidici [D-Cys(^tBu)⁵]NPS (Figura 23) e [^tBu-d-Gly⁵]NPS (Figura 24) utilizzati da soli nel mezzo di coltura, alle concentrazioni 10^{-3} M o 10^{-5} M, non modificano la migrazione dei monociti umani rispetto al valore di controllo e nemmeno l'azione chemiotattica indotta da fMLP, 10^{-8} M. Al contrario, entrambi gli antagonisti, alla concentrazione di 10^{-3} M, inducono una diminuzione significativa dell'effetto chemiotattico indotto da NPS sia alla concentrazione di 10^{-5} M che 10^{-7} M. Non si sono osservati effetti sulla chemiotassi (indotta da NPS) con l'uso di entrambi gli antagonisti alla concentrazione più bassa utilizzata, 10^{-5} M.

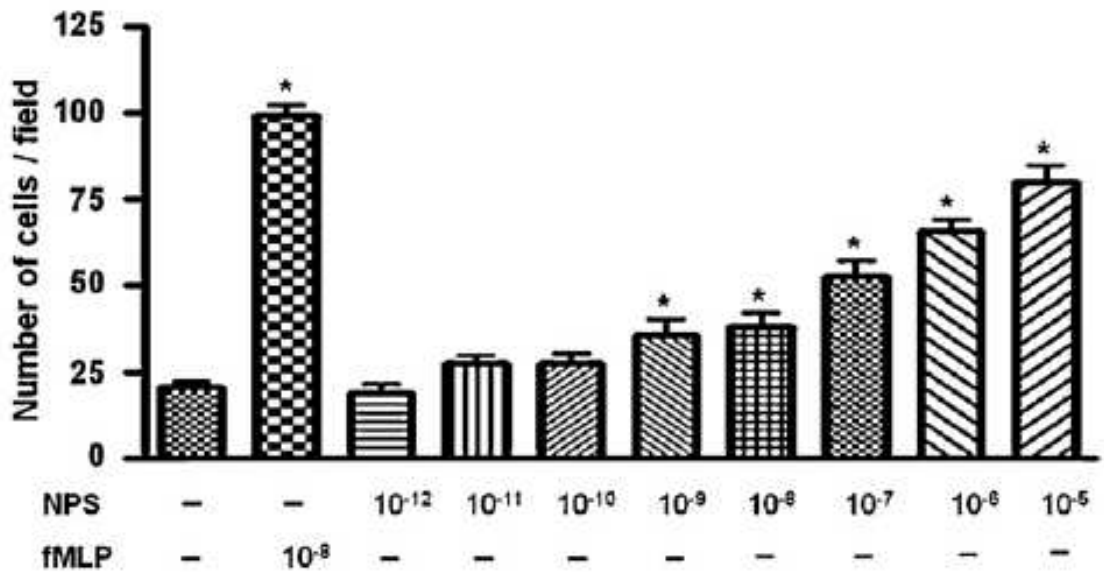
Dalla Figura 25 è possibile osservare che l'antagonista non peptidico SHA 68, presente da solo nel terreno di coltura, alla concentrazione 10^{-5} M, non modifica nè la migrazione chemiotattica dei monociti controllo nè la migrazione indotta dalla sostanza di riferimento, fMLP, 10^{-8} M; tuttavia, alla medesima concentrazione, SHA 68 è in grado di ridurre in modo statisticamente significativo la migrazione indotta da NPS, 10^{-7} M.

4.3.3 Effetti degli antagonisti sulla fagocitosi indotta da fMLP e NPS.

Il saggio di fagocitosi è stato definito a partire dall'effetto chemiotattico di NPS; sulla base di questi risultati è stata scelta la concentrazione di NPS 10^{-5} M poiché essa si è rivelata in grado di indurre un effetto massimo sulla chemiotassi di monociti umani. Per una maggiore sintesi abbiamo raggruppato i risultati degli effetti dei saggi di fagocitosi indotti dal solo

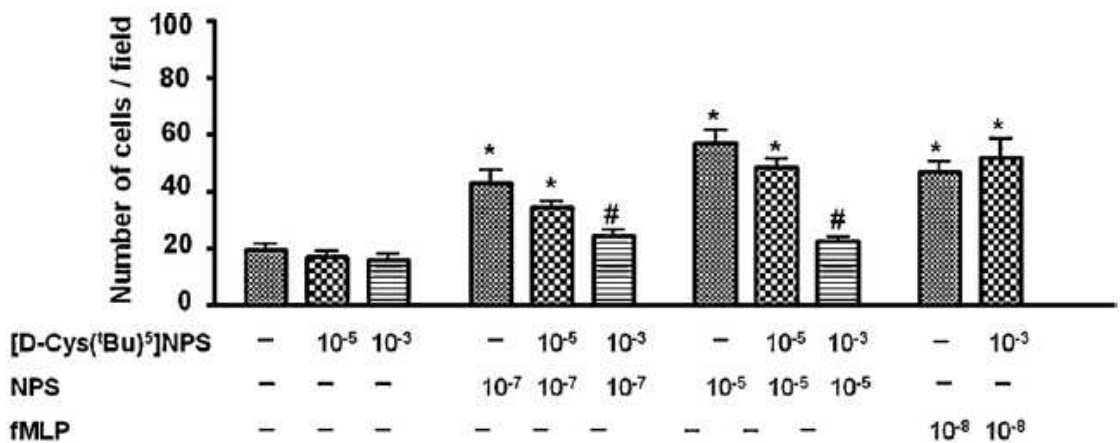
NPS o dagli antagonisti nella stessa Figura 26. I dati degli esperimenti di fagocitosi mostrano che la prestimolazione con NPS induce un incremento significativo nel numero di batteri internalizzati, da parte dei monociti umani, simile all'effetto indotto dal controllo utilizzato fMLP, 10^{-8} M. Il pretrattamento di 30 minuti con gli antagonisti peptidici alla concentrazione di 10^{-3} M è in grado di ridurre in modo statisticamente significativo ma parziale l'effetto di NPS, essendo i valori significativamente diversi sia dai controlli che dai trattati con NPS stesso. Il pretrattamento con l'antagonista non peptidico, SHA 68, 10^{-5} M, blocca in modo statisticamente significativo l'effetto fagocitico indotto da NPS, 10^{-7} M, riportando i valori a livello dei controlli.

Figura 22: Effetto chemiotattico di NPS o fMLP sui monociti umani.



I dati sono espressi come media \pm E.S.M. di 8 esperimenti. L'analisi della varianza (ANOVA) ad una via è seguita dal Bonferroni post hoc test. *P < 0.01 vs. controlli.

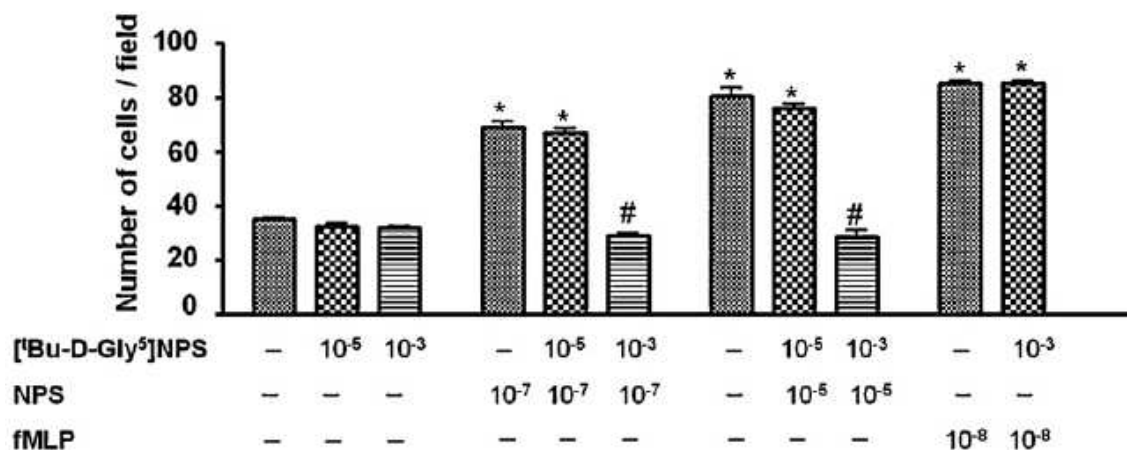
Figura 23: Effetti di [D-Cys(^tBu)⁵]NPS sulla stimolazione chemiotattica dei monociti da parte di NPS o fMLP.



I dati sono espressi come media di 5 esperimenti \pm E.S.M., analizzati utilizzando per ogni antagonista, l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie è seguita dal post-hoc test Bonferroni.

*P < 0.05 vs. controlli. #P < 0.05 vs. NPS.

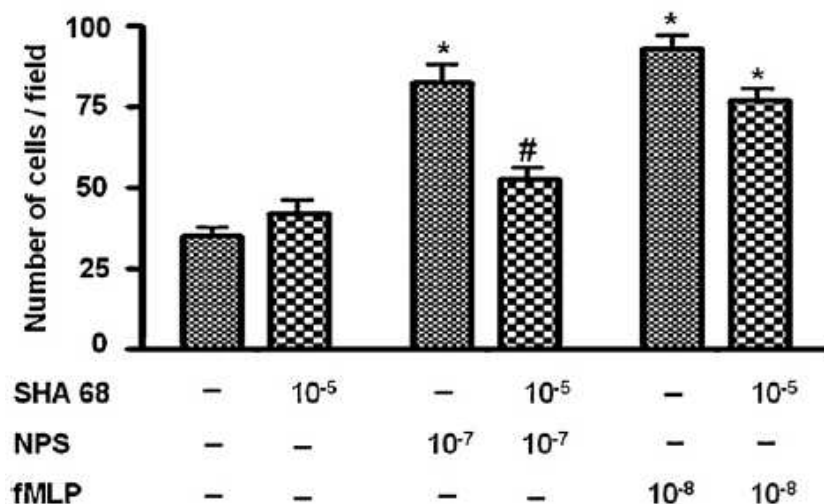
Figura 24: Effetti di [³Bu-d- Gly⁵]NPS sulla stimolazione chemiotattica dei monociti da parte di fMLP o NPS.



I dati sono espressi come media di 5 esperimenti ± E.S.M., analizzati utilizzando per ogni antagonista, l'analisi della varianza (ANOVA) a due è seguita dal post-hoc test Bonferroni.

*P < 0.05 vs. controlli. #P < 0.05 vs. NPS.

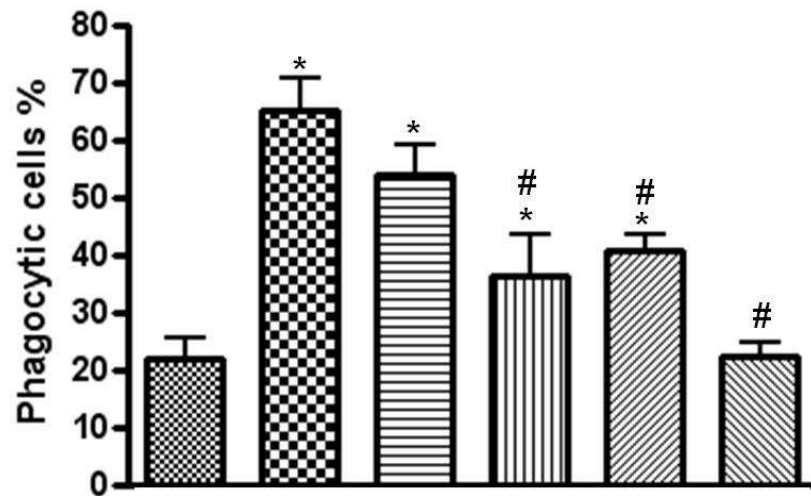
Figura 25: Effetto di SHA 68 sulla stimolazione chemiotattica dei monociti indotta da fMLP o NPS.



I dati sono espressi come media di 5 esperimenti ± E.S.M., analizzati utilizzando per ogni antagonista, l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie è seguita dal post-hoc test Bonferroni.

*P < 0.05 vs. controlli. #P < 0.05 vs. NPS.

Figura 26: Effetti degli antagonisti peptidici e non peptidici sulla fagocitosi di monociti umani indotta da fMLP o NPS.



NPS	-	10 ⁻⁵	-	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
fMLP	-	-	10 ⁻⁸	-	-	-
[D-Cys('Bu)⁵]NPS	-	-	-	10 ⁻³	-	-
['Bu-D-Gly⁵]NPS	-	-	-	-	10 ⁻³	-
SHA 68	-	-	-	-	-	10 ⁻⁵

I dati sono espressi come percentuale di cellule fagocitanti di 5 esperimenti separati, l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie è seguita dal Bonferroni post hoc test.

* $P < 0.05$ vs controlli. # $P < 0.05$ vs NPS. Per maggiore sintesi i risultati sono stati raggruppati nella stessa Figura.

5 DISCUSSIONE

5.1 Effetti antinocicettivi di somministrazioni intratecali di agonisti del recettore della Nocicettina/Orfanina FQ, mediante l'utilizzo del test del tail flick.

Nello studio relativo a questa prima area tematica abbiamo riprodotto una tecnica, da noi validata, per le somministrazioni spinali che prevede un catetere intratecale utilizzando la morfina come farmaco di riferimento e confermando, per questa sostanza, i risultati ormai consolidati da tempo sul fatto che gli oppiacei svolgano un ruolo cruciale nella modulazione del dolore anche a livello spinale (Yaksh, 1999). Il test del tail flick si avvale di una sorgente di calore radiante che, applicata alla coda dell'animale ne provoca uno spostamento laterale breve ma vigoroso. Si tratta di un riflesso spinale che coinvolge le fibre C e risulta soggetto a controllo anche da parte di strutture sopraspinali (Le Bars et al. 2001). Abbiamo quindi scelto il test del tail flick in quanto si basa su una fonte di calore radiante essendo specifico per valutare la modulazione della trasmissione dolorosa a livello spinale. Questo determina una minore possibilità di divergenze, a livello dei risultati sperimentali, dovute alla natura dello stimolo nocivo applicato; inoltre il test da noi scelto è quello più comunemente citato negli studi riguardanti gli effetti antinocicettivi spinali in quanto può essere utilizzato con facilità e risulta sensibile anche agli analgesici di tipo oppioide. È possibile infatti che la modulazione di differenti tipologie di dolore possa essere ascritta a circuiti neurochimici distinti (Mogil et al. 1996b, 1999).

Le nostre evidenze sperimentali sugli effetti, per via intratecale, della nocicettina quale agonista endogeno sono in linea con la maggior parte dei risultati che indicano un predominante effetto inibitorio di questa a livello spinale. Abbiamo infatti dimostrato che la dose più elevata di nocicettina (100 nmoli/ratto i.t.) risulta essere analgesica in tutto il periodo considerato (2 ore) ed equiefficace con la dose di morfina di 3 nmoli/ratto. Questo dato è stato evinto dal confronto delle aree sotto la curva di nocicettina e morfina alle varie dosi utilizzate. I nostri esperimenti preliminari in acuto, con l'utilizzo del catetere intratecale, hanno avuto l'obiettivo di selezionare una dose di nocicettina consona per poi procedere, in futuro, a trattamenti cronici con lo scopo di valutare una possibile tolleranza all'effetto antinocicettivo di questo peptide nel tempo, in confronto con l'oppiaceo di riferimento (morfina) e con analoghi di sintesi che differiscano in potenza ed efficacia.

Inoltre la nocicettina presenta effetti differenti sul dolore se somministrata a livello intratecale, ove mostra un chiaro effetto antinocicettivo dose-dipendente oppure a livello intracerebroventricolare ove risulta inefficace di per sé. Questi risultati sono in accordo con altri che indicano come il “*signaling*” della nocicettina abbia azioni opposte a livello spinale o soprspinale risultando quest'ultima pronocicettiva o inefficace nel cervello e antinocicettiva nel midollo spinale (come rassegne vedi: Mogil e Pasternak, 2001, Zeilhofer e Calò, 2003). Queste evidenze sono supportate anche da studi su animali knock out che dimostrano come sia gli effetti pronocicettivi soprspinali che quelli antinocicettivi

spinali, prodotti dalla nocicettina, non risultano più evidenti nei topi NOP (-/-) (Nishi et al. 1997; Rizzi et al. 2002).

L'azione analgesica della N/OFQ nel midollo spinale può essere dovuta ad un'inibizione diretta della trasmissione nocicettiva, azione simile a quella degli oppioidi classici. D'altra parte le vie di trasmissione sopraspinali sembrano essere organizzate in modo tale che l'analgesia indotta da farmaci di tipo oppioide richieda una disinibizione. Perciò un composto come la N/OFQ che produce ubiquitariamente una inibizione cellulare agirà contrapponendosi all'analgesia oppioide. I risultati della presente tesi confermano i dati presenti in letteratura sulla complessità delle relazioni tra il sistema nocicettina – recettore NOP e la trasmissione nocicettiva. I nostri risultati hanno confermato e ampliato le conoscenze sul coinvolgimento del sistema nocicettina e del suo recettore nella modulazione del dolore. Ciò ci ha suggerito di indagare nuovi ligandi per il recettore NOP, in particolare l'antagonista UFP-112, come composto innovativo nel trattamento del dolore. Infatti il trattamento del dolore di elevata intensità si basa in maniera preponderante sull'utilizzo di analgesici oppioidi, la maggior parte dei quali agiscono attraverso i recettori oppioidergici μ (MOP). Oltre all'azione analgesica, la morfina e altri analgesici producono una varietà di effetti collaterali inclusa inibizione della motilità gastrointestinale, depressione respiratoria, tolleranza e dipendenza fisica, che spesso limitano il loro utilizzo nel trattamento antalgico.

A questo scopo, all'Università degli Studi di Ferrara è stato sintetizzato il peptide UFP-112 che presenta attività agonista per NOP. È seguita la sua caratterizzazione *in vitro* ed *in vivo* su modelli animali di topo. In particolare è stato analizzato l'effetto sulla nocicezione di UFP-112 mediante “*tail withdrawal test*”, sia dopo somministrazioni i.c.v. che i.t. in un intervallo di dosi da 1 a 100 pmoli/topo, confermando il suo ruolo analgesico (Rizzi et al. 2007).

Sulla base di questi studi, un ulteriore obiettivo del presente lavoro di ricerca è stato valutare gli effetti di UFP-112 sulla nocicezione nel ratto dopo somministrazioni i.t., attraverso lo studio degli effetti comportamentali del suddetto composto in ambito di modulazione del dolore a livello spinale. Il successo della messa a punto della caratterizzazione spinale ci ha permesso di valutare l'effetto del composto peptidico, di sintesi, UFP-112 nel ratto, per un'analisi in acuto, utilizzando il test del tail flick, la cui validità nell'analgesia spinale è stata precedentemente descritta.

Grazie agli esperimenti condotti abbiamo verificato, per la prima volta, gli effetti analgesici dati dall'attività NOP agonista del peptide UFP-112 che mostra un'efficacia non inferiore alla morfina, farmaco di riferimento. Infatti, dai dati delle curve dose-effetto di UFP-112, si evince come la dose di 5 nmoli possieda un'attività analgesica analoga a quella indotta dalla morfina alla dose di 10 nmoli. UFP-112 mima quindi l'azione antinocicettiva di N/OFQ ma con potenza maggiore e dimostra un effetto più duraturo nel tempo, simile all'analgesico di riferimento. Questi risultati sono un valido strumento per

selezionare la dose dei farmaci per un futuro studio in cronico, con l'obiettivo di valutare lo sviluppo o meno di possibili effetti di tolleranza all'analgesia di questo peptide.

UFP-112 è un peptide in fase di sperimentazione preclinica; non è perciò possibile somministrarlo per via sistemica, pena la sua immediata degradazione ad opera delle proteasi e peptidasi presenti nell'organismo. Se in futuro questo farmaco si dimostrasse un potente analgesico, scevro dagli effetti collaterali tipici degli altri analgesici oppioidi, si procederà alla ricerca e sintesi di analoghi non peptidici con possibilità di somministrazione sistemica utilizzabile in clinica. Ciò permetterà un approccio innovativo legato a questi composti che hanno dimostrato un adeguato profilo farmacologico. Il nostro obiettivo futuro consisterà nella somministrazione cronica della sostanza; dal momento che il parametro limitante a tutt'oggi è costituito dalla persistenza dell'intervento di impianto del catetere il prossimo passo sarà quello di ottimizzare la metodica di cateterizzazione negli animali, rendendo possibile il mantenimento dei cateteri per un periodo di tempo più lungo. Uno dei possibili miglioramenti potrebbe essere quello di sostituire alla somministrazione manuale del farmaco una continua tramite l'utilizzo di mini-pompe osmotiche installate sotto cute. Il sistema internalizzato impedisce l'accidentale uscita del catetere dovuta alla manipolazione quotidiana da parte dell'operatore per la somministrazione cronica.

L'obiettivo finale è quello di arrivare ad ottenere un composto utilizzabile in clinica per la terapia del dolore cronico di media/elevata intensità, possibilmente privo di effetti di tolleranza.

In conclusione il presente esperimento conferma che l'attivazione selettiva a livello spinale del recettore NOP esercita una chiara azione antinocicettiva in modelli animali di roditori. Questi studi, insieme alle osservazioni degli effetti di agonisti per NOP, in modelli animali di primati non umani, suggeriscono che agonisti selettivi per NOP, potranno costituire una innovativa classe di analgesici a livello spinale (Ko et al. 2006, Ko et al. 2009).

5.2 Antagonismo funzionale tra Nocicettina/Orfanina FQ e il Fattore di Rilascio delle Corticotropine in condizioni legate a stati di ansia, nel ratto: coinvolgimento del sistema serotoninergico.

Precedenti risultati comportamentali hanno dimostrato un'interazione funzionale fra CRF e il sistema N/OFQ – NOP; in particolare, N/OFQ è in grado di antagonizzare gli effetti indotti da CRF come quelli anoresizzanti in modelli animali di ratto (Ciccocioppo et al. 2001). Il nostro studio e i risultati prodotti avvalorano questa ipotesi ed estendono questo rapporto funzionale fra CRF e N/OFQ a condizioni legate all'ansia. CRF può ridurre il rilascio del peptide endogeno N/OFQ, fenomeno che comporta un immediato aumento di espressione di NOP sulla superficie dei neuroni post-sinaptici. Il meccanismo alla base del

controllo di CRF sull'espressione di NOP non è ancora ben chiaro. Si potrebbe ricondurre tale controllo di espressione, a livello dell'mRNA per NOP (Zavieri et al. 2006; Ito et al. 2000), oppure ad un meccanismo compensatorio dovuto alla riduzione del ligando N/OFQ rilasciato per inibizione del CRF e conseguente aumento di NOP nei neuroni post-sinaptici per incrementare le possibilità di legame a basse concentrazioni di N/OFQ libera (Rodi et al. 2008). Secondo questa ipotesi, CRF potrebbe agire come antagonista funzionale del sistema N/OFQ – NOP (Rodi et al. 2008). E' ben noto che CRF viene rilasciato durante le situazioni di stress e che i suoi recettori sono espressi in differenti aree cerebrali, attraverso i quali CRF è in grado di mediare gli effetti ansiogenici in queste regioni (Sahuque et al. 2006). Inoltre esistono numerosi evidenze sperimentali che dimostrano un ruolo di "anti-stress" di differenti antagonisti per il recettore di CRF. Il nostro studio ha confermato che iniezioni i.c.v. di CRF inducono effetti ansiogenici in due test comportamentali: CDB ed EPM, come descritto precedentemente, così come confermano gli effetti ansiolitici indotti da somministrazioni i.c.v. di N/OFQ in modelli animali di ratto nei medesimi test comportamentali (ref Vitale et al. 2008(?)).

La maggior parte dei farmaci antidepressivi attualmente per uso clinico condividono meccanismi d'azione simili, agendo in ultima istanza, mediante un incremento dei livelli di monoamine nello spazio sinaptico (Nutt, 2005). E' stato dimostrato che UFP-101, antagonista selettivo del recettore NOP, contrasta l'inibizione pre-sinaptica di noradrenalina (Marti et al. 2003) e di 5-HT (Calò et al. 2002) indotta da somministrazione di N/OFQ in preparati corticali e previene l'iperpolarizzazione, mediata dai canali del K^+ , provocata dalla N/OFQ nel nucleo del rafe dorsale (Gavioli et al. 2004).

Molto poco è invece presente in letteratura riguardo ai possibili meccanismi alla base dell'effetto ansiolitico indotto da somministrazioni di N/OFQ. Studi in vitro dimostrano che N/OFQ è un potente inibitore del rilascio di numerosi neurotrasmettitori, inclusa la 5-HT (Schlicker e Morari, 2000) che gioca un ruolo chiave nel controllo dell'ansia e della paura (Millan 2003). Inoltre gli agonisti per il recettore 5-HT_{1A} e gli inibitori selettivi della ricaptazione di 5-HT sono largamente utilizzati come farmaci per il trattamento clinico di stati di ansia (Nutt 2005). Una stretta relazione fra il sistema serotoninergico e N/OFQ-ergico viene inoltre suggerito sulla base di altre osservazioni: Le Maitre et al (2005) riportano che NOP sono localizzati sui neuroni serotoninergici dei nuclei del rafe dorsale; inoltre, basse dosi di N/OFQ incrementano il turnover di 5-HT nell'ippocampo (Kamei et al. 2004) così come il blocco farmacologico dei recettori 5-HT_{1A} con gli antagonisti previene gli effetti ansiolitici indotti da N/OFQ (Kamei et al. 2004). Sulla base di queste evidenze è possibile ipotizzare che gli effetti di N/OFQ sull'ansia possono dipendere dall'abilità di questo sistema peptidergico di modulare le vie endogene del sistema serotoninergico.

I nostri risultati sperimentali hanno, infatti, confermato che CRF e N/OFQ sono in grado di modulare, in maniera area-dipendente, il sistema serotoninergico e, in particolare, il

turnover di 5-HT e le caratteristiche dei recettori 5-HT_{1A}. Tali modificazioni sono annullate dalla co-somministrazione dei due composti dimostrando così un antagonismo anche nei parametri biochimici analizzati.

5.3 Neuropeptide S stimola la chemiotassi e la fagocitosi di monociti umani attivando il suo recettore (NPSR).

Quest'ultima area di ricerca si caratterizza per aver confermato la presenza di NPSR funzionali sulla superficie delle cellule monocitiche umane. Inoltre abbiamo dimostrato l'effettivo ruolo chiave di NPS come modulatore della risposta immunitaria umana. Si è evidenziato il ruolo funzionale di NPS nei meccanismi di difesa primari che normalmente l'organismo umano attiva in caso di invasione di un antigene esterno, ovvero la chemiotassi e la fagocitosi. In particolar modo, abbiamo studiato l'effetto di NPS sui principali effettori della chemiotassi e della fagocitosi: i monociti. La chemiotassi e la fagocitosi mediate dai monociti umani, rappresentano le prime risposte dell'organismo in condizioni di invasione e infiammazione; è infatti di particolare importanza richiamare sul sito di invasione le cellule del sistema immunitario mediante il fenomeno di chemiotassi che prevede il movimento di monociti verso una direzione ben precisa secondo un gradiente chimico. Successivamente la fagocitosi prevede il contatto fra i recettori superficiali dei monociti con gli antigeni dell'agente patogeno, il riconoscimento del patogeno come "non-self" da parte del monocita, la sua internalizzazione e digestione. Con questo studio, abbiamo potuto evidenziare un ruolo di modulatore del sistema NPS – NPSR, all'interno di questi meccanismi difensivi.

Abbiamo quindi dimostrato che NPS è un agente chemiotattico per i monociti umani. Questo effetto è mediato dall'attivazione del suo recettore, NPSR, studiato secondo i criteri di farmacologia classica, utilizzando antagonisti selettivi. Come agente pro-infiammatorio standard è stato usato il peptide fMLP che, mediante l'attivazione del suo recettore specifico accoppiato a proteina G, attiva diverse risposte funzionali, compresa la chemiotassi (Le et al. 2002). In linea con i precedenti studi (Fine et al. 2001), anche i nostri dati confermano che fMLP agisce da potente stimolatore della migrazione dei monociti umani.

Inoltre abbiamo potuto dimostrare che NPS induce la chemiotassi dei monociti umani in modo concentrazione dipendente, in un intervallo di concentrazioni da noi analizzate da 10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M. Come già descritto precedentemente, la curva concentrazione – risposta di NPS è incompleta; per esempio non è stato determinato il valore di massimo effetto E_{max}; questo potrebbe spiegare la curva non a campana ottenuta nel nostro intervallo di concentrazioni. La possibile spiegazione della bassa potenza di NPS alle condizioni sperimentali non è facile. Si nota però che la significatività statistica dell'effetto chemiotattico indotto dal peptide rientra nell'ordine di grandezza di

concentrazioni nanomolari, e questa evidenza è in linea con diversi studi *in vitro* sugli effetti prodotti da NPS (Pulkkinen et al. 2006; Sundman et al. 2010).

Pulkkinen et al. (2006), hanno infatti dimostrato la capacità di NPS di attivare la chemiotassi di linee macrofagiche murine, poiché NPS è in grado di ridurre l'adesione cellulare e aumentarne la mobilità. Tuttavia il possibile potenziale chemiotattico di NPS su monociti umani non era stato ancora studiato e il nostro studio è perciò il primo in questo ambito.

Studi precedenti hanno dimostrato la presenza del recettore NPSR sulla superficie delle cellule del sistema immunitario e l'espressione da parte di queste ultime del ligando NPS (Yao et al. 2011). Per esempio, in pazienti affetti da patologie con una componente infiammatoria intestinale NPSR è presente sulla superficie delle cellule effettrici della risposta infiammatoria come monociti e linfociti; inoltre, la sua espressione aumenta dopo l'attivazione delle stesse tipologie cellulari (D'Amato et al. 2007; Sundman et al. 2010). In cellule umane del sangue e di espettorato, monociti/macrofagi e eosinofili sono stati identificati come positivi a NPSR (Pulkkinen et al. 2006). E' stato precedentemente dimostrato, utilizzando metodi che valutano l'adesione dei macrofagi su una matrice di fibronectina marcata in fluorescenza, che NPS (1 μ M) è in grado di incrementare la migrazione; inoltre stimola la fagocitosi di *Escherichia Coli* marcati in fluorescenza, di linee cellulari macrofagiche di topo RAW 264.7 (Pulkkinen et al. 2006). Altri studi hanno inoltre riportato un picco nell'espressione basale di NPSR in cellule epiteliali di diversi organi e tessuti (inclusi l'intestino tenue e crasso), e un incremento di espressione di NPSR durante l'infiammazione come, ad esempio, in condizioni di infiammazione intestinale e di asma (Camilleri et al. 2010).

Abbiamo infine, utilizzato antagonisti selettivi per NPSR per dimostrare che l'effetto chemiotattico di NPS è mediato da un'attivazione selettiva di NPSR. I nostri dati mostrano che SHA 68 ha una maggiore potenza se comparata con [D-Cys(¹Bu)⁵]NPS o [¹Bu-d-Gly⁵]NPS. Questa sua maggiore potenza è in linea con i risultati ottenuti anche dagli studi di mobilitazione del Ca²⁺, come messaggero intracellulare dipendente dall'attivazione di NPSR; tali saggi sono stati effettuati con recettori ricombinati NPSR su cellule di topo (Guerrini et al. 2010) e ratto (Ruzza et al. 2012).

Nello studio che abbiamo condotto in collaborazione con l'Università di Ferrara (Ruzza et al. 2012) è inoltre dimostrato che [¹Bu-d-Gly⁵]NPS possiede una potenza d'azione maggiore rispetto all'altro antagonista peptidico [D-Cys(¹Bu)⁵]NPS sia in studi *in vitro* in analisi di mobilitazione del Ca²⁺ intracellulare che *in vivo* nei test di EPM e CDB nel ratto. Tuttavia, viste anche le differenze delle condizioni sperimentali, tali diversità di potenza non sono state riscontrate sulla capacità di inibizione chemiotattica di questi composti. E' stato invece osservato che i due antagonisti peptidici, sono capaci di bloccare l'effetto chemiotattico indotto da NPS alla sola concentrazione di 10⁻³ M, la più alta utilizzata. E' molto difficile dare una spiegazione sul mancato effetto inibitorio dato dagli

antagonisti alla concentrazione 10^{-5} M sull'agonista NPS, utilizzato alla concentrazione di 10^{-7} M; una possibile causa potrebbe essere data dall'alta densità recettoriale di NPSR, espresso sulla superficie dei monociti umani. Di conseguenza si osserva un'inibizione significativa della migrazione solo ad alte concentrazioni utilizzate di antagonisti. E' inoltre degno di nota osservare come SHA 68 mostri, alla concentrazione utilizzata di 10^{-5} M, attività di antagonista relativamente più elevata se confrontata con le altre attività *in vitro* studiate su SHA 68 (Ruzza et al. 2010).

Rispetto agli studi condotti sul ruolo fisiopatologico di NPS nell'infiammazione, i nostri dati suggeriscono che i processi infiammatori possono essere sostenuti dal reclutamento di monociti/macrofagi causato, anche in parte, dall'incremento dei livelli di NPS. Altri studi ipotizzano che un coinvolgimento del "guadagno di funzione" (*gain-of-function*) del fenotipo della variante recettoriale NPSR Asn 107 Iso è associato ad un incremento intrinseco dell'efficacia di NPS, come dimostrato da studi *in vitro* in differenti linee cellulari (Bernier et al. 2006). Inoltre, questa isoforma recettoriale è associata ad un incremento della suscettibilità all'asma e ad altre malattie gastrointestinali con componente infiammatoria (Quattrini et al. 2004). Per esempio, sulla pelle i neuropeptidi agiscono come mediatori dell'asse neuroimmunitario, in modo endocrino, paracrino e in alcuni casi autocrino: essi vengono rilasciati dalle fibre nervose sensoriali o autonome durante le fasi infiammatorie (Pradhan et al. 2009). I neuropeptidi come NPS possono essere secreti neuronalmente e modulare poi la risposta infiammatoria, come accade in patologie come asma, l'artrite e le sindromi dolorose (Brack e Stein, 2003). Inoltre, espressioni elevate di NPSR sono state ritrovate in cervello di topo e questo ha suggerito che NPSR può contribuire al fenotipo infiammatorio mediato da meccanismi neuronali (Pietra et al. 2011). Il sistema NPS – NPSR può quindi giocare un ruolo fondamentale nella regolazione delle vie che mettono in stretta relazione il sistema nervoso ed una risposta immunitaria. I nostri studi sugli antagonisti per NPSR, dimostrano che la risposta chemiotattica dei monociti umani, è mediata dall'attivazione di NPSR stesso. Questo suggerisce che il blocco di NPSR in cellule immunitarie potrebbe essere una strategia per ridurre lo stato infiammatorio che caratterizza le patologie menzionate in precedenza.

L'effetto di NPS sulla fagocitosi e la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di macrofagi in modello animale di suino, è stata esaminata da Yao et al. (2011). Anche in questo modello, l'incubazione con NPS incrementa la fagocitosi da parte dei macrofagi, suggerendo che NPS potrebbe essere in grado di mediare una risposta immunitaria di tipo non-specifico. In questo studio, inoltre, viene sottolineato che NPS, se somministrato da solo, non è in grado di indurre la produzione di differenti citochine, ma in presenza di LPS, ne aumenta la produzione (Yao et al. 2011). La fagocitosi e la produzione di molecole pro-infiammatorie sono due importanti meccanismi alla base della risposta macrofagica nei confronti di un'invasione di agenti patogeni nell'organismo ospite. I nostri risultati suggeriscono come NPS possa promuovere sia la fagocitosi che la

chemiotassi facilitando la risposta immunitaria nell'eliminazione della fonte di infiammazione in tempi brevi e nel ripristino delle condizioni fisiologiche dell'organismo.

6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Grazie alla tecnica di farmacologia inversa, alla strategia del recettore orfano e all'utilizzo dei GPCR come bersagli molecolari, a partire da metà degli anni '90, la ricerca di nuovi neuropeptidi ha subito una drastica accelerazione. Da allora circa 15 famiglie di nuovi neuropeptidi sono state scoperte e si è dimostrato come ognuna di queste sia in grado di regolare svariate risposte fisiologiche. E' di rilievo il ruolo decisivo che molti dei nuovi neuropeptidi scoperti hanno assunto per aiutare a comprendere alcune risposte dell'organismo non del tutto chiarite. In particolare l'importanza dei neuropeptidi nella ricerca su SNC e sistemi periferici è fondamentale. Il presente lavoro ne è una testimonianza poiché, pur prendendo in esame solo due sistemi peptidici di interesse, ne sottolinea un ruolo come modulatori delle funzioni centrali e periferiche indagate.

Possiamo affermare che i peptidi hanno funzioni finemente regolate ma distinte; si può così ipotizzare che essi non siano utilizzati comunemente in normali circostanze ma che giochino un loro ruolo quando il sistema nervoso sta cercando di adattarsi a diversi tipi di sfide/minacce. Infatti, la soppressione di un gene per un peptide potrebbe avere un effetto non evidenziabile: ciò è interpretabile come dimostrazione dell'esistenza di sistemi compensatori alla base di funzioni comportamentali importanti (quali locomozione, disordini dell'umore e nocicezione). In questo modo, i peptidi potrebbero rappresentare il "linguaggio" del sistema nervoso se viene stressato. Inoltre, i nostri risultati indicano il coinvolgimento di questi sistemi peptidergici anche in periferia e, in particolare, a livello del sistema immunitario e nei meccanismi alla base dell'infiammazione.

Esistono, infatti, numerose patologie che hanno una componente infiammatoria la quale, se presente per lunghi periodi di tempo, può determinare lo sviluppo di effetti avversi, nocivi e dannosi all'organismo. Inoltre, è stata a lunga studiata e dimostrata una stretta relazione fra il sistema immunitario e lo sviluppo di patologie del SNC. Poiché i neuropeptidi risultano avere un ruolo come modulatori e molecole segnale per entrambi i sistemi, abbiamo bisogno di nuovi strumenti per studiare questi sistemi recettoriali, al fine di capirne le funzioni biologiche effettive. A tal fine si utilizzano antagonisti sintetici, specifici per il sistema recettoriale oggetto di studio che possano essere somministrati in acuto. Fortunatamente, i neuropeptidi agiscono su GPCR che sono le proteine più versatili per quanto riguarda il campo delle scoperte farmacologiche. I risultati ottenuti dai diversi gruppi che collaborano sui progetti di ricerca nazionali e internazionali, compreso il nostro, hanno confermato come i sistemi N/OFQ – NOP e NPS – NPSR siano in grado di regolare diverse funzioni biologiche sia centrali che periferiche. L'utilizzo di ligandi di sintesi con funzioni agonista e antagonista (di natura prevalentemente peptidica) dei suddetti recettori ha fortemente influenzato la comprensione della loro modulazione. La disponibilità di tali composti è risultata possibile grazie alle competenze dei nostri collaboratori dell'Università di Ferrara, Prof. Remo Guerrini e Dott. Girolamo Calò, che hanno

sintetizzato e caratterizzato *in vitro* diversi ligandi di entrambi i sistemi, da noi poi valutati dal punto di vista comportamentale e biomolecolare. Il limite dei peptidi è dato dal fatto che essi non possono essere somministrati oralmente dal momento che vengono distrutti dalla digestione. Perciò, la sfida principale è la costruzione di ligandi del recettore peptidergico che resistano alla degradazione catalizzata dalle peptidasi e che possano passare la barriera ematoencefalica (BEE). Questi aspetti rappresentano problemi concreti nel tentativo di utilizzare la modulazione dei meccanismi peptidergici per fini terapeutici.

D'altro canto ad esempio, nel sistema N/OFQ – NOP i composti non peptidici forniti sono risultati efficaci solo in alcune condizioni patologiche (Parkinson, epilessia) ma inefficaci in condizioni meno alterate quali stress e ansia. Questo potrebbe essere motivato dalla diversa struttura dei composti non peptidici che, non possedendo la flessibilità strutturale di quelli peptidici, possono subire alterazioni nell'interazione ligando-recettore. Risulta comunque indispensabile la ricerca di agonisti e soprattutto antagonisti non peptidici in grado di attraversare la BEE da somministrare anche per via sistemica per poter successivamente passare da studi preclinici a trial di tipo clinico. Le mie ricerche hanno confermato evidenze sperimentali di altri studi sul coinvolgimento centrale e periferico dei sistemi N/OFQ – NOP e NPS – NPSR a livello recettoriale nei campi di studio da me indagati e hanno, inoltre, fornito risultati preliminari e originali su alcune funzioni modulate dagli stessi. In conclusione, i recettori NOP e NPSR possono rappresentare utili candidati per lo sviluppo di nuove terapie relative ad ansia, nocicezione e nei processi di chemiotassi e fagocitosi.

7 BIBLIOGRAFIA

- Arduin M, Spagnolo B, Calò G, Guerrini R, Carrà G, Fischetti C, Trapella C, Marzola E, McDonald J, Lambert DG, Regoli D, Salvadori S. Synthesis and biological activity of nociceptin/orphanin FQ analogues substituted in position 7 or 11 with α , α -dialkylated amino acids. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(13):4434-43.
- Badia-Elder NE, Henderson AN, Bertholomey ML, Dodge NC, Stewart RB. The effects of neuropeptide S on ethanol drinking and other related behaviors in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2008; 32(8):1380-7.
- Baranano DE, Ferris CD, Snyder SH. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 2001; 24(2):199-106.
- Beck B, Fernette B, Stricker-Krongrad A. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332(3):859-65.
- Beckett AH, Casy AF. Synthetic analgesics: stereochemical considerations. *J Pharm Pharmacol* 1954; 6(12):986-99.
- Benfenati F, Valtorta F, Matteoli M. La sinapsi e la secrezione dei neurotrasmettitori. *Farmacologia generale e molecolare* 2004; terza edizione 29:431-45.
- Bentacur C, Azzi M, Rostene W. Nonpeptide antagonists of neuropeptide receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18:372-86.
- Bernier V, Stocco R, Bogusky MJ, Joyce JG, Parachoniak C, Grenier K, Arget M, Mathieu MC, O'Neill GP, Slipetz D, Crackower MA, Tan CM, Therien AG. Structure-function relationships in the neuropeptide S receptor: molecular consequences of the asthma-associated mutation N107I. *J Biol Chem* 2006; 281(34):24704-12.
- Berzetei-Gurske IP, Schwartz RW, Toll L. Determination of activity for nociceptin in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol* 1996; 302(1-3):R1-2.
- Besson JM. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. *Drugs* 1997; 53 (Suppl 2):1-9.
- Bigoni R, Giuliani S, Calo' G, Rizzi A, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Maggi CA. Characterization of nociceptin receptors in the periphery: in vitro and in vivo studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359(3):160-7.
- Bockaert J, Claeysen S, Bécamel C, Dumuis A, Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Research* 2006; 326(2):553-72.

- Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 1999; 18(7):1723-29.
- Bonica JJ. Evolution and current status of pain programs. *J Pain Symptom Manage* 1990; 5(6):368-74.
- Brack A, Stein C. The role of the peripheral nervous system in immune cell recruitment. *Exp Neurol* 2003; 184(1):44-9.
- Broccardo M, Guerrini R, Morini G, Polidori C, Agostini S, Petrella C, Improta G. The gastric effects of UFP-112, a new nociceptin/orphanin receptor agonist, in physiological and pathological conditions. *Peptides* 2007; 28(10):1974-81.
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 1994; 347(2-3):284-88.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy D, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O, Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 1988; 336(6201):783-87.
- Burmeister MA, Ansonoff MA, Pintar JE, Kapusta DR. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)-evoked bradycardia, hypotension, and diuresis are absent in N/OFQ peptide (NOP) receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326(3):897-904.
- Calò G, Guerrini G. Medicinal chemistry, pharmacology, and biological actions of peptide ligands selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. Chapter 2012.
- Calò G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Burmeister M, Kapusta DR. UFP-101, a peptide antagonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor, *CNS Drug Rev* 2005; 11(2):97-112.
- Calò G, Guerrini, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br J Pharmacol* 2000; 129 (7):1261-83.
- Calò G, Rizzi A, Bodin M, Neugebauer W, Salvadori S, Guerrini R, Bianchi C, Regoli D. Pharmacological characterization of nociceptin receptor: an in vitro study. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75(6):713-8.
- Calò G, Rizzi A, Bogoni G, Neugebauer V, Salvadori S, Guerrini R, Bianchi C, Regoli D. The mouse vas deferens: A pharmacological preparation sensitive to nociceptin. *Eur J Pharmacol* 1996; 311(1):R3-5.

- Calò G, Rizzi A, Cifani C, Di Bonaventura MV, Regoli D, Massi M, Salvadori S, Lambert DG, Guerrini R. UFP-112 a Potent and Long-Lasting Agonist Selective for the Nociceptin/Orphanin FQ Receptor. *CNS Neurosci Ther* 2011; 17(3):178-98.
- Calò G, Rizzi A, Cifani C, Micioni Di Bonaventura MV, Regoli D, Massi M, Salvadori S, Lambert DG, Guerrini R. *CNS Neurosci & Ther* 2011; 17(3):178-98.
- Calò G, Rizzi A, Rizzi D, Bigoni R, Guerrini R, Marzola G, Marti M, McDonald J, Morari M, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D. [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH₂, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol.* 2002; 136(2):303-11.
- Camarda V, Rizzi A, Ruzza C, Zucchini S, Marzola G, Marzola E, Guerrini R, Salvadori S, Reinscheid RK, Regoli D, Calo G. In vitro and in vivo pharmacological characterization of the neuropeptides S receptor antagonist [D-Cys(tBu)5]NPS. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328(2):549-55.
- Camilleri M, Carlson P, Zinsmeister AR, McKinzie S, Busciglio I, Burton D, Zucchelli M, D'Amato M. Neuropeptide S receptor induces neuropeptide expression and associates with intermediate phenotypes of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2010; 138(1):98-107.
- Cannella N, Economidou D, Kallupi M, Stopponi S, Heilig M, Massi M, Ciccocioppo R. Persistent increase of alcohol-seeking evoked by neuropeptide S: an effect mediated by the hypothalamic hypocretin system. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34(9):2125-34.
- Carra' G, Calo' G, Spagnolo B, Guerrini R, Arduin M, Marzola E, Trapella C, Regoli D, Salvadori S. Tryptophan replacement in the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRWK-NH₂. *J Pept Res* 2005; 66(1):39-47.
- Carrà G, Rizzi A, Guerrini R, Barnes TA, McDonald J, Hebbes CP, Mela F, Kenigs VA, Marzola G, Rizzi D, Gavioli E, Zucchini S, Regoli D, Morari M, Salvadori S, Rowbotham DJ, Lambert DG, Kapusta DR, Calo' G. [(pF)Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-102), a highly potent and selective agonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 312(3):1114-23.
- Caudle RM, Mannes AJ Dynorphin: friend or foe?. *Pain* 2000 Sep;87(3):235-9. Review.
- Cella SE e Müller EE. Neuropeptidi di rilevanza endocrina. *Farmacologia generale e molecolare* 2004; terza edizione 38:558-67.
- Champion HC, Kadowitz PJ. Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, has novel hypotensive activity in the rat. *Life Sci* 1997; 60 (16): PL 241-5.

- Champion HC, Pierce RL, Kadowitz PJ. Nociceptin, a novel endogenous ligand for the ORL1 receptor, dilates isolated resistance arteries from the rat. *Regul Pept* 1998; 78(1-3):69-74.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1993; 44(1):8-12.
- Chung S, Civelli O. Orphan neuropeptides Novel neuropeptides modulating sleep or feeding. *Neuropeptides* 2006; 40(7):233-243.
- Ciccocioppo R, Biondini M, Antonelli L, Wichmann J, Jenck F, Massi M. Reversal of stress- and CRF-induced anorexia in rats by the synthetic nociceptin/orphanin FQ receptor agonist, Ro 64-6198. *Psychopharmacology* 2002; 161(2):113-19.
- Ciccocioppo R, Cippitelli A, Economidou D, Fedeli A, Massi M. Nociceptin/orphanin FQ acts as a functional antagonist of corticotropin-releasing factor to inhibit its anorectic effect. *Physiol Behav* 2004; 82(1):63-68.
- Ciccocioppo R, Economidou D, Cannella N, Fedeli A, Cippitelli A, Calò G, Massi M, Guerrini R. Inhibition of palatable food intake by Neuropeptide S is reversed by its analogue [Ala3]hNPS. 2006 Atlanta, GA: Society for Neuroscience: 809.807/O815.
- Ciccocioppo R, Fedeli A, Economidou D, Policani F, Weiss F, Massi M. The bed nucleus is a neuroanatomical substrate for the anorectic effect of corticotropin-releasing factor and for its reversal by nociceptin/orphanin FQ. *J Neurosci* 2003; 23(28):9445-51.
- Ciccocioppo R, Martin-Fardon R, Weiss F, Massi M. Nociceptin/orphanin FQ inhibits stress- and CRF-induced anorexia in rats. *Neuroreport* 2001; 12(6):1145-49 .
- Cicero TJ, Dart RC, Inciardi, JA, Woody GE, Schnoll S, Munoz A. The development of a comprehensive riskmanagement program for prescription opioid analgesics: researched abuse, diversion and addiction-related surveillance (RADARS) *Pain Med* 2007; 8(2):157-70.
- Civelli O, Nothacker HP, Saito Y, Wang Z, Lin SH, Reinscheid RK. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 2001; 24(4):230-37.
- Civelli O, Saito Y, Wang Z, Nothacker HP, Reinscheid RK. Orphan GPCRs and their ligands. *Pharmacol. Ther* 2005; 110(4):525-32.
- Civelli O. Functional genomics: the search for novel neurotransmitters and neuropeptides. *FEBS Lett.* 1998; 430(1-2):55-58.
- Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 2006; 7(6):539-41.

- Cox BM, Chavkin C, Christie MJ, Civelli O, Evans C, Hamon MD, Hoell V, Kieffer B, Kitchen I, McKnight AT, Meunier JC, Portoghese PS. Opioid receptors. In *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*, second edition ed.; Girdlestone, D., Ed. IUPHAR Media Ltd: London. 2000; pp 321-33.
- Cox BM, Goldstein A, Li CH. Opioid activity of a peptide, β -lipotropin-(61-91), derived from β -lipotropin. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1976; 73(6):1821-23.
- Cullinan JR, Day NC, Schafer MK. Neuroanatomical and functional studies of peptide precursor-processing enzymes. *Enzyme* 1991; 45(5-6):285-300.
- D'Amato M, Bruce S, Bresso F, Zucchelli M, Ezer S, Pulkkinen V, Lindgren C, Astegiano M, Rizzetto M, Gionchetti P, Riegler G, Sostegni R, Daperno M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P, Torkvist L, Puolakkainen P, Lappalainen M, Paavola-Sakki P, Halme L, Farkkila M, Turunen U, Kontula K, Lofberg R, Pettersson S, Kere J. Neuropeptide s receptor 1 gene polymorphism is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 133(3):808-17.
- D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1941; 72(1):74-79.
- Dautzenberg FM, Wichmann J, Higelin J, Py-Lang G, Kratzeisen C, Malherbe P, Kilpatrick GJ, Jenck F. Pharmacological characterization of the novel nonpeptide orphanin FQ/nociceptin receptor agonist Ro 64-6198: rapid and reversible desensitization of the ORL1 receptor in vitro and lack of tolerance in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298(2):812-9.
- del Popolo G, Mencarini M, Nelli F, Lazzeri M. Controversy over the pharmacological treatments of storage symptoms in spinal cord injury patients: a literature overview. *Spinal Cord.* 2012; 50(1):8-13.
- Depner UB, Reinscheid RK, Takeshima H, Brune K, Zeilhofer HU. Normal sensitivity to acute pain, but increased inflammatory hyperalgesia in mice lacking the nociceptin precursor polypeptide or the nociceptin receptor. *Eur J Neurosci* 2003; 17(11):2381-7.
- Devine DP, Taylor L, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Civelli O, Akil H. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem Res.* 1996; 21(11):1387-96.
- Dewey WL, Harris LS, Herves JF, Nuite JA. The effect of various neuro humoral modularors on the activity of morphine and narcotic antagonist in the tail-flick and phenylquinone tests. *J Pharmacol Exp Ther* 1970; 175(2):435-42.

- Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 1986; 321(6065):75-79.
- Dooley CT, Houghten RA. Orphanin FQ: Receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain. *Life Sci* 1996; 59(1):PL23-PL29.
- Dray A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75(6):704-12.
- Dugovic C, Wauquier A, Leysen JE, Marrannes R, Janssen PA. Functional role of 5-HT₂ receptors in the regulation of sleep and wakefulness in the rat. *Psychopharmacology* 1989; 97(4):436-42.
- Dyson HJ, Rance M, Houghten RA, Wright PE, Lerner RA. J Sequence requirements for stabilization of a peptide reverse turn in water solution--proline is not essential for stability. *Mol Biol* 1998; 201(2):201-17.
- Economidou D, Fedeli A, Fardon RM, Weiss F, Massi M, Ciccocioppo R. Effect of novel nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor ligands on ethanol drinking in alcohol-preferring msP rats. *Peptides* 2006; 27(12):3299-306.
- Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N.Y. Acad Sci* 2002; 966:290-303.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve-an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4):595-638.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258(5090):1952-55.
- Evans RM, You H, Hameed S, Altier C, Mezghrani A, Bourinet E, Zamponi GW. Heterodimerization of ORL1 and opioid receptors and its consequences for N-type calcium channel regulation. *J Biol Chem* 2010; 285(2):1032-40.
- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature* 1988; 335(6188):358-60.
- Feng Y, Hong X, Wang L, Jiang S, Chen C, Wang B, Yang J, Fang Z, Zang T, Xu X, Xu X. G protein-coupled receptor 154 gene polymorphism is associated with airway hyperresponsiveness to methacholine in a Chinese population. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117(12):612-17.

- Fernandez F, Misilmeri MA, Felger JC, Devine DP. Nociceptin/orphanin FQ increases anxiety-related behaviour and circulating levels of corticosterone during neophobic tests of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(1):59-71.
- Fine JS, Byrnes HD, Zavodny PJ, Hipkin RW. Evaluation of signal transduction pathways in chemoattractant-induced human monocyte chemotaxis. *Inflammation* 2001; 25(2):61-7.
- Fischetti C, Rizzi A, Gavioli EC, Marzola G, Trapella C, Guerrini R, Petersen JS, Calo G. Further studies on the pharmacological features of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligands ZP120. *Peptides* 2009; 30(2):248-55.
- Florin S, Suaudeau C, Meunier JC, Costentin, J. Orphan neuropeptide NocII, a putative pronociceptin maturation product, stimulates locomotion in mice. *Neuroreport* 1997; 8(3):705-7.
- Gavioli EC, Calo' G. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006; 372(5):319-30.
- Gavioli EC, Duarte FS, Guerrini R, Calo G, Rae GA, M De Lima TC. GABA(A) signalling is involved in N/OFQ anxiolytic-like effects but not in nocistatin anxiogenic-like action as evaluated in the mouse elevated plus maze. *Peptides* 2008; 29(8):1404-12.
- Gavioli EC, Marzola G, Guerrini R, Bertorelli R, Zucchini S, De Lima TC, Rae GA, Salvadori S, Regoli D, Calo G. Blockade of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor signalling produces antidepressant-like effects: pharmacological and genetic evidences from the mouse forced swimming test. *Eur J Neurosci* 2003; 17(9):1987-90.
- Gavioli EC, Rae GA, Calo' G, Guerrini R, De Lima TC. Central injections of nocistatin or its C-terminal hexapeptide exert anxiogenic-like effect on behaviour of mice in the plusmaze test. *Br J Pharmacol* 2002; 136(5):764-72.
- Gavioli EC, Rizzi A, Marzola G, Zucchini S, Regoli D, Calo' G. Altered anxiety-related behavior in nociceptin/orphanin FQ receptor gene knockout mice. *Peptides* 2007; 28(6):1229-39.
- Gavioli EC, Romão PR. NOP Receptor Ligands as Potential Agents for Inflammatory and Autoimmune Diseases. *J Amino Acids* 2011;2011:836569.
- Gavioli EC, Vaughan CW, Marzola G, Guerrini R, Mitchell VA, Zucchini S, De Lima TC, Rae GA, Salvadori S, Regoli D, Calo' G. Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidence from rats and mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 369(6):547-53.

- Giuliani S, Maggi CA. Inhibition of tachykinin release from peripheral endings of sensory nerves by nociceptin, a novel opioid peptide. *Br J Pharmacol* 1996; 118(7):1567-9.
- Giuliani S, Maggi CA. Prejunctional modulation by nociceptin of nerve-mediated inotropic responses in guinea-pig left atrium. *Eur J Pharmacol* 1997; 332(3):231-6.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(12):6666-70.
- Goto Y, Arai-Otsuki S, Tachibana Y, Ichikawa D, Ozaki S, Takahashi H, Iwasawa Y, Okamoto O, Okuda S, Ohta H, Sagara T. Identification of a novel spiropiperidine opioid receptor-like 1 antagonist class by a focused library approach featuring 3D-pharmacophore similarity. *J Med Chem*. 2006; 49(3):847-49.
- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL. Role of amygdale and periaqueductal gray in anxiety and depression. *Behav Brain Res* 1993; 58(1-2):123-31.
- Grossi G, Bargossi A, Sprovieri G, Benagozzi V, Pasquale R. Full automation of serotonin determination by column switching and HPLC. *Chromatographia* 1990; 30(1):61-68.
- Gu H, Hu D, Hong XR, Mao J, Cui Y, Hui N, Sha JY. [Changes and significance of orphanin and serotonin in patients with postpartum depression]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2003; 38(12):727-8.
- Guerrini R, Caló G, Bigoni R, Rizzi D, Rizzi A, Zucchini M, Varani K, Hashiba E, Lambert DG, Toth G, Borea PA, Salvadori S, Regoli D. Structure-activity studies of the Phe(4) residue of nociceptin(1-13)-NH(2): identification of highly potent agonists of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *J Med Chem* 2001; 44(23):3956-64.
- Guerrini R, Calò G, Rizzi A, Bianchi C, Lazarus LH, Salvadori S, Temussi PA, Regoli D. Address and message sequences for the nociceptin receptor: A structureactivity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J Med Chem* 1997; 40(12):1789-93.
- Guerrini R, Camarda V, Trapella C, Calo G, Rizzi A, Ruzza C, Fiorini S, Marzola E, Reinscheid R, Regoli D, Salvadori S. Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 5: Identification of potent and pure NPS receptor antagonists. *J Med Chem* 2009; 52(2):524-29.
- Guerrini R, Salvadori S, Rizzi A, Regoli D, Calò G. Neurobiology, Pharmacology, and Medicinal Chemistry of Neuropeptide S and Its Receptor. *Med Res Rev* 2010; 30(5):751-77.
- Hadrup N, Petersen JS, Praetorius J, Meier E, Graebe M, Brønd L, Staahltoft D, Nielsen S, Christensen S, Kapusta DR, Jonassen TE. Opioid receptor-like 1 stimulation in the

collecting duct induces aquaresis through vasopressin-independent aquaporin-2 downregulation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(1):F160-68.

- Han RW, Chang M, Peng YL, Qiao LY, Yin XQ, Li W, Wang R. Central Neuropeptide S inhibits distal colonic transit through activation of central Neuropeptide S receptor in mice. *Peptides*. 2009; 30(7):1313-7.

- Hanks GW, O'Neill WM, Fallon MT. Paradoxical pain. *BMJ* 1993; 306(6880):793.

- Harvima IT, Nilsson G, Naukkarinen A. Role of mast cells and sensory nerves in skin inflammation. *G Ital Dermatol Venereol* 2010; 145(2):195-204.

- Hawes BE, Graziano MP, Lambert DG. Cellular actions of nociceptin: transduction mechanisms. *Peptides* 2000; 21(7):961-67.

- Homberg JR, Mul JD, de Wit E, Cuppen E. Complete knockout of the nociceptin/orphanin FQ receptor in the rat does not induce compensatory changes in mu, delta and kappa opioid receptors. *Neuroscience* 2009; 163(1):308-15.

- Houtani T, Nishi M, Takeshima H, Nukada T, Sugimoto T. Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219(3):714-19.

- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71(4):533-54.

- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris H-R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258(5536):577-79.

- Inoue M, Kawashima T, Takeshima H, Calo G, Inoue A, Nakata Y, Ueda H. In vivo pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305(2):495-501.

- Inoue M, Kobayashi M, Kozaki S, Zimmer A, Ueda H. Nociceptin/orphanin FQ-induced nociceptive responses through substance P release from peripheral nerve endings in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(18):10949-53.

- Inoue M, Shimohira I, Yoshida A, Zimmer A, Takeshima H, Sakurada T, Ueda H. Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291(1):308-13.

- Inoue T, Tsuchiya K, Koyama T. Regional changes in dopamine and 5-hydroxytryptamine activation with various intensity of physical and psychological stress in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49(4):911-20.

- Ito E, Xie G, Maruyama K, Palmer PP. A core-promoter region functions bi-directionally for human opioid-receptor-like gene ORL1 and its 5'-adjacent gene GAIP. *J Mol Biol.* 2000; 304(3):259-70.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Nothacker HP, Civelli O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(26):14854-58.
- Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM, Moreau JL, Ouagazzal AM, Martin JR, Lundstrom K, Cesura AM, Poli SM, Roever S, Kolczewski S, Adam G, Kilpatrick G. A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(9):4938-43.
- Jüngling K, Seidenbecher T, Sosulina L, Lesting J, Sangha S, Clark SD, Okamura N, Duangdao DM, Xu YL, Reinscheid RK, Pape HC. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron.* 2008; 59(2):298-310.
- Kamei J, Matsunawa Y, Miyata S, Tanaka S, Saitoh A. Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the holeboard test. *Eur J Pharmacol* 2004; 489(1-2):77-87.
- Kapusta DR, Sezen SF, Chang JK, Lipton H, Kenigs VA. Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci* 1997; 60(1):PL15-21.
- Kapusta DR, Thorkildsen C, Kenigs VA, Meier E, Vinge MM, Quist C, Petersen JS. Pharmacodynamic characterization of ZP120 (Ac-RYYRWKKKKKKK-NH₂), a novel, functionally selective nociceptin/orphanin FQ peptide receptor partial agonist with sodiumpotassium-sparing aquaretic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314(2):652-60.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(24):12048-52.
- Ko MC, Naughton NN, Traynor JR, Song MS, Woods JH, Rice KC, McKnight AT. Orphanin FQ inhibits capsaicin-induced thermal nociception in monkeys by activation of peripheral ORL1 receptors. *Br J Pharmacol* 2002; 135(4):943-50.
- Ko MC, Naughton NN. Antinociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ administered intrathecally in monkeys. *J Pain* 2009; 10(5):509-16.
- Ko MC, Wei H, Woods JH, Kennedy RT. Effects of intrathecally administered nociceptin/orphanin FQ in monkeys: behavioral and mass spectrometric studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(3):1257-64.

- Ko MC, Woods JH, Fantegrossi WE, Galuska CM, Wichmann J, Prinssen EP. Behavioral effects of a synthetic agonist selective for nociceptin/orphanin FQ peptide receptors in monkeys. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34(9):2088-96.
- Koob GF, Heinrichs SC. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 1999; 848(1-2):141–152
- Köster A, Montkowski A, Schulz S, Stübe EM, Knautd K, Jenck F, Moreau JL, Nothacker HP, Civelli O, Reinscheid RK. Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(18):10444-49.
- Laitinen T, Polvi A, Rydman P, Vendelin J, Pulkkinen V, Salmikangas P, Makela S, Rehn M, Pirskanen A, Rautanen A, Zucchelli M, Gullsten H, Leino M, Alenius H, Petays T, Haahtela T, Laitinen A, Laprise C, Hudson TJ, Laitinen LA, Kere J. Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science* 2004; 304(5668):300-04.
- Lambert DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(8):694-710.
- Largent-Milnes TM, Vanderah TW. Recently patented and promising ORL-1 ligands: where have we been and where are we going? *Expert Opin Ther Pat* 2010; 20(3):291-305.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53(4):597-652.
- Le Maitre E, Vilpoux C, Costentin J, Leroux-Nicollet I. Opioid receptor-like 1 (NOP) receptors in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for localization on serotonergic neurons and functional adaptation after 5,7-dihydroxytryptamine lesion. *J Neurosci Res* 2005; 81(4):488-96.
- Le Y, Murphy PM, Wang JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol* 2002; 23(11):541-8.
- Leonard SK, Dwyer JM, Sukoff Rizzo SJ, Platt B, Logue SF, Neal SJ, Malberg JE, Beyer CE, Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S, Ring RH. Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacology* 2008; 197(4):601-11.
- Lesch KP. 5HT1A receptor responsivity in anxiety disorders and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 1991; 15(6):723-33.
- Li W, Chang M, Peng YL, Gao YH, Zhang JN, Han RW, Wang R. Neuropeptide S produces antinociceptive effect at the supraspinal level in mice. *Regul Pept* 2009; 156(1-3):9095.

- Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, Simons MJ, Dumont JE, Vassart G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science* 1989; 244 (4904):569-72.
- Liezmann C, Klapp B, Peters E.M. Stress, atopy and allergy: a re-evaluation from a psychoneuroimmunologic perspective. *Dermatoendocrinol* 2011; 3(1):37-40.
- Lin AP, Ko MC. The Therapeutic Potential of Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Agonists as Analgesics without Abuse Liability. *ACS Chem Neurosci*. 2012 Review *in press*.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977; 267(5611):495-99.
- Madeddu P, Salis MB, Milia AF, Emanuelli C, Guerrini R, Regoli D, Calò G. Cardiovascular effects of nociceptin in unanesthetized mice. *Hypertension* 1999; 33(3):914-19.
- Malerba G, Lindgren CM, Xumerle L, Kiviluoma P, Trabetti E, Laitinen T, Galavotti R, Pescolliderung L, Boner AL, Kere J, Pignatti PF. Chromosome 7p linkage and GPR154 gene association in Italian families with allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 2007; 37(1):83-89.
- Manabe T, Noda Y, Mamiya T, Katagiri H, Houtani T, Nishi M, Noda T, Takahashi T, Sugimoto T, Nabeshima T, Takeshima H. Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature* 1998; 394(6693):577-81.
- Mannion RJ, Woolf CJ. Pain mechanisms and management: a central perspective. *Clin J Pain* 2000; 16(3 Suppl):S144-56.
- Marti M, Stocchi S, Paganini F, Mela F, De Risi C, Calò G, Guerrini R, Barnes TA, Lambert DG, Beani L, Bianchi C, Morari M. Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/orphanin FQ receptors modulating 5-hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex. *Br. J. Pharmacol* 2003; 138(1):91-98.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 197(3):517-32.
- Martin-Fardon R, Ciccocioppo R, Massi M, Weiss F. Nociceptin prevents stress-induced ethanol- but not cocaine-seeking behavior in rats. *Neuroreport* 2000; 11(9):1939-43.
- McLeod RL, Tulshian DB, Sadeh J. Where are the new cough treatments: a debriefing of recent clinical proof-of-concept trials with the NOP agonist SCH 486757. *Pharmacology*. 2011; 88(1-2):50-4.

- Meaney M J, Airken DH, van Berkel C. Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 1991; 239(1-3):766-68.
- Melnikova I. "Pain market" *Nat rev drug discov* 2010; 9(8):589-90.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monserrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377(6549):532-35.
- Mignini F, Straccioni V, Amenta F. Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23(1):1-25.
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol* 2003; 70(2):83-244.
- Millan MJ. The neurobiology and control of anxious states. *Prog Neurobiol.* 2003; 70(2):83-244.
- Mogil J S, Pasternak GW. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* 2001; 53(3):381-415.
- Mogil JS, Grisel JE, Reinscheid RK, Civelli O, Belknap JK, Grandy DK. Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience* 1996; 75(2):333-7.
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Lee SE, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Chung JM and Devor, M. Heritability of nociception. II. "Types" of nociception revealed by genetic correlation analysis. *Pain* 1999; 80(1-2):83-93.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 1994; 341(1):33-8.
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(16):8666-70.
- Mustazza C, Bastanzio G. Development of nociceptin receptor (NOP) agonists and antagonists. *Med Res Rev* 2011; 31(4):605-48.
- Nazzaro C, Rizzi A, Salvadori S, Guerrini R, Regoli D, Zeilhofer HU, Calo G. UFP-101 antagonizes the spinal antinociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ: behavioral and electrophysiological studies in mice. *Peptides* 2007; 28(3):663-9.
- Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Akil H, Watson SJ Jr. Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system:

comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 1999; 412(4):563-605.

- Neal CR Jr., Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ Jr. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 1999; 406(4):503-47.

- Nishi M, Houtani T, Noda Y, Mamiya T, Sato K, Doi T, Kuno J, Takeshima H, Nukada T, Nabeshima T, Yamashita T, Noda T, Sugimoto T. Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphaninFQ receptor. *Embo J* 1997; 16(8):1858-64.

- Noble F, Roques BP. Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *FEBS Lett* 1997; 401(2-3):227-29.

- Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr., Watson SJ, Civelli O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(16):8677-82.

- Nutt DJ. Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectr* 2005; 10(1):49-56.

- Okada K, Isozaki K, Li J, Matsushima A, Nose T, Costa T, Shimohigashi Y. Synergistic effect of basic residues at positions 14-15 of nociceptin on binding affinity and receptor activation. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16(20):9261-7.

- Okada K, Sujaku T, Chuman Y, Nakashima R, Nose T, Costa T, Yamada Y, Yokoyama M, Nagahisa A, Shimohigashi Y. Highly potent nociceptin analog containing the Arg-Lys triple repeat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 278(2):493-8.

- Okamura N, Duangdao DM, Reinscheid RK. Neuropeptide S enhances long-term memory formation. *Washington, DC: Society for Neuroscience* 2008; 193:193.192/UU117.

- Okamura N, Hashimoto K, Iyo M, Shimizu E, Dempfle A, Friedel S, Reinscheid RK. Gender-specific association of a functional coding polymorphism in the Neuropeptide S receptor gene with panic disorder but not with schizophrenia or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prog Neuro- Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2007; 31(7):1444-48.

- Okawa H, Nicol B, Bigoni R, Hirst RA, Calo G, Guerrini R, Rowbotham DJ, Smart D, McKnight AT, Lambert DG. Comparison of the effects of [Phe1psi(CH2-

NH)Gly2]nociceptin(1-13)NH₂ in rat brain, rat vas deferens and CHO cells expressing recombinant human nociceptin receptors. *Br J Pharmacol* 1999; 127(1):123-30.

- Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, Yoshihara Y, Nishiuchi Y, Kimura T, Ito S. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature* 1998; 392(6673):286-89.

- Osinski MA, Brown DR. Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides*. 2000; 21(7):999-1005.

- Pan YX, Xu J, Pasternak GW. Cloning and expression of a cDNA encoding a mouse brain orphanin FQ/nociceptin precursor. *Biochem J* 1996; 315(1):11-3.

- Pan YX, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, Pasternak GW. Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. *FEBS Lett* 1998; 435(1):65-8.

- Pan Z, Hirakawa N, Fields HL. A cellular mechanism for the bidirectional pain-modulating actions of orphanin FQ/nociceptin. *Neuron* 2000; 26(2):515-22.

- Pañeda C, Huitron-Resendiz S, Frago LM, Chowen JA, Picetti R, de Lecea L, Roberts AJ. Neuropeptide S reinstates cocaine-seeking behavior and increases locomotor activity through corticotropin-releasing factor receptor 1 in mice. *J Neurosci* 2009; 29(13):4155-61.

- Pasternak G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin Neuropharmacol* 1993; 16(1):1-18.

- Peluso J, LaForge KS, Matthes HW, Kreek MJ, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 1998; 81(1-2):184-92.

- Perone MJ, Windeatt S, Castro MG. Intracellular trafficking of prohormones and proneuropeptides: cell type-specific sorting and targeting. *Exp Physiol* 1997; 82(1551):609-28.

- Peters EM, Liezmann C, Klapp BF, Kruse J. The neuroimmune connection interferes with tissue regeneration and chronic inflammatory disease in the skin. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1262:118-26.

- Pietras CO, Vendelin J, Anedda F, Bruce S, Adner M, Sundman L, Pulkkinen V, Alenius H, D'Amato M, Söderhäll C, Kere J. The asthma candidate gene NPSR1 mediates isoform specific downstream signalling. *J BMC Pulm Med* 2011; 11:39.

- Pinel JPJ, and Treit D. Burying as a defensive response in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1978; 92(4):708-12.

- Portoghese PS. A new concept of the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J. Med Chem* 1965; 8(5):609-16.
- Pradhan L, Nabzdyk C, Andersen ND, LoGerfo FW, Veves A. Inflammation and neuropeptides: the connection in diabetic wound healing. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e2.
- Pulkkinen V, Majuri ML, Wang G, Holopainen P, Obase Y, Vendelin J, Wolff H, Ryttilä P, Laitinen LA, Haahtela T, Laitinen T, Alenius H, Kere J, Rehn M. Neuropeptide S and G protein-coupled receptor 154 modulate macrophage immune responses. *Hum Mol Genet* 2006; 15(10):1667-79.
- Quattrini C, Jeziorska M, Malik RA. Small fiber neuropathy in diabetes: clinical consequence and assessment. *Int J Low Extrem Wounds* 2004; 3(1):16-21.
- Raiteri L, Luccini E, Romei C, Salvadori S, Calò G. Neuropeptide S selectively inhibits the release of 5-HT and noradrenaline from mouse frontal cortex nerve endings. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(3):474-81.
- Ramboz S, Ossting R, Amara DA. Serotonin receptor 1A knock-out: an animal model of anxiety related disorder. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998; 95(24):14476-81.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 1948; 176(3):1243-51.
- Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ Jr, Civelli O. Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J Biol Chem* 1996; 271(24):14163-8.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 1995; 270(5237):792-94.
- Reinscheid RK, Xu YL, Okamura N, Zeng J, Chung S, Pai R, Wang Z, Civelli O. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide S receptor variants. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315(3):1338-45.
- Reinscheid RK, Xu YL. Neuropeptide S and its receptor: A newly deorphanized G protein-coupled receptor system. *Neuroscientist* 2005; 11(6):532-38.
- Reinscheid RK. Phylogenetic appearance of Neuropeptide S precursor proteins in tetrapods. *Peptides* 2007; 28(4):830-37.
- Rex A, Marsden CA, Fink H. Effect of diazepam on cortical 5-HT release and behaviour in the guinea-pig on exposure to the elevated plus maze. *Psychopharmacology* 1993; 110(4):490-96.

- Rizzi A, Calò G, Trevisani M, Tognetto M, Fabbri L, Mapp C, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Geppetti P. Nociceptin receptor activation inhibits tachykinergic non adrenergic non cholinergic contraction of guinea pig isolated bronchus. *Life Sci* 1999; 64(13):PL157-63.
- Rizzi A, Gavioli EC, Marzola G, Spagnolo B, Zucchini S, Ciccocioppo R, Trapella C, Regoli D, Calò G. Pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist SB-612111 [(-)-cis-1-methyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol]: in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321(3):968-74.
- Rizzi A, Marzola G, Bigoni R, Guerrini R, Salvadori S, Mogil JS, Regoli D, Calò G. Endogenous nociceptin signaling and stress-induced analgesia. *Neuroreport* 2001; 12(14):3009-13.
- Rizzi A, Molinari S, Marti M, Marzola G, Calò G. Nociceptin/orphanin FQ receptor knockout rats: in vitro and in vivo studies. *Neuropharmacology* 2011; 60(4):572-9.
- Rizzi A, Nazzaro C, Marzola GG, Zucchini S, Trapella C, Guerrini R, Zeilhofer HU, Regoli D, Calò G. Endogenous nociceptin/orphanin FQ signalling produces opposite spinal antinociceptive and supraspinal pronociceptive effects in the mouse formalin test: pharmacological and genetic evidences. *Pain* 2006; 124(1-2):100-8.
- Rizzi A, Rizzi D, Marzola G, Regoli D, Larsen BD, Petersen JS, Calò G. Pharmacological characterization of the novel nociceptin/orphanin FQ receptor ligand, ZP120: In vitro and in vivo studies in mice. *Br J Pharmacol* 2002; 137(3):369-74.
- Rizzi A, Spagnolo B, Wainford RD, Fischetti C, Guerrini R, Marzola G, Baldisserotto A, Salvadori S, Regoli D, Kapusta DR, Calò G. In vitro and in vivo studies on UFP-112, a novel potent and long lasting agonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Peptides* 2007; 28(6):1240-51.
- Rodi D, Zucchini S, Simonato M, Cifani C, Massi M, Polidori C. Functional antagonism between nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain: evidence for involvement of the bed nucleus of the stria terminalis. *Psychopharmacology* 2008; 196(4):523-31.
- Rogausch H, Del Rey A, Oertel J, Besedovsky HO. Norepinephrine stimulates lymphoid cellmobilization from the perfused rat spleen via beta-adrenergic receptors. *Am J Physiol* 1999; 276(3 Pt 2):R724-730.
- Rosenkranz M.A. Substance P at the nexus of mind and body in chronic inflammation and affective disorders. *Psych Bull* 2007; 133(6):1007-37.

- Rossi B, Constantin G. Anti-selectin therapy for the treatment of inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; 7(2):85-93.
- Roth AL, Marzola E, Rizzi A, Arduin M, Trapella C, Corti C, Vergura R, Martinelli P, Salvadori S, Regoli D, Corsi M, Cavanni P, Calo G, Guerrini R. Structure-activity studies on neuropeptide S: Identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. *J Biol Chem* 2006; 281(30):20809-16.
- Rutten K, De Vry J, Bruckmann W, Tzschentke TM. Pharmacological blockade or genetic knockout of the NOP receptor potentiates the rewarding effect of morphine in rats. *Drug Alcohol Depend* 2011; 114(2-3):253-6.
- Ruzza C, Rizzi A, Camarda V, Pulga A, Marzola G, Filafarro M, Novi C, Ruggieri V, Marzola E, Vitale G, Salvadori S, Guerrini R, Calo' G. [¹Bud-Gly⁵]NPS, a pure and potent antagonist of the neuropeptide S receptor: in vitro and in vivo studies. *Peptides* 2012; 34(2):404-11.
- Ruzza C, Rizzi A, Trapella C, Pela' M, Camarda V, Ruggieri V, Filafarro M, Cifani C, Reinscheid RK, Vitale G, Ciccocioppo R, Salvadori S, Guerrini R, Calo' G. Further studies on the pharmacological profile of the neuropeptide S receptor antagonist SHA 68. *Peptides* 2010; 31(5):915-25.
- Sahuque LL, Kullberg EF, McGeehan AJ, Kinder JR, Hicks MP, Blanton MG, Janak PH, Olive MF. Anxiogenic and aversive effects of corticotropin-releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis in the rat: role of CRF receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 186(1):122-32
- Sandin J, Georgieva J, Silberring J, Terenius L. In vivo metabolism of nociceptin/orphanin FQ in rat hippocampus. *Neuroreport* 1999; 10(1):71-6.
- Schlicker E, Morari M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides* 2000; 21(7):1023-9.
- Schlicker E, Morari M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides* 2000; 21(7):1023-29.
- Sehgal N, Manchikanti L, Smith HS. Prescription opioid abuse in chronic pain: a review of opioid abuse predictors and strategies to curb opioid abuse. *Pain Physician* 2012; 15; ES67-ES92.
- Shah S, Page CP, Spina D. Nociceptin inhibits non-adrenergic non-cholinergic contraction in guinea-pig airway. *Br J Pharmacol* 1998; 125(3):510-6.

- Simonsen U, Laursen BE, Petersen JS. ZP120 causes relaxation by pre-junctional inhibition of noradrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2008; 153(6):1185-94.
- Singh LK, Pang X, Alexacos N, Letourneau R, Theoharides TC. Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: a link to neurogenic skin disorders. *Brain Behav Immun* 1999; 13(3):225-39.
- Smith KL, Patterson M, Dhillon WS, Patel SR, Semjonous NM, Gardiner JV, Ghatei MA, Bloom SR. Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology* 2006; 147(7):3510-8.
- Steinhoff M, Ständer S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol* 2003; 139(11):1479-88.
- Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13(2):139-45.
- Stevens CW. The evolution of vertebrate opioid receptors. *Front Biosci* 2009; 14(1):1247-69.
- Størkson RV, Kjørsvik A, Tjølsen A, Hole K. Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. *J Neurosci Methods* 1996; 65(2):167-72.
- Sullivan MD, Von Korff M, Banta-Green C, Merrill JO, Saunders K. Problems and concerns of patients receiving chronic opioid therapy for chronic non-cancer pain. *Pain* 2010; 149(2):345-53.
- Sundman L, Saarialho-Kere U, Vendelin J, Lindfors K, Assadi G, Kaukinen K, Westerholm-Ormio M, Savilahti E, Mäki M, Alenius H, D'Amato M, Pulkkinen V, Kere J, Saavalainen P. Neuropeptide S receptor 1 expression in the intestine and skin-putative role in peptide hormone secretion. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22(1):79-87.
- Sundstrom G, Dreborg S, Larhammar D. Concomitant duplications of opioid peptide and receptor genes before the origin of jawed vertebrates. *PLoS One* 2010; 5(5):e10512.
- Tancredi T, Guerrini R, Marzola E, Trapella C, Calo G, Regoli D, Reinscheid RK, Camarda V, Salvadori S, Temussi PA. Conformation-activity relationship of neuropeptide S and some structural mutants: Helicity affects their interaction with the receptor. *J Med Chem* 2007; 50(57):4501-08.
- Thompson AA, Liu W, Chun E, Katritch V, Wu H, Vardy E, Huang XP, Trapella C, Guerrini R, Calo G, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Structure of the

nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* 2012; 485(7398):395-99.

- Tian JH, Xu W, Fang Y, Mogil JS, Grisel JE, Grandy DK, Han JS. Bidirectional modulatory effect of orphanin FQ on morphine-induced analgesia: antagonism in brain and potentiation in spinal cord of the rat. *Br J Pharmacol* 1997; 120(4):676-80.

- Toniolo C, Crisma M, Formaggio F, Valle G, Cavicchioni G, Precigoux G, Aubry A, Kamphuis J. Structures of peptides from alpha-amino acids methylated at the alpha-carbon. *Biopolymers*. 1993; 33(7):1061-72.

- Topham CM, Moulédous L, Poda G, Maigret B, Meunier JC. Molecular modelling of the ORL1 receptor and its complex with nociceptin. *Protein Eng.* 1998; 11(12):1163-79.

- Uchiyama H, Yamaguchi T, Toda A, Hiranita T, Watanabe S, Eyanagi R. Involvement of the GABA/benzodiazepine receptor in the axiolytic-like effect of nociceptin/orphanin FQ. *Eur J Pharmacol.* 2008; 590(1-3):185-9.

- Van Furth R, Raeburn JA, Van Zwet TL. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood* 1979; 54(2):485-500.

- Varani K, Calo G, Rizzi A, Merighi S, Toth G, Guerrini R, Salvadori S, Borea PA, Regoli D. Nociceptin receptor binding in mouse forebrain membranes: thermodynamic characteristics and structure activity relationships. *Br J Pharmacol.* 1998; 125(7):1485-90.

- Varani K, Rizzi A, Calo G, Bigoni R, Toth G, Guerrini R, Gessi S, Salvadori S, Borea PA, Regoli D. Pharmacology of [Tyr1]nociceptin analogs: receptor binding and bioassay studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360(3):270-7.

- Varty GB, Hyde LA, Hodgson RA, Lu SX, McCool MF, Kazdoba TM, Del Vecchio RA, Guthrie DH, Pond AJ, Grzelak ME, Xu X, Korfmacher WA, Tulshian D, Parker EM, Higgins GA. Characterization of the nociceptin receptor (ORL-1) agonist, Ro64-6198, in tests of anxiety across multiple species. *Psychopharmacology* 2005; 15(1):1-12.

- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC. The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100(8):4903-08.

- Vendelin J, Pulkkinen V, Rehn M, Pirskanen A, Räisänen-Sokolowski A, Laitinen A, Laitinen LA, Kere J, Laitinen T. Characterization of GPRA, a novel G protein-coupled receptor related to asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 33(3):262-70.

- Vitale G, Arletti R, Ruggieri V, Cifani C, Massi M. Anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ in the elevated plus maze and in the conditioned defensive burying test in rats. *Peptides.* 2006; 27(9):2193-200.

- Vitale G, Filafarro M, Ruggieri V, Pennella S, Frigeri C, Rizza A, Guerrini R, Calò G. Anxiolytic like effect of neuropeptide S in the rat defensive burying. *Peptides* 2008; 29(12):2286-2291.
- Vitale G, Ruggieri V, Filafarro M, Frigeri C, Alboni S, Tascetta F, Brunello N, Guerrini R, Cifani C, Massi M. Chronic treatment with the selective NOP receptor antagonist [Nphe 1, Arg 14, Lys 15]N/OFQ-NH₂ (UFP-101) reverses the behavioural and biochemical effects of unpredictable chronic mild stress in rats. *Psychopharmacology* 2009; 207(2):173-89.
- Wang HL, Hsu CY, Huang PC, Kuo YL, Li AH, Yeh TH, Tso AS, Chen YL. Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and mu-opioid receptors impairs the potency of micro receptor agonist. *J Neurochem* 2005; 92(6):1285-94.
- Watanabe Y, Sakai RR, McEwan BS. Stress and antidepressant effects on hippocampal and cortical 5HT_{1A} and 5HT_{2A} receptors and transport sites for serotonin. *Brain Res* 1993; 615(1):87-94.
- Wright IK, Upton N, Marsden CA. Effect of established and putative anxiolytics on extracellular 5-HT and 5-HIAA in the ventral hippocampus of rats during behaviour on the elevated X-maze. *Psychopharmacology* 1992; 109(3):338-46.
- Wrona D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 2006; 172(1-2):38-58.
- Xu YL, Gall CM, Jackson VR, Civelli O, Reinscheid RK. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 2007; 500(1):84-102.
- Xu YL, Reinscheid RK, Huitron-Resendiz S, Clark SD, Wang Z, Lin SH, Brucher FA, Zeng J, Ly NK, Henriksen SJ, de Lecea L, Civelli O. Neuropeptide S: A neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron* 2004; 43(4):487-97.
- Yaksh TL. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1999; 20(8):329-37.
- Yao Y, Lin X, Su J, Yang G, Hou Y, Lei Z. Cloning and distribution of neuropeptide S and its receptor in the pig. *Neuropeptides* 2009; 43(6):465-81.
- Yao Y, Su J, Yang G, Zhang G, Lei Z, Zhang F, Li X, Kou R, Liu Y, Liu J. Effects of neuropeptide S on the proliferation of splenic lymphocytes, phagocytosis, and proinflammatory cytokine production of pulmonary alveolar macrophages in the pig. *Peptides* 2011; 32(1):118-24.

- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(14):6736-40.
- Zaveri NT, Waleh N, Toll L. Regulation of the prepronociceptin gene and its effect on neuronal differentiation. *Gene*. 2006; 384:27-36.
- Zeilhofer HU, Calò G. Nociceptin/orphanin FQ and its receptor--potential targets for pain therapy? *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(2):423-9.
- Zhang C, Miller W, Valenzano KJ, Kyle DJ. Novel, potent ORL-1 receptor agonist peptides containing alpha-Helix-promoting conformational constraints. *J Med Chem* 2002; 45(24):5280-6.
- Ziemssen T, Kern S. Psychoneuroimmunology-cross-talk between the immune and nervous systems. *J Neurol* 2008; 255(2):309-10.