



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento di Psicologia  
Via dei Marsi, 78  
00185 Roma (Italy)

## TESI DI DOTTORATO

---

**“Nuovi trattamenti per il dolore infiammatorio e  
neuropatico”**

**di Stefano Cobianchi**



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Neuroscienze  
Via del Fosso di Fiorano, 64  
00143 Roma (Italy)



Visto da:

Coordinatore del dottorato:

**Prof. Franco Mangia**

Tutor interno:

**Prof. Andrea Mele**

Tutor esterni:

**Dr. Flaminia Pavone**

**Dr. Siro Luvisetto**



Questa tesi di dottorato è il frutto dell'attività di ricerca da me svolta dal 2006 al 2009 all'interno dell'Istituto di Neuroscienze del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) di Roma.

Vorrei ringraziare anzitutto la Dr.sa Flaminia Pavone e il Dr. Siro Luvisetto per avermi dato l'opportunità di far parte del loro gruppo e di avere un'importantissima esperienza di vita, oltre che di lavoro insieme a loro. La mia speranza è quella che ciò che in me hanno seminato, dia nel futuro dei buoni frutti.

Vorrei ringraziare in modo speciale la Dr.sa Sara Marinelli, come insegnante e come amica, per essere stata sempre disponibile durante tutta questa lunga esperienza.

Grazie anche alla Dr.sa Cecilia Eleuteri e alla Dr.sa Valentina Vacca, e a tutti i ragazzi dell'Istituto di Neuroscienze, per avermi accompagnato nell'attività di ricerca, e per aver reso questa un'esperienza indimenticabile. Va menzionato che parte del lavoro svolto in questa tesi è merito di Sara, Cecilia e Valentina.

Un ringraziamento particolare va al Dr. Fulvio Florenzano, senza il quale non sarei stato in grado di imparare tutto ciò che nella tesi riguarda le tecniche di immunofluorescenza e la microscopia confocale.

Grazie anche al Prof. Andrea Mele per la sua estrema disponibilità e per i consigli preziosi.

Infine, vorrei dire grazie con tutto il cuore ai miei genitori, per avermi sostenuto in tutti questi anni, e a Silvia per aiutarmi in ogni momento: a voi voglio dedicare questa tesi.

*"Nessuno che ti abbia preso del tempo si sente tuo debitore.  
Eppure il tempo è l'unica cosa che nemmeno l'uomo più generoso  
del mondo sarà mai in grado di restituirti." (Seneca)*



# INDICE

|   |                |
|---|----------------|
| <b>1. INTRODUZIONE.....</b>   | <b>pag.9</b>   |
| 1.1. Cos'è il dolore?.....  | pag.11         |
| 1.2. Neurobiologia del dolore.....  | pag.13         |
| 1.3. L'iperalgia infiammatoria.....   | pag.19         |
| 1.4. Meccanismi di sensitizzazione centrale.....  | pag.24         |
| 1.5. Il dolore neuropatico.....   | pag.27         |
| 1.6. Modelli animali del dolore.....  | pag.39         |
| 1.7. La terapia attuale del dolore.....   | pag.49         |
| 1.8. Le neurotossine botuliniche (BoNTs).....   | pag.58         |
| 1.8.1. <i>Le BoNTs per il trattamento del dolore.....</i>   | <i>pag.67</i>  |
| 1.9. La riabilitazione clinica delle neuropatie periferiche.....  | pag.74         |
| 1.10. L'esercizio fisico e locomozione al treadmill.....  | pag.78         |
| 1.10.1. <i>Effetti sul recupero funzionale.....</i>   | <i>pag.79</i>  |
| 1.10.2. <i>Stimolazione della rigenerazione nervosa.....</i>  | <i>pag.82</i>  |
| 1.10.3. <i>Fattori neurotrofici e proteine mieliniche.....</i>  | <i>pag.85</i>  |
| 1.10.4. <i>Esercizio al treadmill e dolore neuropatico.....</i>   | <i>pag.89</i>  |
| <b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>   | <b>pag.99</b>  |
| 2.1. Nuovi trattamenti per il dolore.....   | pag.101        |
| 2.2. Le neurotossine botuliniche (BoNTs) per il dolore<br>infiammatorio.....  | pag.103        |
| 2.3. Le neurotossine botuliniche (BoNTs) per il dolore<br>neuropatico.....  | pag.105        |
| 2.4. L'esercizio fisico al treadmill nel trattamento del dolore<br>neuropatico.....                                   | pag.107        |
| <b>3. MATERIALI E METODI.....</b>   | <b>pag.111</b> |
| 3.1. Materiali e metodi.....  | pag.113        |
| 3.1.1. <i>Animali.....</i>  | <i>pag.113</i> |
| 3.1.2. <i>Sostanze.....</i>   | <i>pag.113</i> |
| 3.2. <b>Esperimento 1 - Effetti delle BoNTs nel modello di dolore<br/>    infiammatorio indotto da formalina.....</b> | <b>pag.115</b> |
| 3.2.1. <i>Procedura chirurgica.....</i>   | <i>pag.115</i> |
| 3.2.2. <i>Somministrazione delle sostanze.....</i>  | <i>pag.116</i> |

|             |  |                |
|-------------|--|----------------|
| 3.2.3.      | <i>Test della formalina</i> .....  | pag.117        |
| 3.2.4.      | <i>Analisi dei dati</i> .....  | pag.118        |
| <b>3.3.</b> | <b>Esperimento 2 - Effetti della BoNT/A in un modello di dolore neuropatico</b> .....  | <b>pag.119</b> |
| 3.3.1.      | <i>Procedura chirurgica</i> .....  | pag.119        |
| 3.3.2.      | <i>Gruppi sperimentali</i> .....   | pag.119        |
| 3.3.3.      | <i>Allodinia meccanica</i> .....   | pag.121        |
| 3.3.4.      | <i>Incapacitance test</i> .....  | pag.121        |
| 3.3.5.      | <i>Walking track analysis</i> .....  | pag.122        |
| 3.3.6.      | <i>Istologia e saggi d'immunofluorescenza</i> .....  | pag.123        |
| 3.3.7.      | <i>Analisi dei dati</i> .....  | pag.125        |
| <b>3.4.</b> | <b>Esperimento 3 - Effetti dell'esercizio fisico al treadmill sul dolore neuropatico e sul recupero funzionale dopo una lesione nervosa periferica</b> ..... | <b>pag.126</b> |
| 3.4.1.      | <i>Procedura chirurgica</i> .....  | pag.126        |
| 3.4.2.      | <i>Esercizio fisico al treadmill</i> .....   | pag.126        |
| 3.4.3.      | <i>Gruppi sperimentali</i> .....   | pag.128        |
| 3.4.4.      | <i>Allodinia meccanica</i> .....   | pag.128        |
| 3.4.5.      | <i>Incapacitance test</i> .....  | pag.129        |
| 3.4.6.      | <i>Walking track analysis</i> .....  | pag.129        |
| 3.4.7.      | <i>Istologia e saggi d'immunofluorescenza</i> .....  | pag.129        |
| 3.4.8.      | <i>Analisi statistica</i> .....  | pag.132        |
| <b>4.</b>   | <b>RISULTATI</b> .....   | <b>pag.133</b> |
| 4.1.        | Risultati dell' Esperimento 1.....   | pag.135        |
| 4.2.        | Risultati dell' Esperimento 2.....   | pag.141        |
| 4.3.        | Risultati dell' Esperimento 3.....   | pag.154        |
| <b>5.</b>   | <b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....   | <b>pag.169</b> |
| 5.1.        | Esperimento 1: discussione e conclusioni.....  | pag.171        |
| 5.2.        | Esperimento 2: discussione e conclusioni.....  | pag.177        |
| 5.3.        | Esperimento 3: discussione e conclusioni.....  | pag.182        |
| <b>6.</b>   | <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....  | <b>pag.187</b> |



## **Capitolo 1**

---

### **INTRODUZIONE**



## 1.1 – Cos'è il dolore?

---

Secondo la definizione della IASP (International Association for the Study of Pain), il dolore è un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale, in atto o potenziale, o descritta in termini di danno. Esso non può essere descritto veramente come un fenomeno sensoriale, bensì deve essere visto come la composizione 1) di una parte percettiva (definita *nocicezione*), che costituisce l'aspetto neurobiologico del dolore, e prevede la modalità sensoriale che permette la ricezione ed il trasporto al sistema nervoso centrale di stimoli potenzialmente lesivi per l'organismo, e 2) di una parte esperienziale (quindi del tutto privata, la vera e propria esperienza del dolore), che è lo stato psichico collegato alla percezione di una sensazione spiacevole. Nell'uomo l'esperienza del dolore è perciò determinata anche dalla dimensione affettiva e cognitiva, dalle esperienze passate, dalla struttura psichica e da fattori socio-culturali.

Il dolore è fisiologico, un sintomo vitale/esistenziale, un sistema di difesa, quando rappresenta un segnale d'allarme per una lesione tissutale, essenziale per evitare un danno. Diventa patologico quando si automantiene, perdendo il significato iniziale e diventando a sua volta una malattia (sindrome dolorosa) (Mannion & Woolf, 2000). Il dolore che va aldilà della funzione di allarme è spesso rappresentato dal dolore di tipo cronico, fortemente invalidante per l'individuo. Il solo dolore neuropatico attualmente ha un impatto su più di 15 milioni di persone in Europa e negli USA da soli (fonte: NeuPSIG).

La ricerca di nuovi trattamenti per il dolore, in questo senso, assume fondamentale importanza in diverse dimensioni:

- per la ricerca di base, nella comprensione dei meccanismi di base del dolore e dei fenomeni neurobiologici ad esso correlati;
- per la ricerca clinica, nello sforzo di formulare disegni terapeutici più accurati ed efficaci per i pazienti;
- per la sanità pubblica, nella prospettiva di ridurre gli enormi costi della terapia del dolore;
- ultima, ma più importante di tutte, per migliorare la qualità della vita dell'individuo sofferente, spesso a lungo impossibilitato a trovare un rimedio efficace contro la propria sofferenza.

## 1.2 - Neurobiologia del dolore

---

Il dolore, come ogni percezione, risulta da una specifica attività neurologica, spazio-temporale, all'interno della corteccia cerebrale. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, il dolore è iniziato da eventi che accadono nella pelle, o nei tessuti profondi come le viscere, le ossa o i muscoli.

Fibre afferenti che rispondono a stimoli di bassa intensità in genere decodificano percetti innocui come un tocco o una sensazione di caldo o di freddo. Fibre afferenti che rispondono a stimoli ad elevate intensità invece decodificano la sensazione di dolore. La sensazione di un tocco viene segnalata dall'attività di afferenti mielinici che sono sensibili a leggere piccole deformazioni della pelle (Caterina et al. 2005). Questi meccanorecettori cutanei a bassa soglia sono stati differenziati per la loro risposta in base all'innervazione nella pelle con l'organo o struttura finale associato con il loro terminale. Gli afferenti di tipo 1 a lento adattamento terminano nelle cellule di Merkel, mentre gli afferenti di tipo 2 a lento adattamento, si pensa che terminino nei corpuscoli di Ruffini. Invece gli afferenti ad adattamento rapido terminano nei corpuscoli di Meissner o circondano i follicoli piliferi. Gli afferenti paciniani terminano nei corpuscoli di Pacini e rispondono bene ad elevate frequenze di vibrazione. Questi meccanorecettori afferenti a bassa soglia decodificano differenti aspetti della sensazione tattile, come la tessitura e la forma.

Una larga popolazione di fibre afferenti possiede un'elevata soglia di attivazione e risponde preferibilmente a stimoli intensi e nocivi. Queste fibre afferenti sono chiamate *nocicettori*, e controllano

costantemente l'ambiente circostante i loro terminali. Questi neuroni rispondono selettivamente e rapidamente a stimoli meccanici, termici o chimici, che hanno un'intensità sufficiente a causare un danno del tessuto, o di una qualità che indica un danno tissutale esistente. Al contrario dei normali recettori, i nocicettori sono polimodali, ovvero possono essere attivati da diversi tipi di stimoli che possono produrre dolore, come un forte calore, uno stimolo meccanico intenso, o da vari agenti chimici. Essi vengono classificati rispetto a tre criteri fisiologici: 1) la velocità di conduzione, 2) il tipo di stimolo che evoca la risposta 3) le caratteristiche temporali della risposta allo stimolo. In base a queste caratteristiche si distinguono:

- *Fibre C* nocicettive meccaniche e termiche: sono fibre afferenti amieliniche che rispondono a stimoli meccanici e termici (CMHs). Le loro soglie meccaniche e termiche sono sostanzialmente più elevate di quelle dei meccanorecettori a bassa soglia e delle fibre del calore descritte sopra. La maggior parte delle CMHs risponde anche ad agenti chimici e possono quindi essere considerate polimodali. Le CMHs si attivano per stimoli di temperatura di circa 45°C , e da questa soglia in poi la loro attività correla con il giudizio umano di “dolore bruciante” (Meyer e Campbell, 1981). La lunga latenza della sensazione di dolore bruciante sulla pelle glabra della mano è inoltre consistente con la lenta velocità di conduzione delle fibre C periferiche (Campbell e LaMotte, 1983).

- *Fibre A* nocicettive: sono nocicettori che evocano sensazioni dolorose quali quelle generate da punture, traumi e malesseri indotti da forti stimolazioni. Esistono tre distinti tipi di fibre A. Le fibre del tipo I e del tipo II rispondono tipicamente a calore e a stimoli meccanici e chimici, e sono anch'essi recettori polimodali (AMHs). Un altro gruppo di fibre A non risponde a

stimoli termici; queste fibre sono state chiamate meccanorecettori a soglia elevata (HTMs). La soglia del calore per le fibre A nocicettive di tipo II è elevata, in genere intorno ai 47°C; esse rispondono a stimoli di breve durata (meno di un sec), e sono presenti nella pelle glabra e pelosa, e hanno una soglia meccanica relativamente bassa (5 bars). Le fibre di tipo I rispondono vigorosamente dopo una stimolazione di calore maggiore di 53°C, più prolungata nel tempo. La loro risposta ad uno stimolo di calore mantenuto si adatta velocemente, e in contrasto alla loro bassa soglia per il calore, esse hanno una soglia meccanica relativamente alta (15 bars), spesso non rispondendo proprio agli stimoli meccanici. Le fibre di tipo II si trovano solamente nella pelle pelosa.

- Recentemente, è stata posta una grande attenzione su una classe di nocicettori con soglia meccanica molto alta (> di 6 bars) (Schmidt et al., 1995). Questi afferenti meccanicamente insensitivi (MIAs) sono stati anche chiamati “nocicettori silenziosi” poiché sembra che diventino sensibili preferenzialmente a seguito di una lesione. La maggioranza delle fibre A di tipo II sono MIAs, mentre la maggioranza delle fibre A di tipo I sono nocicettori meccanicamente sensibili (MSAs).

Una lesione cutanea induce la formazione di una vasta area di vasodilatazione o *flare*, che circonda la ferita. Si pensa che questo *flare* sia dovuto ad un riflesso assonale periferico nelle fibre nocicettive: la lesione attiva una ramificazione del nocicettore terminale, portando alla propagazione ortodromica del potenziale di azione attraverso gli assoni connessi, e alla propagazione antidromica attraverso le altre ramificazioni (Caterina et al. 2005). I potenziali di azione antidromici inducono il rilascio dei neuropeptidi vasoattivi (come la sostanza P e il CGRP) che si trovano nei terminali dei nocicettori.

La diversità funzionale esibita dai neuroni nocicettivi riflette una corrispondente diversità nei meccanismi attraverso i quali gli stimoli nocivi che sollecitano i loro terminali vengono trasdotti in una depolarizzazione di membrana. Differenti proteine di membrana rispondono a stimoli chimici, termici e meccanici, con un'elevata e specializzata capacità sensoriale.

Come già menzionato, una lesione ad un tessuto determina la produzione e la liberazione di diversi tipi di ioni, nucleotidi, lipidi, peptidi, aminoacidi derivati e proteine, capaci di attivare i nocicettori o di aumentare la loro risposta a uno stimolo meccanico o termico. Studi elettrofisiologici e farmacologici su colture di neuroni nocicettivi dissociati hanno rivelato che taluni agenti chimici (es. protoni e capsaicina) depolarizzano direttamente i neuroni nocicettivi attraverso l'apertura di canali ionici permeabili al sodio e/o al calcio. D'altra parte, agenti come la bradichinina e NGF agiscono rispettivamente su recettori accoppiati a proteine G e su recettori per la tirosin-kinasi, iniziando una cascata di segnali intracellulari che sensitizza i canali ionici depolarizzati e i loro regolatori chimici o fisici. Anche altre sostanze (come glutammato, acetilcolina e ATP) attivano sia i canali ionici che i recettori accoppiati a proteine G, producendo una varietà di effetti sia diretti che indiretti sul potenziale di membrana dei nocicettori.

Molte delle sostanze chimiche presenti nei terminali dei nocicettori dopo lesione nervosa o infiammazione, modulano l'attività neuronale attraverso la loro azione su recettori "metabotropici" accoppiati a proteine G eterotrimeriche intracellulari. Esempi di queste sostanze sono la bradichinina, la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), e alcuni tipi di proteasi. L'occupazione dei recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) innesca la dissociazione della subunità alfa dell'eterotrimerico della proteina



G, il legame di GTP, e la dissociazione della subunità alfa dalle subunità beta e gamma. Come conseguenza, la subunità alfa attivata e il dimero beta/gamma vanno ciascuno a interagire con una diversa matrice di proteine target a valle, che includono canali ionici, enzimi come l'adenilil ciclasi e la fosfolipasi C, e altre molecole. La risultante attivazione della protein chinasi A e C (PKA, PKC), e il rilascio di secondi messaggeri come AMP ciclico, ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , PGE<sub>2</sub>, e leucotrieni, possono esercitare profondi effetti sui canali ionici espressi nei terminali dei nocicettori.

Tra i più importanti regolatori dell'eccitabilità dei nocicettori ci sono le *neurotrofine*. Questi polipeptidi si suddividono in due classi generali: la famiglia dei fattori di crescita nervosa (NGF, BDNF, NT3, NT4/5) e la famiglia delle neurotrofine derivate dalla linea cellulare delle cellule gliali (GDNF, artemeina, persefrina, neurturina). Ciascuna di queste due classi di neurotrofine si lega a una corrispondente classe di neurotrofine proteine recettori dalla superficie cellulare di più subunità. L'attivazione risultante dei domini della tirosin chinasi su questi recettori porta alla stimolazione coordinata di diversi enzimi intracellulari, inclusa la fosfolipasi C e il fosfatidilinositolo 3-chinasi. Attraverso questi percorsi di segnale, le neurotrofine giocano un ruolo critico nello sviluppo e nella sopravvivenza dei neuroni nocicettivi. D'altra parte, tuttavia, esse possono aumentare acutamente l'eccitabilità dei nocicettori e la trasduzione del segnale nocicettivo. Di questo duplice ruolo delle neurotrofine, si discuterà ulteriormente in seguito.

Anche le *citochine* della famiglia delle interleuchine, i cui recettori attivano le molecole intracellulari di segnalazione del percorso JAK/STAT, possono sensibilizzare acutamente i neuroni nocicettivi.



### 1.3 - L'iperalgesia infiammatoria

---

Una lesione a un tessuto, e la conseguente infiammazione, portano a un aumento dello stato di dolore chiamato *iperalgesia*. L'iperalgesia è caratterizzata da un abbassamento della soglia per il dolore, e incrementa il dolore evocato da stimoli sopra la soglia. L'*allodinia* corrisponde all'abbassamento della soglia del dolore in modo che uno stimolo che normalmente non produce dolore (es. un lieve tocco) diviene doloroso. Il correlato neurofisiologico dell'iperalgesia è la *sensitizzazione*. La sensitizzazione è caratterizzata da uno spostamento a sinistra della funzione stimolo-risposta che correla la magnitudine della risposta all'intensità dello stimolo. La sensitizzazione dei nocicettori afferenti primari viene indotta dall'iperalgesia primaria che occorre nel sito della lesione e nelle aree circostanti. La sensitizzazione nel SNC, invece, è da relazionare all'iperalgesia secondaria che avviene nel tessuto non lesionato che circonda il sito della lesione (Raja et al. 1999).

L'*iperalgesia primaria* sembra essere principalmente dovuta alla sensitizzazione dei nocicettori afferenti primari. Per esempio, entro pochi minuti da una lesione da bruciatura sulla pelle si sviluppa una marcata iperalgesia per gli stimoli caldi. Una lesione da bruciatura produce inoltre una marcata sensitizzazione al calore da parte delle fibre A e delle fibre C nocicettive. A seguito di iniezione di mediatori infiammatori all'interno dei loro campi recettivi, sia le fibre A che le fibre C nocicettive iniziano a sensitizzarsi per gli stimoli meccanici. I maggiori cambiamenti di soglia si hanno per gli afferenti meccanicamente insensitivi (MIAs), i quali possono non essere responsivi agli stimoli

meccanici prima dell'infiammazione, ma marcatamente sensitizzati ad essi con il suo instaurarsi.

Come già detto, l'infiammazione porta alla produzione dinamica, al rilascio e alla distruzione di numerose sostanze chimiche capaci di produrre la scarica spontanea dei nocicettori, lo spostamento della soglia per l'attivazione dei nocicettori, e l'incremento della responsività di questi neuroni agli stimoli meccanici e termici normalmente nocivi. Esempi includono il rilascio di protoni dai leucociti infiltrati in fase di metabolismo anaerobico, la produzione e il rilascio di prostaglandine dalle membrane fosfolipidiche consecutivo all'induzione di cicloossigenasi mediata dalla lesione, e il taglio del peptide bradichinina, indotto dalla lesione, dal suo precursore chininogeno. L'importanza dei mediatori chimici per l'iperalgia infiammatoria è stata illustrata da numerosi studi, che hanno dimostrato come l'eliminazione genetica o farmacologica o l'antagonismo di queste sostanze riduca l'iperalgia prodotta in risposta agli iniziatori chimici dell'infiammazione, come la carragenina o l'acido urico.

Un meccanismo maggiore che è indotto dall'iperalgia infiammatoria termica e meccanica è il cambiamento della localizzazione sottocellulare, del livello di espressione e dell'eccitabilità dei canali ionici coinvolti nella trasduzione del segnale nocicettivo.

Un secondo modo in cui l'infiammazione può aumentare la nocicezione, è attraverso la facilitazione di questi stessi passi nella neurotrasmissione, che seguono la depolarizzazione della membrana da parte degli stimoli nocicettivi. E' stato identificato un certo numero di canali ionici che sembrano contribuire in una forma o in un'altra alla sensitizzazione indotta dall'infiammazione e all'iperalgia. Questi includono i canali  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti, i canali  $\text{K}^+\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti, e i canali  $\text{Ih}$

(Gold, 2001). Il contributo specifico alla sensitizzazione dei nocicettori di ciascuno di questi canali varia in accordo al loro ruolo nel controllo dell'eccitabilità neuronale (Gold, 2001).

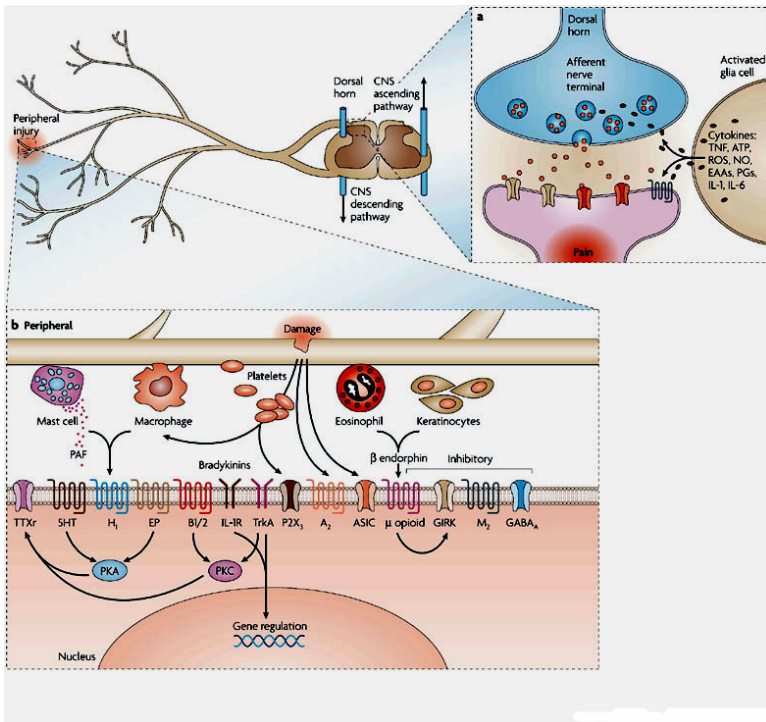
Una classe di canali  $\text{Na}^+$  in particolare, il canale voltaggio-dipendente del sodio resistente alla tetrodotossina (TTX-r), può essere preso a esempio dei principi che governano il contributo dei canali ionici alla sensitizzazione dei nocicettori, sia poiché esso è espresso solamente nei neuroni sensoriali e primariamente negli afferenti nocicettivi, e sia poiché è direttamente coinvolto nell'iniziazione e nel mantenimento dell'iperalgia infiammatoria (Gold, 1999). L'aumento della funzione del canale TTX-r indotto dall'infiammazione è il risultato di alcuni distinti processi modulatori. Anzitutto, i mediatori infiammatori come PGE<sub>2</sub>, serotonina e adenosina, inducono nei neuroni sensoriali una modulazione dei TTX-r, incrementandone la conduttanza massima e la percentuale di attivazione, e determinando uno spostamento di iperpolarizzazione del voltaggio di attivazione. Questi cambiamenti successivamente risultano in un incremento dell'ammontare della corrente di depolarizzazione che occorre in risposta alla depolarizzazione di membrana, che abbasserà sia la soglia del potenziale d'azione, che la magnitudine del potenziale generatore necessario per evocare un potenziale di azione (Gold, 1999). La modulazione dei TTX-r indotta dai mediatori infiammatori induce la diretta fosforilazione della subunità  $\alpha$  del canale: questo processo dipende infatti dall'attivazione della PKA e/ della PKC. Inoltre, essa viene bloccata dagli oppioidi (Gold, 1999).

Un incremento dell'espressione dei canali TTX-r contribuisce al mantenimento dell'iperalgia infiammatoria e della sensitizzazione dei nocicettori. Entro 3 giorni dall'infiammazione, è rilevabile un incremento dell'espressione di mRNA codificante i

canali Nav1.8 (Tanaka et al. 1998). Questo cambiamento di espressione sembra riflettere l'azione di numerosi mediatori rilasciati in presenza di infiammazione e trasportati indietro al corpo della cellula neuronale. Il più studiato tra questi mediatori è l'NGF. Questa neurotrofina induce cambiamenti sia trascrizionali che non-trascrizionali negli afferenti sia nocicettivi che non-nocicettivi. L'espressione dei Nav1.8 è in parte regolata dall'NGF, in modo che un incremento o un decremento di NGF risultino rispettivamente in un incremento o un decremento nell'espressione dei Nav1.8.

In conclusione, la nocicezione coinvolge l'attivazione di una diversa popolazione di neuroni sensoriali specializzate che sono quantitativamente e qualitativamente sintonizzate sugli stimoli chimici, termici e meccanici. Attivando direttamente i canali ionici situati sui terminali dei nocicettori, o attivando i recettori accoppiati a proteine G o le neurotrofine, che indirettamente modulano l'attività dei canali ionici, questi stimoli evocano la depolarizzazione dei nocicettori. La seguente iniziazione dei potenziali d'azione, la loro trasmissione alla colonna spinale, e il rilascio di glutammato e altri neurotrasmettitori all'interno del corno dorsale del midollo spinale, sono mediati da altri gruppi di canali del sodio, del potassio e del calcio, molti dei quali sono voltaggio-dipendenti (Figura 1).

**Figura 1.** Stimoli nocivi, lesioni tissutali e infiammazione acuta attivano specifici recettori specializzati, e inviano l'informazione afferente al corno dorsale del midollo spinale, dove la trasmissione sinaptica verso le vie ascendenti è soggetta a modulazione dalle vie discendenti, da circuiti neuronali locali e da una varietà di agenti neurochimici. **a** | Modulazione neurochimica della trasmissione sinaptica nel corno dorsale, con esempi di recettori postsinaptici e canali ionici che sono attivati da aminoacidi eccitatori rilasciati presinapticamente e sensitizzati dalle citochine provenienti dalle cellule gliali attivate a seguito di lesione nervosa. **b** | Mediatori periferici della trasduzione del dolore dopo



lesione nervosa: l'infiammazione porta al rilascio di numerosi agenti chimici da mastociti, macrofagi e cellule lesionate, che agiscono direttamente o indirettamente alterando la sensibilità dei recettori e dei canali ionici sui terminali dei nervi periferici. Questi recettori rilasciano messaggeri secondari come PKA e PKC, che possono attivare altri recettori di legame di membrana, e la trascrizione genica. A<sub>2</sub>: recettore dell'adenosina A<sub>2</sub>; ASIC: canali sensibili agli acidi; B1/2: recettore della bradichinina 1 e 2; CNS: sistema nervosa centrale; EAAs: aminoacidi eccitatori; EP: recettore della prostaglandina E; GABA: acido  $\gamma$ -aminobutirico; GIRK: G-protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup>; H<sub>1</sub>: recettore dell'istamina H<sub>1</sub>; 5-HT: 5-idrossitriptamina (serotonina); IL: interleuchina; IL-1R: recettore dell'interleuchina 1; M<sub>2</sub>: recettore muscarinico M<sub>2</sub>; NO: ossido nitrico; P2X<sub>3</sub>: recettore purinergico X<sub>3</sub>; PAF: platelet-activating factor; PGs: prostaglandine; ROS: reactive oxygen species; TNF: fattore di necrosi tumorale; TTXr: recettore della tetrodotossina; TrkA, recettore della tirosin chinasi A (da Woodcock et al., 2007).

## 1.4 – Meccanismi di sensitizzazione centrale

---

Il dolore fisiologico è iniziato nei terminali periferici dei nocicettori localizzati nelle proiezioni periferiche, tramite l'attivazione dei complessi recettori-canali ionici, che come abbiamo visto funzionano da trasduttori nocicettivi, e generano una corrente di depolarizzazione in risposta agli stimoli nocivi, ma non a quelli innocui di minore intensità. Se la corrente è sufficiente, la trasduzione è seguita dall'iniziazione di potenziali di azione. Questi vengono condotti al SNC, dove l'invasione dei terminali dei nocicettori centrali nella colonna spinale, dopo l'attivazione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti, induce una veloce trasmissione sinaptica glutamatergica eccitatoria. Il rilascio di trasmettitore dai terminali afferenti primari centrali è modulato da numerosi recettori presinaptici, inclusi recettori per oppioidi, GABA, AMPA e adenosina, che riducono il rilascio di trasmettitore, e i recettori NMDA, P2X3 ed EP, che invece lo aumentano.

L'attività di scarica ad elevate frequenze dei nocicettori afferenti primari, prodotta da stimoli nocivi più intensi o sostenuti, risulta nel co-rilascio di peptidi neuromodulatori, come la sostanza P e il CGRP, dai terminali dei nocicettori centrali. Il rilascio di questi neuropeptidi attiva i recettori postsinaptici accoppiati a proteine G, i quali portano a risposte sinaptiche lente. Mediante questi EPSP, ciascuno dei quali della durata di centinaia di minuti, la depolarizzazione cumulativa risultante viene ulteriormente rafforzata dal reclutamento della corrente del recettore NMDA, attraverso l'inibizione della soppressione del blocco del  $Mg^{2+}$  dal canale.



L'effetto netto di questi processi multipli nei neuroni di trasmissione nocicettiva del corno dorsale, è un incremento progressivo nella scarica del potenziale d'azione: questo fenomeno viene anche detto *windup* (Mendell, 1966).

Questi input generano l'ingaggio di cascate di segnali multipli intracellulari che prima dell'attivazione erano silenti, portando a una modificazione orchestrata del comportamento neuronale, che consiste in un aumento delle risposte postsinaptiche eccitatorie, e nella depressione dell'inibizione, equivalente a un'incrementata eccitabilità o alla facilitazione dei neuroni. Le risposte sono amplificate, non solo per stimoli nocivi, ma anche per stimoli innocui.

Sia l'infiammazione che la lesione nervosa inducono cambiamenti trascrizionali nei neuroni del corno dorsale, in genere per mezzo dell'attivazione della cascata MAPK/pCREB. Queste includono cambiamenti nei recettori (NK1, TrkB, GABA-R) e nei trasmettitori (dinorfina, encefalina, GABA), e l'induzione della COX2, che producendo PGE2, creerà una facilitazione centrale della trasmissione del dolore.

Un pattern prominente di modificazione centrale nei neuroni del corno dorsale porta alla facilitazione dell'eccitazione tramite un aumento dell'espressione di recettori per i trasmettitori che sono incrementati dall'infiammazione periferica nei neuroni afferenti primari, come TrkB e i recettori di BDNF, NK1 e sostanza P. Inoltre, nel midollo spinale vi è un incremento dell'enzima COX-2, i cui prodotti modulano la trasmissione sinaptica in caso di infiammazione nei tessuti periferici.

Un secondo cambiamento è la riduzione nei meccanismi inibitori dopo lesione nervosa. Questo accade in tre modi possibili: 1) tramite una riduzione nei livelli di trasmettitori espressi nei neuroni del corno dorsale, 2) tramite una riduzione dei recettori

pre- e postsinaptici, e 3) tramite una perdita selettiva di interneuroni inibitori. La lesione nervosa, in virtù dell'attività di scarica ectopica nel sito della lesione, della ridotta inibizione e della formazione di nuove connessioni, può portare alla morte eccito-tossica dei neuroni nel corno dorsale. La perdita neuronale è prominente nelle lamine superficiali, dove si concentrano gli interneuroni inibitori, ed inoltre è esacerbata dagli input afferenti, fino a produrre una disinibizione permanente, che si manifesterà come una trasmissione facilitata del dolore.

## 1.5 - Il dolore neuropatico

---

Il dolore neuropatico è dovuto a un danno primario o una lesione al sistema nervoso centrale o periferico. A questo livello, la classificazione clinica si divide in nevralgia dei nervi periferici (ad es. nevralgia del trigemino) o dolore neuropatico centrale (ad es. sindrome talamica). Tuttavia, la sede della lesione non può essere utilizzata a discriminazione della patologia, in quanto i meccanismi neuropatici possono espandersi durante la malattia o coinvolgere sia la patofisiologia centrale che quella periferica. Ad esempio, in seguito al danno ad un nervo periferico, il segnale di dolore origina inizialmente dal sito assonale lesionato, ma con il tempo sono afflitte altre porzioni: dai gangli delle radici dorsali (DRG) alle corna dorsali, ai neuroni di ordine superiore, fino a livello corticale. L'estensione dei fenomeni che generano il dolore è dovuta alle lente reazioni biochimiche del sistema nervoso, per cui il dolore neuropatico dovrebbe essere considerato come una malattia nervosa progressiva.

Una classificazione fenomenologica si riferisce al tipo di danno che causa il disordine neuropatico:

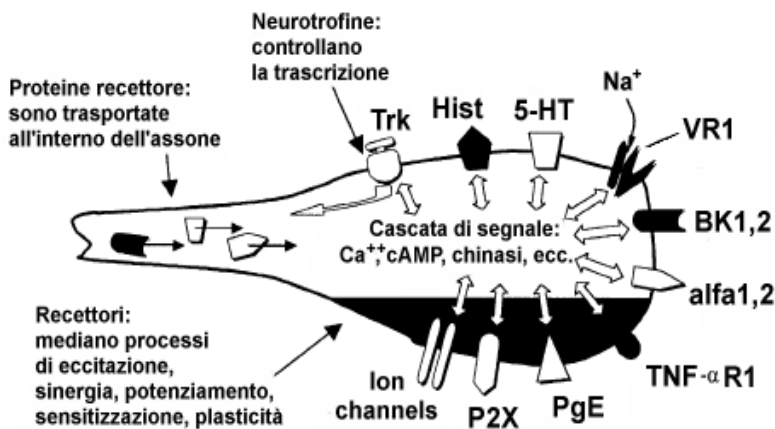
- Danno meccanico a un nervo, es. sindrome del tunnel carpale, ernia del disco vertebrale;
- Malattie metaboliche, es. polineuropatia diabetica;
- Malattie virali neurotrofiche, es. HIV, herpes zoster;
- Neurotossicità, es. chemioterapia;
- Meccanismi infiammatori e/o immunologici, es. sclerosi multipla;
- Ischemia focale al sistema nervoso, es. sindrome talamica;

- Disfunzione multipla del sistema neurotrasmettitoriale, es. la sindrome di dolore complesso regionale (CRPS).

In seguito alla transezione di un nervo, prossimalmente alla lesione si sviluppa un *neuroma*, consistente di gemme nervose rigenerative che crescono in tutte le direzioni. L'elettromicroscopia ha evidenziato che numerose fibre amieliniche spuntano da ciascun assone transezionato.

Poche ore dopo la transezione di un assone, gli impulsi nervosi possono essere indotti dalla stimolazione meccanica a partire dal sito della lesione, e dopo pochi giorni, impulsi spontanei originano principalmente dalle fibre C (Culp and Ochoa, 1982; Zimmermann, 1985; Janig, 1988; Chul Han et al., 2000). La sensibilità meccanica è pronunciata per diverso tempo (mesi) in seguito alla lesione, indipendentemente da se le fibre in accrescimento siano confinate al neuroma o se siano cresciute longitudinalmente.

Nel dolore neuropatico, il fenomeno dell'allodina, che compare spesso a seguito di una lesione nervosa periferica, denota sensazioni di dolore evocate da stimoli meccanici a bassa soglia, che non sono dolorosi sulla pelle normale. Le evidenze sperimentali e cliniche suggeriscono che le sensazioni dolorose nell'allodinia sono dovute agli impulsi nelle grandi fibre mielinizzate (fibre A $\beta$  nei nervi cutanei), che normalmente non sono percepiti come dolorosi (Molander et al., 1992). Una semplice interpretazione di queste osservazioni è che le fibre A $\beta$  abbiano sviluppato nuove connessioni sinaptiche con i neuroni che prima della lesione al nervo si erano funzionalmente connessi predominantemente con fibre C. E' stata riportata anche appropriata germogliazione di fibre A $\beta$  negli strati superficiali delle corna dorsali in seguito a lesione nervose periferiche (Woolf et al., 1992). Tuttavia questa spiegazione non si applica ai neuroni delle colonne



**Figura 2.** Diagramma schematico dell'assone in rigenerazione, e dei principali recettori farmacologici espressi nella membrana dell'assone in rigenerazione. **Trk**: recettore delle tirosin chinasi; **Hist**: recettore dell'istamina; **5-HT**: recettore della serotonina; **VR 1**: recettore vanilloide 1; **BK 1,2**: recettori per la bradichinina 1e 2; **alfa1,2**: adrenorecettori  $\alpha$  1,  $\alpha$  2 ; **TNF-  $\alpha$  R1**: recettore per TNF- $\alpha$ ; **PgE**: recettore per le prostaglandine; **P2X**: recettore 2X purinergico; **Ion channels**: canali ionici Na<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, K<sup>+</sup> . Le doppie frecce indicano interazioni bidirezionali tra i recettori ed il sistema di secondi messaggeri i quali mediano il rilascio di calcio, l'internalizzazione del recettore e altri processi (adattato da Zimmermann, 2001).

dorsali, poiché questi non ricevono un apprezzabile input dalle fibre C. Una spiegazione alternativa può essere trovata nell'ipotesi che nuovi pattern di scarica emergono in risposta alla stimolazione delle fibre A $\beta$  nei neuroni multi-recettivi del midollo spinale e di altri livelli del sistema somatosensoriale. Questi pattern di scarica delle fibre A $\beta$  dovrebbero mimare le risposte evocate dalle fibre C, che consistono tipicamente di scariche prolungate a singoli stimoli elettrici afferenti e somma dei fenomeni wind-up durante i ripetuti stimoli a bassa soglia.

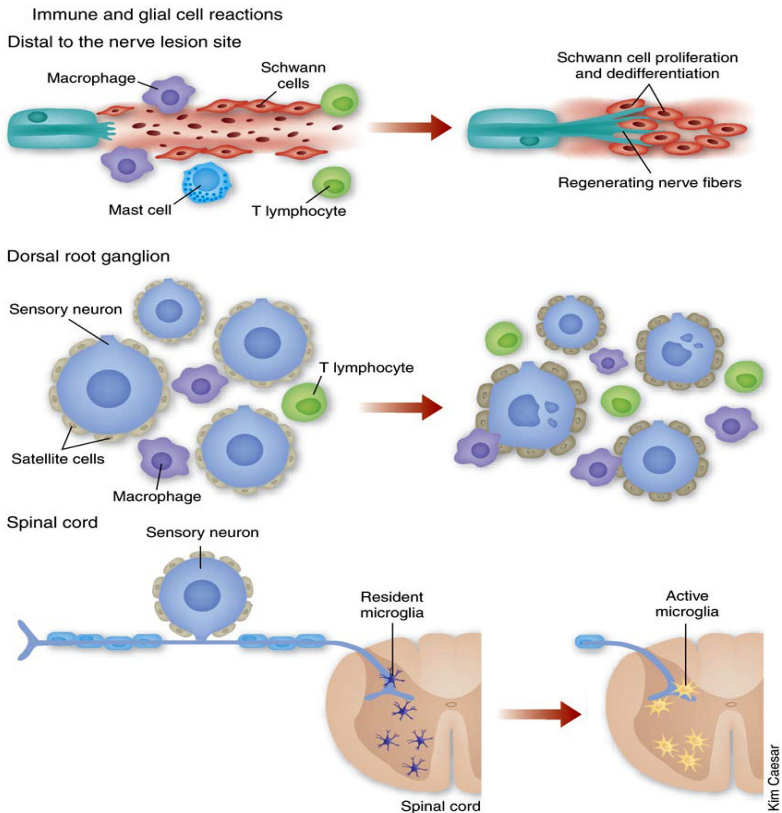
I prolungamenti assonali in rigenerazione sviluppano chemiosensibilità entro pochi giorni dalla lesione nervosa. Nelle

fibre C in rigenerazione avviene uno sviluppo precoce della chemiosensibilità a varie sostanze, tra cui istamina, bradichinina, serotonina, capsaicina e molte altre sostanze chimiche conosciute per essere in grado di eccitare i normali nocicettori nella pelle o nei muscoli (Leah et al., 1988; Hartung et al., 1989, Welk et al., 1990; Rivera et al., 2000).

La Figura 2 riassume i principali recettori e canali di membrana che sono stati direttamente o indirettamente identificati al livello dei prolungamenti nervosi in rigenerazione a seguito di lesione nervosa. In genere, essi sono gli stessi che si trovano normalmente nei terminali delle fibre C. Le sensazioni anormali che esse mediano, e l'allargamento della disfunzione che esse marciano, possono dipendere dalla loro immaturità e dalla loro bassa densità. I processi intracellulari come la cascata di segnalazione di secondi messaggeri, la trasformazione o l'attivazione dei recettori della protein-kinasi, contribuiscono alle modificazioni dei recettori, inducendo sensitizzazione a altre funzioni anomale al livello dei prolungamenti assonali.

Per quanto riguarda i mediatori in grado di indurre processi trascrizionali in condizioni di dolore e neuropatie, il principale candidato è il *glutammato*, il neurotrasmettitore eccitatorio per eccellenza del sistema nervoso, e i recettori NMDA sono i migliori da considerare per scatenare segnali intracellulari che inducono effetti durevoli a livello trascrizionale.

Una lesione nervosa periferica provoca una reazione nelle cellule immunitarie periferiche e nella glia a diversi livelli anatomici: i macrofagi e le cellule di Schwann facilitano i processi di degenerazione Walleriana nelle fibre nervose assotomizzate distali a una lesione nervosa; macrofagi, linfociti e cellule satelliti guidano una risposta immunologica nei DRGs; l'attivazione della microglia spinale induce una risposta gliale precoce dal SNC alla



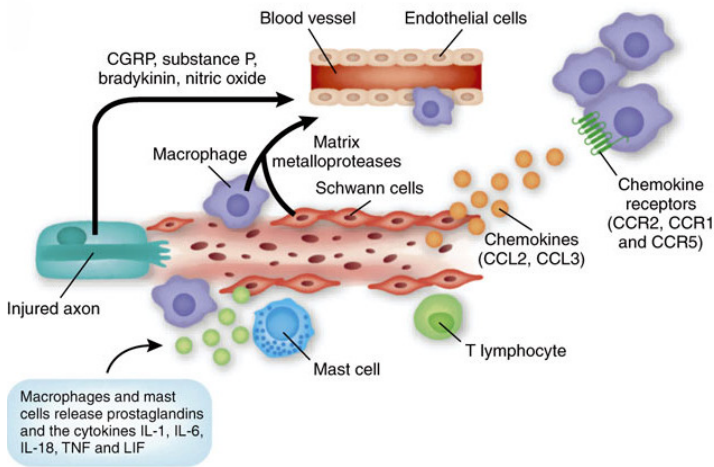
**Figura 3. (In alto)** Macrofagi, linfociti T e mastociti invadono il sito della lesione e diffondono intorno alle porzioni distali delle fibre nervose lesionate. Le cellule di Schwann iniziano a proliferare, differenziare e formano le bande di Bünger, che servono come tubi guida per gli assoni rigeneranti. **(Al centro)** Macrofagi e linfociti T che risiedono nei DRG prima della lesione, incrementano velocemente dopo la lesione. I macrofagi si muovono inoltre all'interno del rivestimento che le cellule satellite formano intorno ai corpi cellulari dei neuroni sensoriali primari. Le cellule satelliti iniziano a proliferare, e incrementano l'espressione della proteina acida fibrillare della glia (GFAP). **(In basso)** A una settimana dalla lesione, densi cluster di cellule microgliali occorrono nel corno ventrale del midollo, circondando i corpi cellulari dei motoneuroni. Un'attivazione microgliale massiva si trova anche nel corno dorsale, nei territori di proiezione dei terminali centrali delle fibre afferenti primarie lesionate (adattato da Scholz & Woolf, 2007).

lesione nervosa periferica, che è seguita dall'attivazione e proliferazione degli astrociti (Figura 3; Scholz & Woolf, 2007).

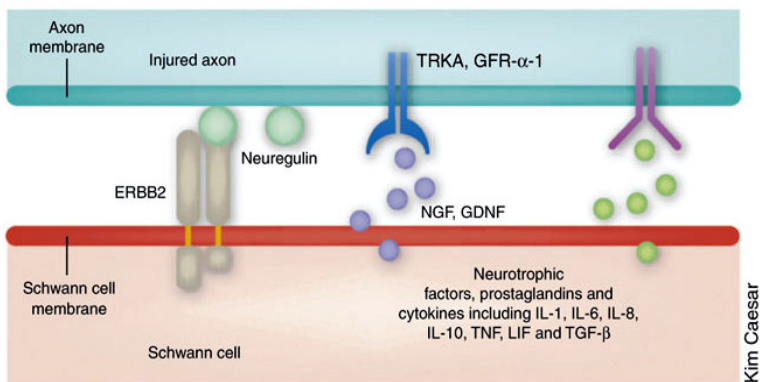
In contrasto alle neuropatie immuno-mediate, come la sindrome Guillain-Barré e la polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante, caratterizzate dall'attivazione delle cellule T, i *macrofagi* predominano nella reazione infiammatoria iniziale a una lesione nervosa periferica. I granulociti neutrofili partecipano nella primissima risposta immunologica al danno nervoso, potenzialmente attratti dal rilascio di NGF e chemochine. Anche se l'infiltrazione dei neutrofili è limitata alle immediate vicinanze al sito della lesione ed è di breve durata, i chemoattrattori e le citochine rilasciate dai neutrofili possono giocare un importante ruolo rinforzando il reclutamento dei macrofagi, particolarmente durante le prime 24 ore dopo la lesione.

Immediatamente dopo una lesione nervosa, i macrofagi residenti, che tengono conto per più del 9% della popolazione cellulare nei nervi periferici intatti, affluiscono al sito della lesione come una rapida squadra. Il reclutamento e l'attivazione dei macrofagi residenti e l'invasione di ulteriori monociti dal sangue periferico sono orchestrati dalle chemochine. I macrofagi attivati e le cellule di Schwann denervate secernono una matrice di metalloproteasi che attacca la lamina basale delle vescicole endoneuriali del sangue, generando un'interruzione della barriera emato-nervosa. Mediatori vasoattivi come CGRP, sostanza P, bradichinina e ossido nitrico, vengono rilasciati dagli assoni danneggiati causando iperemia e rigonfiamento. Questi cambiamenti vascolari supportano l'invasione delle cellule immunitarie circolanti, cosicché entro due giorni dalla lesione si forma un denso infiltrato cellulare, composto perlopiù da macrofagi linfociti T e mastociti (Figura 4).





**Figura 4.** I macrofagi e le cellule di Schwann producono una matrice di metalloproteasi che interrompe la barriera emato-nervosa. CGRP, sostanza P, bradicichina e ossido nitrico rilasciati dalle porzioni prossimali delle fibre nervose lesionate, inducono iperemia e rigonfiamento, promuovendo l'invasione di ulteriori monociti e linfociti T. Le chemochine CCL2 e CCL3 attraggono e guidano i monociti al sito della lesione. I macrofagi e i mastociti rilasciano prostaglandine e le citochine IL-1, IL-6, IL-18, TNF e LIF (adattato da Scholz & Woolf, 2007).



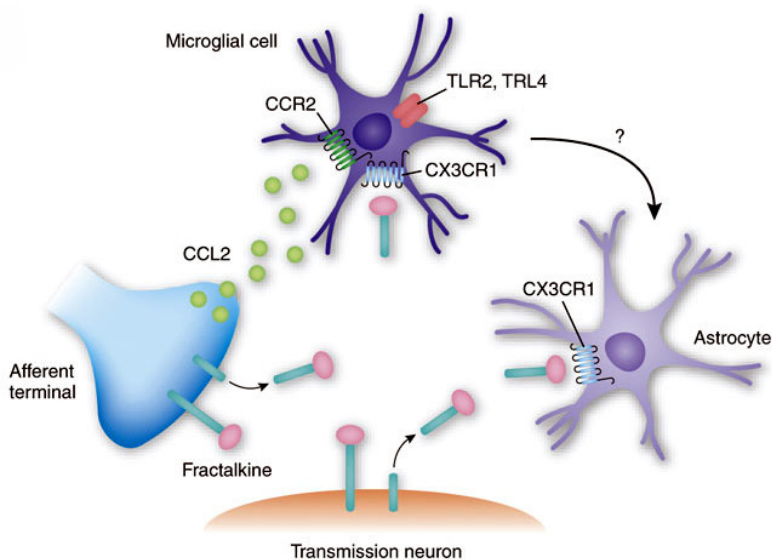
**Figura 5.** La neuregulina si lega ai recettori sulle cellule di Schwann attivando i processi di demielinizzazione e di proliferazione delle cellule di Schwann. Queste a loro volta rilasciano i fattori NGF e GDNF, prostaglandine, e citochine (adattato da Scholz & Woolf, 2007).

L'upregolazione di markers lisosomali, e un'abbondante inclusione di lipidi, indicano che i macrofagi si trasformano in fagociti attivi dopo una lesione nervosa. La rimozione degli assoni distali in via di degenerazione e della mielina da parte dei fagociti permette una riorganizzazione delle cellule di Schwann e prepara il terreno per la ricrescita delle fibre lesionate.

Entro alcuni minuti dalla lesione, la neuregulina, un fattore di crescita espresso sulla membrana assonale, si lega ai recettori sulle cellule di Schwann attivando processi di demielinizzazione, e in seguito supportando la proliferazione delle cellule di Schwann. Nella direzione opposta, le cellule di Schwann rilasciano i fattori NGF e GDNF, prostaglandine, e citochine, sensitizzando i nocicettori e modulando l'espressione genica dei neuroni sensoriali (Figura 5).

Il signaling tra i neuroni sensitivi primari, le cellule di Schwann e le cellule immunitarie è molto intenso, e citochine e chemochine sono componenti centrali in questa complessa rete. Le cellule di Schwann, i residenti attivi e i macrofagi infiltrati, i neutrofili granulociti e i mastociti, rilasciano prostaglandine, citochine pro-infiammatorie (incluse le interleuchine 1 $\beta$ , 6, 12 e 18, interferone- $\gamma$ , TNF e LIF, e citochine con funzione pro-infiammatoria e regolatoria come IL-10 e TGF- $\beta$ 1 (Figura 5). Recettori per le chemochine sono presenti sulle cellule di Schwann e sulla glia satellite.

Le citochine pro-infiammatorie contribuiscono al danneggiamento degli assoni, ma modulano anche l'attività spontanea dei nocicettori e la sensibilità agli stimoli. L'attivazione dei recettori del TNF nei neuroni sensoriali porta alla fosforilazione della p38 MAP kinasi e di JNK, potenzialmente attivando il fattore nucleare NF- $\kappa$ B e il percorso trascrizionale del gene *Jun*. Nei macrofagi, il reclutamento di TRAF stimola la sintesi e il rilascio di citochine sia



**Figura 6.** Il reclutamento della microglia dipende dal percorso di segnalazione che coinvolge TLR2 e TLR4, e dalla chemochina CCL2 che agisce su CCR2. La proteina neuronale fractalkina ha funzione di chemochina e può attrarre microglia e astrociti agendo su CX3CR1 (adattato da Scholz & Woolf, 2007).

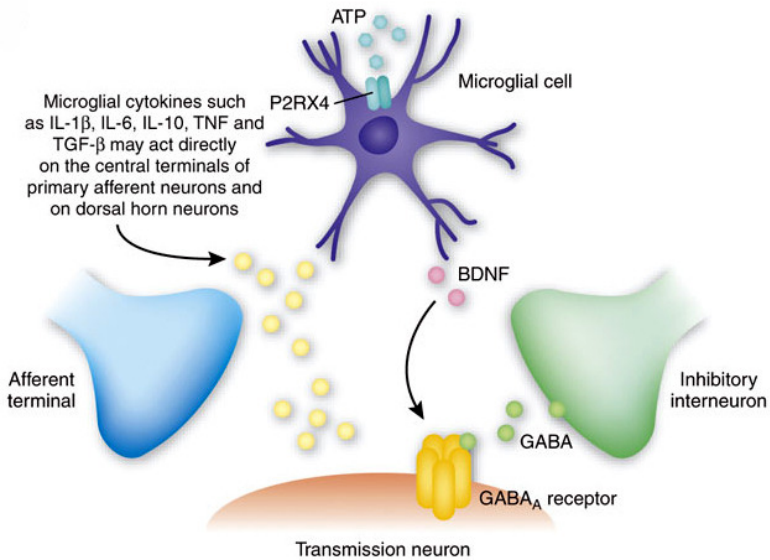
pro- che anti-infiammatorie. Il signalling mediato dal TNF inoltre promuove un'ulteriore invasione dei macrofagi inducendo il rilascio di proteasi e l'upregolazione di molecole di adesione.

Le cellule della *microglia* ricoprono un ruolo chiave in risposta alle lesioni del sistema nervoso. Dopo una lesione nervosa periferica, queste cellule formano densi cluster attorno ai corpi cellulari dei motoneuroni nel corno ventrale del midollo spinale, in modo simile ai macrofagi, che circondano nei DRG i neuroni sensoriali lesionati. Tuttavia, il maggior reclutamento e attivazione di cellule microgliali si ha nel corno dorsale, in prossimità dei terminali centrali delle fibre nervose sensoriali danneggiate (Figura 6).

L'attivazione microgliale indotta dalla lesione nervosa è caratterizzata da una fosforilazione (attivazione) della p38 MAP kinasi, delle isoforme 1 e 2 di ERK, e delle Src-kinasi. L'attivazione spinale della microglia, sia nel corno dorsale che in quello ventrale, ha il suo picco 1 settimana dopo la lesione, dopodiché lentamente diminuisce nel corso delle settimane successive. Questo pattern temporale differisce da quello consecutivo alla reazione infiammatoria distale a una lesione nervosa e all'infiltrazione dei macrofagi e dei linfociti nei DRG, che insorgono molto più precocemente, suggerendo che la risposta immunitaria centrale a una lesione nervosa periferica è organizzata in modo indipendente, e determina delle diverse conseguenze funzionali. Tre diversi percorsi mediano il reclutamento della microglia spinale residente, e probabilmente anche dei monociti circolanti, verso il corno dorsale. Questi coinvolgono la chemochina fractalchina agendo sul recettore CX3CR1, il signaling di CCL2 attraverso CCR2, e i recettori Toll-like (Figura 6).

Il signaling della fractalchina può aiutare a spiegare la specificità topografica del reclutamento della microglia e la conseguente proliferazione degli *astrociti* nel territorio dei terminali delle fibre nervose lesionate, in quanto cellule microgliali e astrociti esprimono entrambi CX3CR1 (Figura 6). Sembra quindi che il signaling della fractalchina tra neuroni e glia contribuisca allo sviluppo del dolore neuropatico. L'iniezione intratecale di fractalchina produce allodnia meccanica e iperalgesia termica, mentre la somministrazione di un anticorpo neutralizzante CX3CR1 protrae lo sviluppo dell'allodnia meccanica dopo la costrizione cronica del nervo sciatico (CCI) e la legatura del nervo spinale (SNL) (Zhuang et al. 2007; Milligan et al. 2004).

In confronto con la risposta della microglia, l'inizio della proliferazione degli astrociti è più tardiva e procede lentamente,



Kim Caesar

**Figura 7.** L'ATP che si lega al recettore P2RX4 innesca l'attivazione della microglia dopo lesione nervosa. La microglia attivata rilascia BDNF, il quale induce in una sottopopolazione dei neuroni della lamina I del corno dorsale un'inversione delle correnti GABAergiche inibitorie. Inoltre, le citochine microgliali sembrano agire direttamente sui centrali terminali degli afferenti sensoriali primari e sui neuroni del corno dorsale (adattato da Scholz & Woolf, 2007).

mantenendosi sostenuta per un periodo maggiore (più di cinque mesi) (Zhang & De Koninck, 2006; Zhuang et al. 2005; Echeverry et al. 2008). Poiché la risposta microgliale alla lesione e precede la proliferazione degli astrociti, una configurazione di comunicazione diretta può esistere probabilmente tra questi due tipi di cellule gliali, in modo da coordinare il loro pattern di attivazione sequenziale (Figura 6).

Il reclutamento e l'attivazione di differenti cellule gliali in complessi pattern temporali richiede una ben organizzata

comunicazione reciproca tra neuroni e glia, e tra le stesse cellule gliali. Un prominente percorso di signaling nello sviluppo del dolore neuropatico è quello dell'ATP che agisce sui recettori purinergici della microglia. La stimolazione tonica della microglia spinale da parte dell'ATP causa un rilascio, mediato da P2RX, di BDNF, il quale determina uno shift di depolarizzazione del gradiente anionico dei neuroni della lamina I del corno dorsale (Figura 7). Questo shift induce un'inversione della corrente GABA inibitoria che contribuisce all'allodinia meccanica a seguito di lesione nervosa (Coull et al. 2003). Tuttavia, non tutti gli effetti GABAergici sono invertiti dopo lesione nervosa periferica, e questo cambiamento del segnale GABA sarebbe limitato a una sottopopolazione di neuroni della lamina I che proiettano al cervello.

L'attivazione della microglia induce un incremento della sintesi della proteasi lisosomale catepsina-S, e delle citochine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF e TGF- $\beta$ . La modulazione diretta dell'attività dei neuroni del corno dorsale da parte di queste citochine potrebbe essere coinvolta nello sviluppo del dolore neuropatico; tuttavia, esse provvedono importanti segnali autocrini di feedback alle stesse cellule microgliali. (Winkelstein et al. 2001) (Figura 7).

## 1.6 - Modelli animali del dolore

---

In contrasto con la natura polimorfica del dolore, che nell'uomo viene descritto come una sensazione, il dolore negli animali può essere valutato solo esaminando le loro reazioni. Gli animali più utilizzati in tutti i modelli animali di dolore sono i roditori, anche se i meccanismi essenziali che rendono possibile a un organismo la reazione a uno stimolo che ne minacci l'esistenza, esistono in tutto il regno animale, eccetto forse negli artropodi e negli insetti (Bateson, 1991). Generalmente, i più affidabili segni di dolore sono quelli fisici. La ricerca nell'uomo e negli animali si è focalizzata su diversi indicatori biochimici (catecolamine, corticoidi, oppioidi, ecc.), i quali non sembrano avere specificità. Si può affermare lo stesso per altri metodi come i parametri elettrofisiologici (elettroencefalogramma, potenziali evocati ecc.). A tutt'oggi lo studio delle risposte comportamentali è l'unico indicatore delle sensazioni spiacevoli stimolo-dipendenti che potrebbe essere algogenico rispetto all'uomo.

Le principali reazioni prodotte da un focus (presumibilmente) doloroso possono essere: 1) risposte organizzate da centri relativamente "bassi" nella gerarchia del SNC, e 2) risposte più complesse, organizzate da centri superiori nel SNC. Risposte del primo tipo possono essere elicitate in animali decerebrati e sono state chiamate "riflessi pseudo-affettivi" (Sherrington, 1906). Esse includono risposte motorie di base (ritrazione, salto, contrazione, ecc.), reazioni neurovegetative generalmente nel contesto di una reazione d'allarme, con un incremento del tono simpatico (tachicardia, ipertensione arteriosa, iperpnea, midriasi, ecc.), e vocalizzazioni. Le reazioni più complesse, invece, includono risposte motorie condizionate, che risultano da un periodo di

apprendimento, e spesso l'apprendimento di queste risposte è molto rapido. In generale, esse hanno il significato sia di prevenzione da nuovi danni che di evitare di aggravare lesioni già esistenti. Vengono spesso osservate reazioni comportamentali (fuga, diffidenza nei confronti di oggetti responsabili di esperienze dolorose, evitamento, aggressività, ecc.) o modificazioni nel comportamento (sociale, alimentare, sessuale, ecc.). Dal confronto con le prime, queste reazioni forniscono la prova che il SNC organizza risposte molto più integrate all'interno della sua organizzazione gerarchica. Se lo stimolo è sufficientemente intenso, la reazione sarà la fuga o l'attacco. Tuttavia, va sottolineato che anche se sono frequenti delle reazioni motorie attive, altrettanto spesso vengono osservate negli animali delle risposte motorie passive, come ad esempio l'immobilità, che permette all'animale sofferente di conservare una postura indolore. Zimmermann (1986) ha reinterpretato la definizione di dolore della IASP in modo da poter essere applicata anche agli animali: il dolore è "un'esperienza sensoriale aversiva causata da un danno reale o potenziale che elicitare reazioni motorie e vegetative progressive, risultante in un comportamento appreso di evitamento, e che può modificare comportamenti specie specifici, incluso il comportamento sociale".

Idealmente, un modello animale di dolore dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche (Le Bars et al. 2001):

1) *Specificità*: lo stimolo deve essere nocicettivo (specificità dell'input). Inoltre nel modello comportamentale, deve essere possibile differenziare le risposte a stimoli nocicettivi dalle risposte a stimoli non-nocicettivi. In altre parole, la risposta quantificata deve essere esclusivamente o preferenzialmente innescata da stimoli nocicettivi ("specificità dell'output"). In questo senso, bisogna tener conto del fatto che alcuni comportamenti innati o



acquisiti possono essere innescati da stimoli aversivi che però non sono nocicettivi o dolorosi.

2) *Sensitività*: nel modello deve essere possibile quantificare la risposta e correlare la variabile all'intensità dello stimolo all'interno di un range ragionevole (dalla soglia del dolore alla soglia di tolleranza del dolore). In altre parole, la quantificazione della risposta deve essere appropriata per un dato tipo di stimolo e monotonicamente correlata alla sua intensità.

3) *Validità*: il modello deve rendere possibile la differenziazione di cambiamenti comportamentali non-specifici (es. nella motilità e nell'attenzione), da quelli innescati dallo stesso stimolo nocicettivo. In altre parole, la risposta monitorata non deve essere contaminata da perturbazioni simultanee relative ad altre funzioni, in particolare se sono state introdotte da un agente farmacologico. La validità del test, cioè il grado in cui il test misura realmente ciò che si presume di misurare, è senza dubbio uno dei più difficili problemi da risolvere.

4) *Affidabilità*: se si ritestano gli animali con un test identico o equivalente, deve essere ottenuta la stessa consistenza dei punteggi. Ciò significa che l'applicazione ripetuta di uno stimolo non dovrebbe produrre lesioni.

5) *Riproducibilità*: i risultati ottenuti con un test devono essere riproducibili non solo all'interno dello stesso laboratorio, ma anche tra laboratori differenti.

Poiché nessun test di nocicezione incontra tutti questi criteri, la scelta di quale test usare deve essere un compromesso.

Una classificazione dei principali test nocicettivi può essere effettuata in base al tipo di stimolo che viene usato in un test, per cui si hanno *test di dolore fasico*, che utilizzano stimoli di breve durata, e *test di dolore tonico*, basati sull'uso di stimoli di durata più lunga (per una descrizione di questi test, vedi Le Bars et al.

2001). I modelli di dolore cronico o neuropatico, invece, utilizzano stimolazioni permanenti come l'applicazione di legature cromatiche per indurre lesioni nervose a vari livelli nel sistema nocicettivo periferico e centrale (Campbell & Meyer, 2006).

I *test di dolore fasico* possono essere classificati in base alla natura dello stimolo, sia esso termico, meccanico o elettrico. Test basati sull'uso di *stimoli termici* sono il *Tail-Flick test*, il *Paw Withdrawal test (Plantar test)*, l' *Hot Plate test*. Nei test che usano stimoli termici, è sempre la pelle ad essere stimolata, e non i tessuti viscerali o muscoloscheletrici. Il calore radiante progressivamente stimola una sequenza di attivazione che parte dai termorecettori e va ai nocicettori, fino ad elicitare una risposta di ritrazione del tessuto esposto da parte dell'animale nell'ordine di pochi secondi. Nel *Tail-Flick test* (Hardy et al. 1957) lo stimolo viene applicato sulla coda dell'animale; la risposta di dolore è lo spostamento della coda, in genere molto rapido, in questo caso interpretata come riflessa o spinale. Invece nell'*Hot Plate test* (Ankier, 1974) gli animali vengono posti su una piastra riscaldata a temperatura costante, la risposta di dolore è il leccamento della zampa o il salto, e quindi si tratta di risposte sopraspinali organizzate. Per quanto riguarda il *Paw Withdrawal test*, anche conosciuto come *Plantar test*, Hargreaves et al. (1988) hanno pensato di stimolare con il calore radiante la singola superficie plantare di una zampa di un animale, costruendo un apparato in cui esso è libero di muoversi.

Test che si basano sull'uso di *stimoli meccanici* sono invece il *Paw Pressure test*, il *Von Frey test* e il *Dynamic Aesthesiometer Plantar test*. Nel *Paw pressure test* (Randall e Selitto, 1957) una pressione di crescente intensità viene applicata a un'area puntiforme della zampa posteriore dell'animale; il parametro misurato è la soglia (peso in grammi) per la comparsa di un comportamento di ritrazione della zampa. Il *Von Frey test* (Pitcher et al. 1999) utilizza



**Figura 8.** Dynamic Aesthesiometer Plantar test (Ugo Basile, Italia).

l'applicazione di filamenti di nylon costruiti da Maximilian Von Frey nel 1896 come apparato per misurare la sensibilità tattile della pelle (estesimetro). I filamenti sono di per sé stimoli non-nocivi che, applicati sulla superficie plantare della zampa dell'animale, esercitano a seconda della loro dimensione una certa forza (espressa in grammi); lo sperimentatore applica gradualmente i filamenti fino alla determinazione della soglia sensoriale all'elicitazione di una risposta riflessa di evitamento o retrazione della zampa stimolata. I filamenti di Von Frey vengono utilizzati per misurare l'iperalgnesia a seguito di un'inflammatione cutanea o l'allodinia meccanica che può insorgere a seguito di una lesione nervosa periferica. Il *Dynamic Aesthesiometer Plantar test* (Figura

8) (Luvisetto et al. 2006) è una versione moderna del *Von Frey test*, in cui si applica uno stimolo rigido puntiforme che incrementa elettronicamente una forza (in grammi) sulla superficie plantare della zampa dell'animale, fino ad attivare la risposta di ritrazione della zampa.

Infine, i test di nocicezione che utilizzano *stimoli elettrici* si basano in genere sulla somministrazione di treni di shock elettrici in graduale aumento di intensità, sulla coda, sulla zampa o sulle membra dell'animale. A seconda della durata dei treni, possono essere elicitati diversi comportamenti organizzati (fuga, evitamento, vocalizzazioni, contrazioni, aggressione) che possono essere quantificati e messi in relazione con l'intensità dello stimolo. Questi test sono stati ad esempio usati per lo studio farmacologico dell'attività analgesica di sostanze sull'attività evocata da stimoli elettrici (Paalzow, 1969; Jourdan et al. 1998), o per lo studio della velocità di conduzione di determinate classi di fibre sensoriali nocicettive in vari tessuti (Cadden et al. 1983; Falinower et al. 1994).

I *test di dolore tonico* generalmente utilizzano un agente chimico irritante come stimolo nocicettivo. Essi differiscono dai test precedenti in quanto abbandonano il principio di determinazione della soglia nocicettiva e coinvolgono un approccio quantitativo del comportamento osservato che applica uno stimolo la cui potenza invece varia nel tempo. Non sono tuttavia modelli di dolore cronico, perché la loro durata è in genere nell'ordine di alcune decine di minuti, eccetto i modelli comportamentali che utilizzano l'iniezione di cristalli di urato, del coadiuvante di Freund o carragenina, che sono considerati modelli di dolore cronico infiammatorio (Okuda et al, 1984; Otsuki et al. 1986; Coderre & Wall, 1987; Tonussi & Ferreira, 1992).

Il test più utilizzato di dolore tonico è il *test della formalina*, in cui viene praticata un'iniezione intradermica di formalina (in soluzione tra 0.5 e 15%) nella superficie dorsale o plantare della zampa di un ratto o un topo (Dubuisson and Dennis, 1977). Le reazioni dell'animale possono essere diverse e alternate l'una con l'altra, e vanno dallo spostamento del peso corporeo sulla zampa non iniettata, al sollevamento della zampa, al leccamento copioso e allo scuotimento della stessa. Generalmente il parametro misurato è il numero di leccamenti o scuotimenti per unità di tempo (Wheeler-Aceto and Cowan, 1991) oppure il tempo cumulativo speso mordendo e leccando la zampa (Sufka et al. 1998). Il comportamento dell'animale può essere registrato automaticamente da una videocamera, e in questo modo possono essere controllati gli effetti delle sostanze analgesiche sull'attività locomotoria e sugli altri comportamenti spontanei dell'animale, dissociandoli dagli effetti meramente antinocicettivi. Nel ratto e nel topo, l'iniezione intraplantare di formalina produce una reazione bifasica, con una fase iniziale in cui l'animale si lecca copiosamente, e successivamente dopo circa 15 minuti una seconda fase algica, e tra le due un'interfase dove il dolore sembra essere quiescente. La prima fase sembra derivare essenzialmente dalla stimolazione diretta dei nocicettori, mentre la seconda comprende un periodo di sensitizzazione durante il quale compaiono fenomeni di infiammazione. L'origine centrale o periferica di questa seconda fase è stata oggetto di dibattito (Tiolsen et al. 1992). Tuttavia, poiché il blocco della prima fase tramite sostanze ad azione rapida (es. la lidocaina) non sopprime la seconda fase nel test, e poiché la formalina stessa induce attivazione bifasica nelle fibre afferenti, la seconda fase non può essere interpretata come una conseguenza della prima, anche se

origina lo stesso chiaramente da meccanismi periferici (Le Bars et al. 2001).

I *modelli animali di dolore neuropatico* studiati maggiormente sono quelli in cui un danno meccanico è arrecato a livello di un nervo periferico. Il più diffuso è la legatura o la transezione del nervo sciatico. Questa lesione comporta un'interruzione immediata ed irreversibile della conduzione elettrica nel nervo, seguita da degenerazione Walleriana degli assoni distali alla lesione, e dalla germinazione prossimale di fibre assonali, nel tentativo di rigenerare le fibre nervose lese. Oltre a questi effetti locali, ci sono altre reazioni che si verificano dopo diversi giorni, come le risposte dei corpi cellulari nei DRG che coinvolgono la cromatolisi del nucleo (Cragg, 1970).

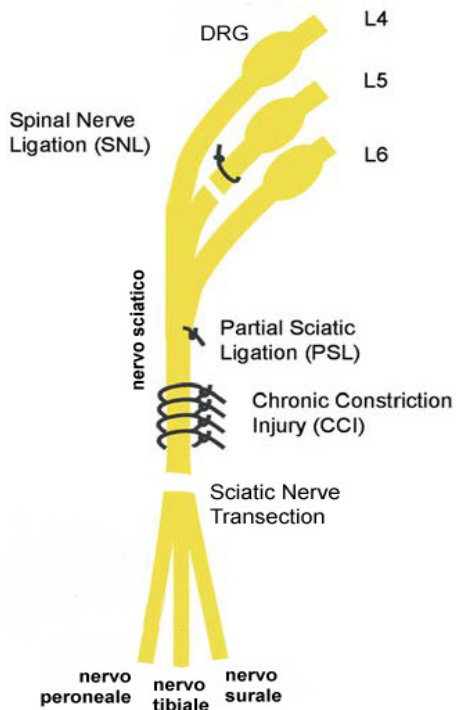
Attualmente sono utilizzati quattro principali modelli per il dolore associato ai danni al nervo sciatico, ciascuno con diverse varianti (Bennett, 1994 a,b; Kauppila, 1998) (Figura 9):

- transezione o legatura totale del nervo, che simula le condizioni cliniche dell'amputazione (nella Figura 9, Sciatic Nerve Transection);
- lesione parziale del nervo (Partial Sciatic Ligation, PSL), con legatura stretta intorno a una parte (circa il 50%) dei fasci nervosi (Seltzer et al.; 1990), che simula un danno al nervo indotto da un colpo o una ferita;
- modello del Chronic Constriction Injury (CCI), per cui si applicano diverse legature intorno al nervo, lasciando un lume inferiore al diametro del nervo originario (Howe et al., 1977; Bennett & Xie, 1988), simulando la condizione clinica della compressione cronica del nervo, es. come avviene nell'irritazione delle radici spinali nell'ernia lombare al disco o nella neuropatia da allettamento;

- legatura stretta di un nervo spinale (Spinal Nerve Ligation, SNL) (Kim and Chung, 1992; Carlton et al., 1994), o transezione di una o più radici dorsali (Lombard et al., 1979; Brinkhus and Zimmermann, 1983; Albe-Fessard and Lombard, 1983), che risulta nella completa deafferentazione di uno o più segmenti spinali, e che simula un danno delle radici dorsali e del plesso del nervo.

Vi sono tre indici comportamentali del dolore neuropatico, che sono regolarmente osservabili negli animali con una lesione parziale ad un nervo o con una legatura di un nervo spinale o periferico:

- *Autotomia*, termine comunemente usato quando l'eccessiva attenzione rivolta verso l'arto ed il self-grooming si concludono con ferite da morso ed eventualmente anche l'autoamputazione dell'arto
- *Iperalgesia*, ovvero una maggiore ed eccessiva risposta dolorosa ad uno stimolo nocivo, come ad esempio calore cutaneo, rispetto ad animali sani;
- *Allodinia*, ovvero una risposta di retrazione al tocco ripetuto con un filamento di von Frey (Pitcher et al., 1999), di cui si parlerà in dettaglio più avanti.



**Figura 9.** Modelli animali di dolore neuropatico (adattato da Campbell & Meyer, 2006).



## 1.7 - La terapia attuale del dolore

---

Poiché l'attività neuronale, sia nel SNC che nella periferia, è coinvolta nel processamento del dolore, i trattamenti antinocicettivi (volti alla riduzione dei segnali del dolore) possono essere diretti a uno o più livelli del sistema (Schim & Stang, 2004). Gli agenti analgesici possono quindi essere mirati ai siti della lesione o dell'infiammazione. Essi possono essere usati per bloccare l'attività dei neuroni afferenti primari (es. lidocaina, capsaicina, altri anestetici locali), o per ridurre l'infiammazione nel sito del tessuto leso (es. gli antinfiammatori non-steroidi o NSAIDs). I trattamenti analgesici possono essere anche mirati all'inibizione della trasmissione dei messaggi dolorosi nel midollo spinale, sia tramite la facilitazione dell'attività delle vie discendenti inibitorie con gli antidepressivi tricyclici, sia bloccando i cambiamenti strutturali e funzionali che sono pensati essere coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento del dolore neuropatico tramite antagonisti di recettori e tramite alcuni farmaci antiepilettici (es. la carbamazepina).

La somministrazione sistemica di sostanze analgesiche è correntemente il metodo più largamente utilizzato per indurre analgesia. Poiché non vi sono a disposizione trattamenti per ristabilire la funzione nervosa nel caso del dolore neuropatico, il trattamento del dolore a lungo termine si basa in genere sul trattamento dei sintomi associati.

I farmaci *antinfiammatori non steroidei (NSAIDs)* appartengono alla prima classe degli antinocicettivi sistemici storicamente utilizzate per il trattamento su larga scala del dolore, e sono le sostanze analgesiche non oppiacee più largamente usate per il dolore muscoloscheletrico negli USA. Questo gruppo di sostanze

può essere ulteriormente suddiviso in aspirina e NSAIDs non-aspirine come il diclofenac, l'ibuprofene, il naproxen, e il nabumetone. Questi farmaci trattano con efficacia diverse sindromi nocicettive (es. mal di testa e mal di schiena acuto) e neuropatiche. Tuttavia gli NSAIDs inducono irritazione delle pareti dello stomaco e aumentano il tempo di aggregazione delle piastrine, e vengono perciò associati ad un incremento della sanguinazione.

Gli *inibitori della cicloossigenasi isozima 2 (COX-2)* hanno un'efficacia clinica su dolore ed infiammazione simile ai tradizionali NSAIDs, ma senza gli effetti collaterali che accompagnano l'inibizione della COX non selettiva, come l'irritazione gastrointestinale e l'inibizione dell'attivazione delle piastrine.

Più del 50% dei pazienti che soffrono di dolore persistente possono sviluppare depressione, giustificando l'uso degli *antidepressivi* nella medicina del dolore neuropatico. Gli antidepressivi hanno anche effetti analgesici su tutte le forme di dolore cronico separatamente dai loro effetti antidepressivi. Gli antidepressivi triciclici sono conosciuti come inibitori della ricaptazione di noradrenalina e serotonina, causando un incremento della concentrazione di entrambi questi neurotrasmettitori nel midollo spinale, per cui inibendo il dolore. I più recenti inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina sembrano essere efficaci per il dolore cronico nocicettivo e per il mal di testa cronico. Tuttavia il maggior svantaggio con la terapia degli antidepressivi è il lungo lasso di tempo per l'inizio degli effetti analgesici. I pazienti che usano antidepressivi triciclici per il dolore differiscono nel dosaggio richiesto per la loro efficacia, quindi la tossicità può essere un grave problema.

I *recettori del N-metil-D-aspartato (NMDA)* partecipano ad almeno tre differenti livelli della trasmissione del dolore. Primo,

l'attivazione dei recettori NMDA periferici produce da sola comportamenti algici. Secondo, a livello del midollo spinale, come già esposto i recettori NMDA sono coinvolti nel *wind-up*, un aumento progressivo dell'ampiezza della risposta del dolore nelle corna dorsali del midollo spinale durante la stimolazione dolorosa a bassa frequenza. Terzo, il bloccaggio dei recettori NMDA centrali nei circuiti ippocampali è associato ad effetti analgesici. Ketamina, memantina, MK-801, CGP-37849, e dextrometorfano hanno effetti antinocicettivi nel test della formalina nei topi. L'applicazione del dextrometorfano, un antagonista a bassa affinità dei recettori NMDA, ha mostrato effetti promettenti per il trattamento del dolore neuropatico.

L'*adenosina* è un neuromodulatore che agisce all'interno del SNC e periferico come inibitore generale del SNC, tramite il controllo delle concentrazioni dell'adenosina monofosfato ciclico (cAMP). A livello presinaptico, l'adenosina inibisce il rilascio di neurotrasmettitori del dolore come glutammato, sostanza P, e CGRP. Postsinapticamente, l'adenosina sopprime la trasmissione sensoriale tramite l'attivazione dei canali  $K^+$ , che risulta in una conseguente riduzione nella concentrazione degli ioni  $Ca^{2+}$ , diminuendo il rilascio di neurotrasmettitori. Tuttavia si pensa che il rilascio degli oppioidi endogeni medi l'azione analgesica finale dell'attivazione di proteine di canale che inducono l'apertura dei canali potassio-adenosina trifosfato (ATP-gated  $K^+$  channels). Alcuni nuovi inibitori dell'adenosina chinasi sono attualmente in studio per le loro proprietà analgesiche e antinfiammatorie.

Alcuni *anticonvulsivi* vengono usati per il trattamento di diverse sindromi dolorose. Il gabapentin inibisce i canali  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  voltaggio-dipendenti, suggerendo che il suo effetto analgesico occorra a livello spinale. Il gabapentin viene utilizzato per il trattamento del dolore nella sindrome Guilain-Barré, nella

neuropatia dolorosa diabetica e nella neuralgia postherpetica, oltre ad altre sindromi dolorose. La carbamazepina e la fenitoina sono efficaci nel trattamento della nevralgia trigeminale, pur avendo degli effetti collaterali cognitivi significativi. La lamotrigina, che inibisce il rilascio presinaptico del glutammato e blocca i canali  $\text{Na}^+$ , come il topiramato, che blocca i canali  $\text{Na}^+$  e potenzia l'attività GABA, sono stati entrambi usati con successo per il dolore neuropatico. Tuttavia, durante il trattamento con alcuni anticonvulsivi possono comparire complicanze epatiche, ed è stata riportata una marcata confusione cognitiva.

La classe degli *oppioidi analgesici* include gli oppioidi deboli come la codeina, il dextropropoxifene, e il tramadol, e quelli più forti come il ketobemidone, la morfina e l'oxicodone. Gli oppioidi inibiscono fortemente i neuroni nocicettivi centrali attraverso l'interazione con i recettori mu, kappa e delta. La codeina, in frequente combinazione con il paracetamolo, è l'analgesico oppioide più frequentemente prescritto per somministrazione orale, e il tramadol si è dimostrato efficace contro mal di schiena, osteoartriti, e dolore perioperatorio. Gli oppioidi vengono inoltre usati nel trattamento sistemico del dolore, anche se più che altro limitatamente a somministrazione acuta o subacuta parenterale (es. dolore postoperatorio o da affaticamento). Vi sono tuttavia diversi effetti collaterali che accompagnano l'uso degli oppioidi, incluso lo sviluppo di fenomeni di tolleranza e dipendenza insieme alla possibile costipazione e depressione respiratoria.

Il *bloccaggio simpatico degli agonisti alfa2-adrenergici*, come la clonidina allevia il dolore tramite l'attivazione dei recettori presinaptici alfa2-adrenergici, bloccando il rilascio delle catecolamine. Il trattamento con clonidina della CRPS può ridurre significativamente il dolore senza indurre ipotensione, ipoxemia, né eccessiva sedazione. La clonidina può essere usata anche in

aggiunta ad altri analgesici come morfina o ropivacaina, per diminuire le dosi necessarie alla somministrazione locale o sistemica.

I *triptani* (come il sumatriptano, frovatriptano, eletriptano e almotriptano) sono degli agonisti selettivi dei recettori della serotonina 5-HT 1B/1D, accompagnati da vasocostrizione delle arterie meningeali. Essi vengono usati primariamente nel controllo del mal di testa. Essi hanno un rapido onset di azione e pochi effetti collaterali. Sfortunatamente non possono essere usati come terapia preventiva, e la responsività ai triptani nei pazienti con emicrania tende ad essere piuttosto variabile.

Infine, gli *Ergot alcaloidi* (come l'ergotamina e la diidroergotamina) sono usati per il trattamento dell'emicrania, di solito in combinazione con uno stimolante, come la caffeina. Tuttavia la loro efficacia è più bassa di quella dei triptani. Inoltre, come per i triptani, nei pazienti con emicrania gli effetti variano considerevolmente.

I trattamenti convenzionali fino a qui elencati si sono dimostrati efficaci solo in alcuni gradi nei pazienti affetti da dolore cronico: le sindromi di dolore sono spesso trattate inadeguatamente, e molti soggetti non raggiungono un livello soddisfacente di analgesia, sia assumendo farmaci singoli che in combinazione. Le terapie che utilizzano farmaci agenti sistematicamente sono efficaci per molti pazienti, tuttavia alcune terapie sistemiche (es. gli oppiacei) in genere sono troppo poco efficaci nel trattamento del dolore neuropatico. Inoltre, l'utilizzo di trattamenti per via sistemica è in genere frequentemente associato a effetti collaterali e complicazioni significative.

I clinici che pianificano una terapia del dolore devono sempre confrontarsi con una serie di problematiche. In primo luogo, molte sindromi di dolore cronico hanno un'eziologia complessa, e si

dimostrano resistenti al trattamento. Ad esempio, la neuropatia diabetica dolorosa è una complicazione nei pazienti affetti da diabete mellito, i quali sono costretti a seguire un basso regime di assunzione di farmaci. Altro esempio, il trattamento della sindrome di dolore complesso regionale (CRPS) è ad oggi insoddisfacente, poiché in questa sindrome i disordini neuropatici si sviluppano in maniera sproporzionata rispetto al trauma o la lesione di origine, e ad oggi sono stati utilizzati una moltitudine di farmaci, tra cui antidepressivi, anticonvulsivi, agenti antiaritmici e antagonisti NMDA, tuttavia senza successo.

Un'altra problematica riguarda le sindromi di dolore neurogenico refrattario, le quali includono neuralgie e polineuropatie dolorose. Per esempio, la neuralgia postoperatoria e la nevralgia trigeminale possono non essere ben trattate da antidepressivi triciclici, gabapentin, oxycodone e carbamazepina. Le cure disponibili per le polineuropatie dolorose, rispetto ai trattamenti comunemente utilizzati per le altre sindromi, sono anche quelle con la più bassa soddisfazione dei pazienti, a causa della limitata efficacia dei farmaci raccomandati.

La competizione per i siti di legame delle proteine può incidere sui livelli attivi delle sostanze nel sangue, dando luogo a fenomeni di interazione che spesso riducono la potenza del farmaco. Le droghe con basso legame proteico sono meno soggette alla competizione rispetto a quelle con un profilo di legame elevato. Le interazioni tra farmaci in genere producono un potenziamento sinergico degli effetti, portando a un aumento del pericolo di overdose e di effetti collaterali. Come risultato, alcuni farmaci come gli anticonvulsivi necessitano un aggiustamento della dose, a causa dell'elevato livello di legame proteico nel plasma. Ad esempio, l'aggiunta di clonidina alla morfina risulta in un titolo sanguigno minore di morfina ("morphine-sparing effect"). Un'altra forma di interazione

farmaco-farmaco avviene al livello degli enzimi epatici metabolici. Alcune sostanze utilizzate nel trattamento del dolore come gli anticonvulsivi possono potenziare l'efficacia dell'apparato enzimatico del fegato, in genere via induzione enzimatica. In conseguenza, altre sostanze metabolizzate per mezzo degli stessi isozimi vengono degradate più rapidamente, con un decremento significativo della loro emivita biologica. Tutte le sostanze metabolizzate per via epatica sono potenzialmente epatotossiche a dosi elevate. Una severa epatotossicità è stata per esempio descritta come conseguenza dell'assunzione di NSAIDs e inibitori della COX-2.

Un'altra problematica deriva dal fatto che gli analgesici non hanno effetti limitati al tessuto di target. Per esempio, sostanze come la lidocaina, somministrate localmente per il blocco periferico, presentano pericolosi effetti collaterali come una potenziale cardiotossicità. Durante il bloccaggio intratecale, invece, può occorrere un blocco motorio indesiderato. Gli oppioidi hanno anche diversi effetti sulla motilità intestinale, causando costipazione e depressione respiratoria. Gli NSAIDs, attraverso il blocco della COX-1, inibiscono l'aggregazione piastrinica e producono irritazione dello stomaco. Inoltre, i regimi di dosaggio degli analgesici spesso variano considerevolmente tra i pazienti, e alcuni effetti collaterali dovuti a un elevato dosaggio (es. elevati dosi di gabapentin possono indurre effetti collaterali del SNC come sonnolenza, vertigini, confusione e nausea), possono far desistere i pazienti dall'osservare il regime raccomandato, con una minor soddisfazione circa l'effetto analgesico del farmaco. Molti trattamenti per via sistemica hanno un rapido onset d'azione e raggiungono uno stato stazionario rapidamente, ma la risposta analgesica può essere protratta a 2 o 3 settimane dall'inizio del trattamento per alcuni farmaci (come gli antidepressivi triciclici), a

causa dell'alterazione a lungo termine del numero di recettori o della sensibilità, e anche ciò fa sì che il paziente sia insoddisfatto del trattamento. In altri casi, i pazienti possono essere invece portati ad abusare delle sostanze analgesiche, specialmente nel caso degli oppioidi, dove lo sviluppo della dipendenza è un problema di grave entità nelle terapie del dolore a lungo termine. Con alcune terapie del dolore, l'efficacia diminuisce di pari passo nel tempo allo sviluppo della tolleranza. Ad esempio, gli oppioidi e gli antagonisti NMDA inducono un rapido sviluppo di tolleranza, con la necessità di dosi sempre più elevate.

Date tutte queste problematiche, la ricerca di nuove terapie che limitino le complicazioni mantenendo la qualità terapeutica a tutt'oggi continua.

Le attuali strategie terapeutiche per il dolore neuropatico mirano alla riduzione dell'eccitabilità dei neuroni nel sistema nervoso periferico o nel SNC modulando l'attività dei canali ionici (gabapentin, pregabalin, carbamazepina, lidocaina e capsaicina), oppure mimando e aumentando l'attività dei meccanismi inibitori endogeni (antidepressivi triciclici, duloxetina e oppioidi). Considerando che il coinvolgimento delle cellule immunitarie e della glia nello sviluppo del dolore neuropatico non è stato ancora ben chiarito, e dato l'enorme bisogno di progressi terapeutici in questo campo, sorprendentemente sono stati fatti ancora solo pochi studi clinici sull'utilizzo di farmaci immunosoppressivi o sostanze capaci di interferire con le funzioni della glia per il dolore neuropatico. Diversi studi preclinici hanno analizzato alcune modalità di modulazione immunitaria e gliale. Inibitori globali del metabolismo della glia, come il fluorocitrato, la propentofillina, minociclina e teriflunomide riducono il rilascio di citochine e attenuano il comportamento di risposta al dolore in vari modelli animali di dolore neuropatico (Watkins & Maier 2003; Clark et al.



2007; Tawfik et al. 2007; Ledebor at al. 2005; Raghavendra et al. 2003; Sweitzer & DeLeo, 2002). Inoltre, il fondamentale ruolo di p38, JNK ed ERK nell'attivazione di microglia e astrociti rende le MAP kinasi dei target farmacologici promettenti (Jin et al., 2003; Svensson et al. 2005; Zhuang et al. 2005). Tuttavia, le MAP kinasi sono fondamentali per numerosi processi cellulari, come la proliferazione e la differenziazione, la risposta allo stress e l'apoptosi. Esse sono coinvolte nello sviluppo e nei processi di apprendimento e memoria, perciò l'applicazione sistemica di inibitori farmacologici porterebbe il rischio di interferire con questi importanti processi. Tuttavia, gli inibitori della p38 MAPK sono stati valutati per il trattamento delle artriti reumatoidi e potrebbero essere molto utili nel trattamento del dolore neuropatico.

Alcune recenti scoperte hanno indicato che alcune neurotossine somministrate perifericamente sembrano avere un efficace effetto analgesico. Le neurotossine del botulino (BoNTs) sono state descritte come un nuovo prodigioso antinocicettivo (Lim e Seet, 2007; Apfel et al., 2009), ed è di esse che in questo lavoro tratterò più in dettaglio.

## 1.8 – Le neurotossine botuliniche (BoNTs)

---

La storia delle neurotossine botuliniche (BoNTs) inizia nel 1817 quando fu pubblicata la prima descrizione del botulismo. L'autore, Justinus Kerner, associò la causa dei decessi per intossicazioni con un veleno trovato nelle salsicce affumicate (in Latino, *botulus* significa appunto salsiccia). Egli concluse che il veleno interferiva con l'eccitabilità del sistema nervoso motorio e autonomo. Ciò portò alla pubblicazione di due studi, che descrivevano le caratteristiche cliniche del botulismo (Dressier et al., 2005). Kerner propose alcuni potenziali usi terapeutici del botulino a quel tempo, specialmente nei disordini del sistema nervoso centrale, ipotesi che sono state successivamente supportate in studi successivi. Nel 1895 l'agente batterico, come il meccanismo di azione responsabile per la tossicità del botulismo, furono scoperti dal Professor Emile Van Ermengen (Lang, 2004). Le BoNTs, tra le più potenti tossine batteriche conosciute al mondo, sono prodotte dal batterio *Clostridium botulinum*, un organismo anaerobio Gram-negativo che si trova comunemente nel terreno e negli oceani di tutto il mondo (Wenzel, 2004). Sette serotipi di questo batterio (A, B, C1, D, E, F e G) sono neurotossine (il botulino C2, invece, anche se prodotto dal *C. botulinum*, non è una neurotossina) (Setler, 2002). Anche se tutti i serotipi inibiscono il rilascio di acetilcolina dalle terminazioni nervose, le loro proteine intracellulari, i meccanismi di azione e la loro potenza varia considerevolmente. Il serotipo A è stato quello più estesamente studiato e utilizzato in clinica; tuttavia, sta crescendo anche il numero di studi sugli effetti degli altri serotipi. Nel 1978, Alan Scott condusse il primo test utilizzando il serotipo A in pazienti umani per il trattamento dello strabismo

(Lang, 2004). In seguito, il suo uso fu esteso anche a distonie segmentali, tremori e altri movimenti anormali. Nel 1989, la tossina botulinica fu per la prima volta utilizzata per il trattamento della spasticità; vennero pubblicati i risultati dell'iniezione della tossina in muscoli affetti da severi spasmi, in pazienti con emiplegia secondaria a un trauma. Rapidamente, i neurologi realizzarono il potenziale dell'utilizzo delle BoNTs nei disordini neurologici dovuti all'eccessivo tono o contrazione della muscolatura (Aguilar-Rebolledo et al., 2001). Fu utilizzata l'Unità Internazionale (IU) per definire la potenza biologica di tutte le preparazioni di BoNTs, per cui una IU è data dall'ammontare di tossina capace di uccidere la metà di una popolazione di topi di laboratorio (DL50) (Wohlfarth et al., 2004).

Il principio attivo delle BoNTs consiste in un complesso proteico di 150 kDa legato tramite un legame non-covalente a una proteina accessoria non-tossica, che la protegge e stabilizza, risultando in un peso molecolare finale che può variare da 300 kDa a 900 kDa (Dressier et al., 2005; Wenzel, 2004; Setler, 2002). La composizione e il peso totale molecolare del complesso macromolecolare dipende dal serotipo e dalle specie di *C. botulinum* che lo producono, come dalla purificazione e dai metodi di analisi.

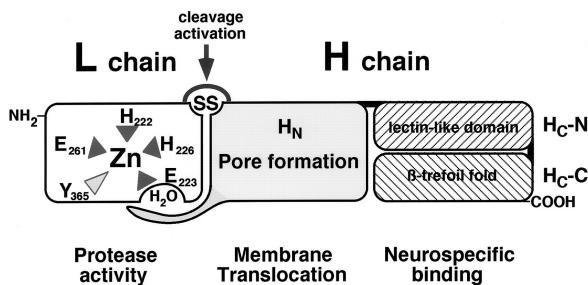


Figura 10. Struttura schematica delle BoNTs.

Commercialmente, i serotipi A (BoNT/A) e B (BoNT/B) sono agenti biologici ottenuti in laboratorio, e sono sostanze stabili, cristalline e liofilizzate, associate all'albumina umana, e utilizzate dopo normale diluizione in salina (Unno et al., 2005). In condizioni fisiologiche, si prevede che il complesso si dissocia fino a rilasciare neurotossina pura, dato che tali complessi sono stabili solo in pH acido (Setler, 2002).

Il complesso proteico di 150 kDa delle BoNTs è composto da una catena leggera e una pesante, collegate da un ponte disolfuro (Figura 10). La catena pesante è responsabile per l'internalizzazione della tossina nei terminali presinaptici colinergici. La catena leggera, invece, è una zinco endopeptidasi responsabile degli effetti tossici. Alcuni studi biochimici hanno dimostrato che queste proteine sono proteasi altamente specifiche che tagliano le proteine presinaptiche SNARE (Soluble NSF Attachment protein receptors), coinvolte nel processo di esocitosi delle vescicole sinaptiche nei terminali nervosi. La distruzione di queste proteine presinaptiche è la base dell'azione di blocco delle BoNTs del rilascio dei neurotrasmettitori (Purves et al. 2004).

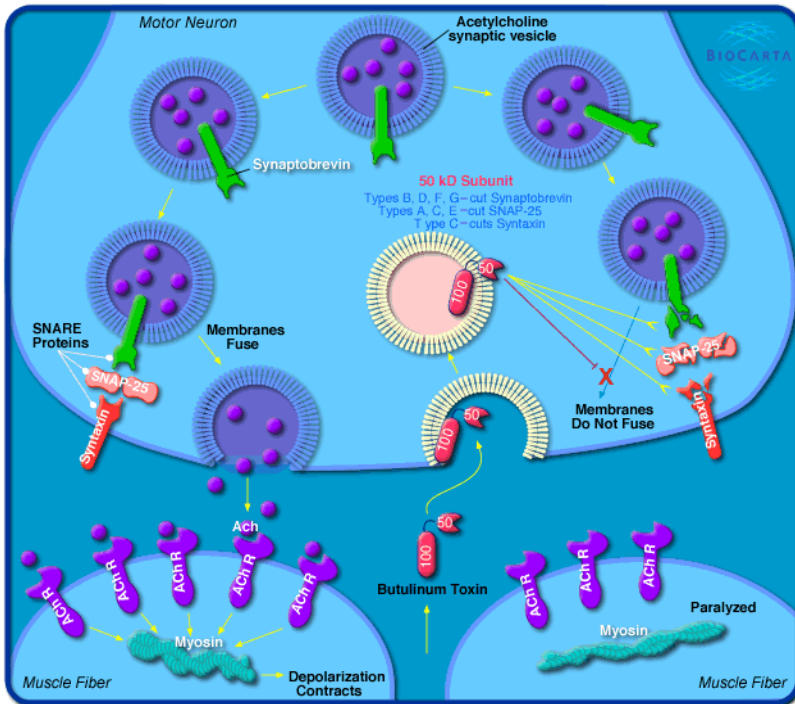
Le BoNTs sono neurotossine con una elevata affinità per le sinapsi colinergiche, bloccando il rilascio di acetilcolina da queste terminazioni nervose; tuttavia, esse non cambiano la conduttività nervosa dei segnali elettrici, né la sintesi e l'immagazzinamento di acetilcolina (Unno et al., 2005). L'iniezione intramuscolare di BoNTs in appropriate dosi e siti induce una parziale denervazione chimica e la riduzione della contrazione muscolare, senza causare una paralisi completa. Nel tessuto ghiandolare, esse bloccano la secrezione. Dopo somministrazione locale intramuscolare di una certa diluizione di BoNTs, esse si depositano rapidamente nel tessuto interstiziale e specificamente nel terminale del motoneurone del muscolo scheletrico (giunzione neuromuscolare).

L'inibizione del rilascio di acetilcolina è costituita da alcuni passi (Figura 11). Per prima cosa, le BoNTs parassitano il processo fisiologico del riciclo delle vescicole sinaptiche per entrare nei neuroni. Esse si legano alla superficie interna delle vescicole sinaptiche durante la loro esposizione allo spazio esterno, e vengono internalizzate dall'endocitosi delle vescicole (Verderio et al. 2006).

Sono stati individuati gli specifici recettori di alcuni serotipi di BoNTs: SV2 per la BoNT/A (Dong et al. 2006), con un'affinità di legame differente per le 3 isoforme (l'affinità per SV2c è maggiore di quella per SV2a, a sua volta maggiore di SV2b). SV2c è espresso nelle giunzioni neuromuscolari, e nei neuroni inibitori della corteccia. SV2a è espresso sia perifericamente che centralmente in entrambi i neuroni eccitatori e inibitori. Infine SV2b è espresso perifericamente, e centralmente solo nei neuroni eccitatori (Verderio et al. 2006).

Il sito recettoriale della BoNT/B è invece Syt (Dong et al. 2003), sia per Syt-I, espressa centralmente nei neuroni sia inibitori che eccitatori, ma non perifericamente nelle giunzioni neuromuscolari, sia per Syt-II, espressa sia perifericamente che centralmente. Tuttavia, nei termini di un modello "a doppio recettore", i gangliosidi cooperano con le proteine SV per mediare il legame delle BoNTs al terminale presinaptico, anche se da soli sono sufficienti per far legare specificatamente le BoNTs (Verderio et al. 2006).

Dopo l'internalizzazione, la molecola è separata in due catene polipeptidiche da specifiche proteasi presenti nella vescicola sinaptica. Il taglio delle BoNTs è considerato lo step decisivo per la loro attivazione, poiché il complesso molecolare di 150 kDa ha poca attività farmacologica. Il taglio risulta in due frammenti



**Figura 11.** Meccanismo di azione delle BoNTs al livello della giunzione neuromuscolare.  
Fonte: biocarta.com.

polipeptidici: una catena pesante di 100 kDa e una catena leggera di 50 kDa. La catena leggera è quindi translocata attraverso la membrana della vescicola endocitica nel citosol, dove mostra un'elevata specificità per le proteine del complesso proteico SNARE.

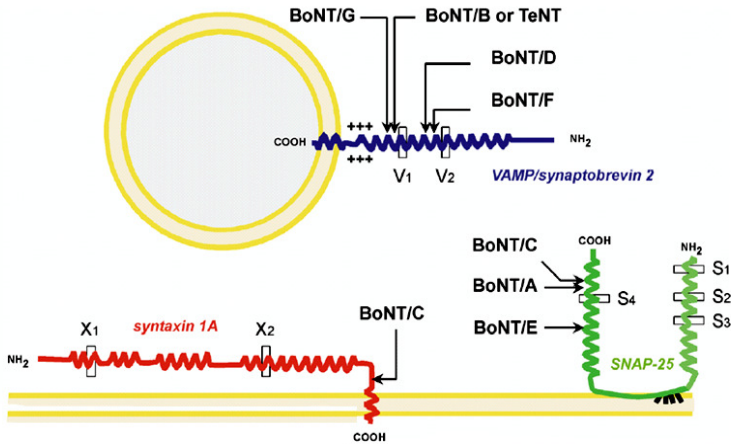
La proteina target varia in accordo al serotipo. Funzionando come enzimi, le catene leggere di ciascun serotipo tagliano uno specifico legame peptidico in uno o più siti delle proteine SNARE, in modo tale che nessuno dei serotipi si attacchi nella stessa posizione;

pertanto la loro azione e potenza varia considerevolmente, nonostante tutti i serotipi abbiano lo stesso effetto finale: l'inibizione del rilascio di acetilcolina dalle terminazioni nervose (Setler, 2002).

La BoNT/A e la BoNT/E tagliano la proteina SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein of 25 kDa), mentre la BoNT/C si comporta come proteasi della syntaxina; entrambe sono proteine SNARE della membrana presinaptica (Figura 12). Invece i serotipi B, D, F e G tagliano specificamente la VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein), meglio conosciuta come sinaptobrevina II, una proteina collocata nella vescicola sinaptica (Dressler, 2005; Aoki, 2005). Il taglio proteolitico del complesso SNARE da parte della catena leggera delle BoNTs previene l'ancoraggio delle vescicole sinaptiche sulla superficie interna della membrana cellulare, bloccando perciò la fusione delle vescicole e prevenendo il rilascio di acetilcolina, determinando lo sviluppo di una paralisi flaccida nelle fibre muscolari affette (denervazione chimica). Ciò si traduce clinicamente in una paralisi o debolezza dose-dipendente del muscolo scheletrico. L'effetto iniziale sui muscoli incide sulla funzione del motoneurone alfa, responsabile della stimolazione delle fibre muscolari, ma le BoNTs possono avere effetto anche sul motoneurone gamma, che innerva il fuso neuromuscolare.

La loro inibizione risulta in una riduzione nel tono muscolare, dovuta alla conseguente riduzione del feedback afferente sul motoneurone alfa dal fuso neuromuscolare (Dressler, 2005; Freund e Schwartz, 2003; Aoki, 2001) (Figura 13).

L'inizio dell'azione delle BoNTs sui muscoli scheletrici avviene entro pochi giorni (da 2 a 5). Una volta consolidato, l'effetto dura da sei settimane a sei mesi (in media 3-4 mesi).

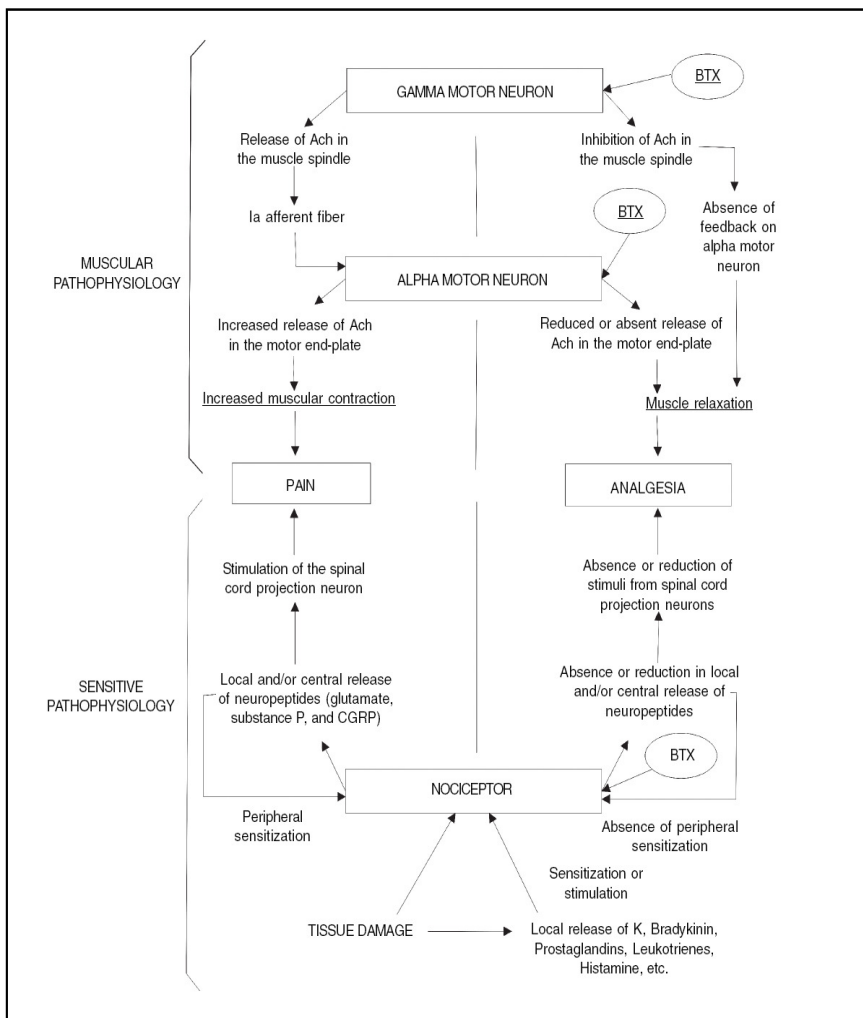


**Figura 12.** Taglio selettivo, da parte delle BoNTs, delle proteine del complesso SNARE (adattato da Humeau et al. 2000).

Nel periodo in cui l'effetto è maggiormente intenso, gli esami istologici rivelano atrofia muscolare e cambiamenti delle fibre (Unno et al., 2005). Dopo 2-3 mesi, l'azione delle BoNTs inizia gradualmente a decrescere.

Tre sono i meccanismi responsabili per l'inversione della paralisi locale: 1) il *neuronal budding*, fenomeno che vede la formazione di collaterali assionali, reinnervazione e la formazione di nuovi EPPs di minor ampiezza, con una temporanea reinnervazione muscolare (recettori extra-giunzionali per l'acetilcolina), 2) la rigenerazione di proteine d'accoppiamento per l'acetilcolina all'interno delle vescicole (complesso SNARE) (Cardoso, 2003), la cui funzione viene ristabilita entro 1-4 mesi (Freund e Schwartz, 2003), e 3) la degradazione proteasica delle catene polipeptidiche delle BoNTs.





**Figura 13.** Schema dell'azione analgesica della tossina botulinica. Sulla sinistra, la patofisiologia muscolare e sensoriale che innesca il dolore. Sulla destra, l'effetto analgesico della tossina su questi meccanismi patofisiologici (adattato da Colhado et al., 2009).

Recentemente, è stato dimostrato che la BoNT/A può essere cataliticamente attiva anche a distanza del sito di iniezione, e che dai terminali presinaptici può essere retrogradamente trasportata ai neuroni centrali, dove sarebbe in grado di tagliare la SNAP-25 delle sinapsi afferenti, raggiungendole per transitosi (Antonucci et al. 2008).

Dosi elevate di BoNTs, un'applicazione frequente e un elevato carico proteico associato all'utilizzo di prodotti commerciali contenenti botulino, possono incrementare il rischio di sviluppo di anticorpi. Quando si formano anticorpi contro le BoNTs, la durata dell'azione e la durata massima degli effetti terapeutici in genere decrementano dopo poche somministrazioni, con un parziale fallimento terapeutico.

Alcuni studi hanno dimostrato che gli anticorpi contro la BoNT/A non hanno alcun effetto contro la BoNT/B. Poiché BoNT/B si lega a un sito di membrana diverso, ciò può costituire una strategia per il trattamento dei pazienti immunologicamente reattivi alla BoNT/A. Tuttavia, è stato visto in ulteriori studi clinici che la BoNT/B sembra essere meno potente della BoNT/A, in quanto la sua attività di taglio e la conseguente attivazione occorre in minore proporzione, con la necessità di dosi più elevate in IU, quindi con un carico proteico maggiore e un maggior potenziale di immunogenicità. E' stato visto che è necessaria una dose tra 7500 e 10000 IU di BoNT/B per produrre un ragionevole effetto terapeutico nei pazienti affetti da distonia cervicale, mentre gli stessi effetti terapeutici vengono ottenuti con solamente 150 – 200 IU di BOTOX® e 500 – 700 IU di DYSPORT®, le preparazioni commerciali più utilizzate della BoNT/A. Ciò significa un fattore di conversione dell'ordine da 40 a 70 volte dal BOTOX® alla BoNT/B, e da 10 a 20 volte dal DYSPORT® alla BoNT/B. Inoltre, la BoNT/B sembra indurre un maggior numero di effetti collaterali

nei pazienti; ad esempio, i pazienti con distonia cervicale trattati con BoNT/B presentano una maggior incidenza di secchezza della bocca e disturbi visivi con un'incidenza del 30%, rispetto a quelli trattati con BoNT/A. Senza un esatto criterio di conversione, risulta difficile comparare l'efficacia di queste tossine, gli effetti collaterali e i costi del trattamento, perciò emerge la necessità di effettuare ulteriori studi di comparazione tra BoNT/A e BoNT/B.

### ***1.8.1 – Le BoNTs per il trattamento del dolore***

E' stato provato che le BoNTs possono indurre una debolezza selettiva dei muscoli dolorosi, interrompendo gli spasmi muscolari che inducono dolore, fornendo un sostenuto effetto di sollievo dal dolore stesso, e permettendo ai pazienti di effettuare l'esercizio fisico, che è fondamentale per il recupero a lungo termine (Graboski et al., 2005). Come già menzionato, le BoNTs vennero utilizzate inizialmente nel trattamento dei disordini motori, come le distonie; ulteriori studi hanno dimostrato benefici significativi sul dolore associato a queste sindromi, e spesso l'effetto di sollievo dal dolore superava il miglioramento degli spasmi muscolari, oltre a non corrispondere strettamente all'area neuromuscolare trattata. Ciò suggerì che queste tossine potessero avere un effetto diretto sui meccanismi del dolore, indipendentemente dalla loro azione neuromuscolare.

Nell'uomo, i significativi effetti analgesici della BoNT/A sono stati dimostrati inizialmente nel trattamento della distonia cervicale. Anche se gli effetti anti-spasmodici e anti-distonici dovuti alla somministrazione di BoNT/A sono stati attribuiti al blocco del rilascio di acetilcolina dalle vescicole sinaptiche, recenti studi animali suggeriscono altri meccanismi analgesici per questa

neurotossina. Al momento, le evidenze suggeriscono che le proprietà analgesiche osservate siano parte di un più complesso meccanismo di analgesia che vada oltre il semplice rilassamento muscolare. Da questi studi emerge la possibilità che vi sia una complessa interazione delle BoNTs con il tessuto periferico, e alcune influenze indirette sui meccanismi centrali del dolore (Freund e Schwartz, 2003; Aoki, 2001). Come già menzionato, l'apparente specificità delle BoNTs per i terminali colinergici *in vivo* è dovuta alla presenza di specifici recettori o accettori nella membrana delle terminazioni nervose motorie. Alternativamente, è stato osservato in modelli sperimentali che l'internalizzazione delle BoNTs nelle terminazioni nervose inibisce immediatamente l'esocitosi di altri neurotrasmettitori, coinvolti nella trasmissione o modulazione dell'informazione nocicettiva, come la norepinefrina (Baltazar et al. 2000), il glutammato (Cui et al. 2004; Verderio et al. 2004), GABA (Verderio et al. 2004) e monoamine (Murakami et al. 2001), e il meccanismo di azione sembra essere lo stesso osservato nelle sinapsi colinergiche, nonché il taglio del complesso SNARE. Tuttavia, *in vivo* molte cellule nervose mancano dei recettori o accettori extracellulari responsabili per l'internalizzazione delle BoNTs, rendendo questo processo non molto efficace, in quanto l'unica via alternativa per entrare nelle terminazioni nervose sarebbe il percorso non-specifico della pinocitosi. In base a ciò, è possibile affermare che l'elevata affinità delle BoNTs per le sinapsi di tipo colinergico è una parte del processo che le rende così efficaci nei disordini neuromuscolari. D'altra parte, sono state osservate in laboratorio numerose eccezioni a questa specificità. La BoNT/A è stata associata anche al blocco del rilascio di sostanza P in colture di neuroni dei gangli delle radici dorsali di embrioni murini (Ishikawa et al. 1999), come alla riduzione del rilascio stimolato (ma non del rilascio basale) di

CGRP in colture di neuroni del ganglio del trigemino (Meng et al. 2007). Inoltre, è stato visto che la precedente iniezione sottocutanea di BoNT/A nella zampa di topi attenua significativamente la risposta infiammatoria di dolore (*licking*) indotta dalla successiva somministrazione sottocutanea di formalina, un agente che induce dolore tonico (Luvisetto et al. 2006; Cui et al. 2004), oltre a ridurre il rilascio di glutammato dall'assone periferico dei nocicettori (Cui et al. 2004). E' stata dimostrata anche una ridotta attività nei neuroni del corno dorsale del midollo spinale.

Presi insieme, questi dati puntano verso un'azione inibitoria diretta della BoNT/A sui nocicettori, promossa dall'inibizione del rilascio di neuropeptidi (glutammato, CGRP e sostanza P) responsabili per la neurotrasmissione e/o la sensitizzazione periferica e centrale delle vie del dolore (Fig.1). Quindi, oltre ad essere potenti inibitori del rilascio di acetilcolina, le BoNTs inibiscono anche altri neurotrasmettitori e neuropeptidi coinvolti nell'infiammazione e nel dolore (Aoki, 2005; Sycha et al., 2006; Sheeran, 2002). Nonostante siano necessari ulteriori studi per delucidare i meccanismi coinvolti nell'azione inibitoria, è possibile affermare che le BoNTs possono interrompere il segnale del dolore in almeno quattro possibili modalità: 1) normalizzando l'iperattività muscolare, 2) normalizzando l'eccessiva attività del fuso muscolare, 3) attraverso un flusso retrogrado verso il SNC, e 4) inibendo il rilascio di neuropeptidi dai nocicettori, sia nel tessuto periferico che nel SNC (Aoki, 2005; Gobel et al., 2001).

Nel 1990 negli USA, il NIH (National Institutes of Health) ha rilasciato un consenso sull'utilizzo clinico delle BoNTs: "La tossina del botulino è un trattamento sicuro ed efficace per lo strabismo e per il trattamento sintomatico del blefarospasmo, dello spasmo emifacciale, della distonia spasmodica dell'adduttore, del

bruxismo, del digrignamento dei denti, della distonia mandibolare e della distonia cervicale (indicazioni approvate dalla Food and Drug Administration, FDA); tutti gli altri usi sono senza regolamento della FDA”; e inoltre: “La tossina del botulino è promettente nel trattamento di altre condizioni; tuttavia, sono necessari ulteriori studi per l’utilizzo nei seguenti disordini: distonia focale e segmentale, inclusa la distonia delle mani e delle membra, ipercontrattilità dello sfintere anale interno, dissinergia del detrusore (di solito come conseguenza di una lesione spinale), spasticità, distonia spasmodica dell’adduttore, tremore vocale e balbuzie. Si incoraggiano studi clinici supplementari per delucidare le diverse domande ancora senza risposta circa il botulino e i suoi usi terapeutici” (Lang, 2004).

Gli studi che utilizzavano la BoNT/A furono la base di questo riferimento. Immediatamente dopo, anche la BoNT/B fu introdotta negli studi clinici per la distonia cervicale, e fu dimostrata la sua efficacia e sicurezza. L’utilizzo delle BoNTs per la distonia focale divenne diffuso. Fu inoltre riferita la sua efficacia sulla spasticità e su altri disordini neurologici. La sicurezza del trattamento con le BoNTs ha permesso il suo utilizzo nell’estetica, e in altre sindromi come l’iperidrosi, la scialorrea e il dolore da tensione. L’efficacia in ciascuna di queste applicazioni può essere prontamente spiegata dagli effetti delle BoNTs sulla trasmissione colinergica (Lew, 2002). E’ stato valutato l’uso clinico del serotipo F, dimostrando la breve durata dei suoi effetti. Per quanto riguarda il serotipo C, ad oggi sono stati riportati benefici solamente in tre casi clinici: uno di blefarospasmo e due di emispasma facciale idiopatico (Aoki, 2001).

Solamente due serotipi sono disponibili in commercio. La prima formulazione del serotipo A fu introdotta negli USA nel 1989 dalla Allergan come BOTOX®. Nel 1991, una formulazione differente

fu introdotta fuori dagli USA dalla Ipsen come DYSPOUR®. Il serotipo B fu approvato dalla FDA nel 2000 e venne commercializzato negli USA dalla Elan Pharmaceuticals come MYOBLOCK® (conosciuto in Europa come NEUROBLOC®). Inoltre nel 2002, la BoNT/A fu commercializzata dalla Allergan come BotoxCosmetic® per l'utilizzo estetico (BOTOX® e BotoxCosmetic® hanno la stessa formulazione). Ad oggi, la BoNT/A è stata utilizzata per trattare più di un milione di pazienti nel mondo, e il suo uso clinico è stato approvato in 73 paesi. Utilizzate per vent'anni nel trattamento di una varietà di disordini caratterizzati dall'incremento patologico del tono muscolare, recenti studi sperimentali hanno cercato di focalizzarsi su una nuova area di utilizzo delle BoNTs, ovvero il trattamento di specifiche sindromi di dolore, in primo luogo il dolore di testa, il dolore cervicale, il dolore del cingolo scapolare, e il dolore miofasciale dorsale, sindromi resistenti ai trattamenti correntemente disponibili. Numerose pubblicazioni hanno dimostrato l'efficacia e la sicurezza della BoNT/A nel trattamento del dolore di testa da tensione, dell'emicrania, del dolore cronico lombare e del dolore miofasciale (Klein, 2004).

La nocicezione può essere incrementata dal rilascio di agenti pro-infiammatori, come citochine, adenosina, bradichinina, serotonina e prostaglandine, che possono alterare o sensibilizzare la trasmissione neuronale e creare uno stato temporaneo di dolore neuropatico. D'altra parte, il dolore neuropatico cronico può risultare da una lesione al sistema nervoso centrale o periferico, costituendo una anormalità nella trasmissione nervosa, secondaria al danno. I pazienti affetti da sindrome dolorosa regionale complessa di tipo I (CRPS I) frequentemente riferiscono dolore miofasciale nei muscoli circostanti l'arto affetto, dimostrando che differenti tipi di dolore possono coesistere nello stesso paziente

(Allen et al., 1999). I pazienti con dolore miofasciale possono avere sensazioni caratteristiche del dolore neuropatico, come iperestesia, parestesia, bruciore, pizzicori, e allodinia. E' stata inoltre osservata una disfunzione autonoma nei punti di innesco del dolore, e in punti ad esso distali. L'importanza dell'utilizzo della BoNT/A nei muscoli prossimali alla lesione, come nelle regioni paracervicali, suboccipitali e periscapolari, è stata dimostrata nei pazienti con CRPS I che presentano una concomitante sindrome di dolore miofasciale (Porta, 2000). Nel 2002, in uno studio sull'efficacia della BoNT/A nel trattamento del dolore bruciante segmentale originante nella colonna spinale, due pazienti con lesione spinale a livello cervicale che svilupparono allodinia, iperestesia e dolore bruciante spontaneo con distribuzione segmentale, furono trattati con iniezioni sottocutanee di BoNT/A ogni tre mesi per tre anni (Porta, 2000). L'autore concluse che l'iniezione sottocutanea di BoNT/A può ridurre i sintomi del dolore neuropatico, attraverso il cambiamento dei meccanismi periferici della trasmissione del dolore, con la conseguente riduzione della sensitizzazione centrale.

Il trattamento adiuvante con la terapia fisica è importante per massimizzare i benefici delle BoNTs. Lo stiramento passivo è particolarmente benefico immediatamente dopo l'iniezione della tossina, allo stesso modo dei massaggi profondi per il rilassamento muscolare e l'incremento nell'ampiezza dei movimenti muscolari, dei tendini e dei legamenti. Quando il dolore diventa tollerabile, possono essere eseguiti degli esercizi di stretching attivo. L'obiettivo di questi esercizi è la rieducazione neuromuscolare, interrompendo il ciclo spasmo-dolore amplificato dalla sensitizzazione centrale. Attraverso gli esercizi di riabilitazione neuromotoria, si migliora la postura e la meccanica delle



articolazioni, e possono essere ristabiliti i normali riflessi tendinei (Aoki, 2005).

Aldilà dei disturbi dovuti a iperfunzionalità colinergica, e al loro trattamento con le BoNTs, nel trattamento delle neuropatie le tecniche di riabilitazione neuromotoria assumono un ruolo determinante per il recupero funzionale. Vediamo più in dettaglio in cosa consistono queste tecniche.

## **1.9 - La riabilitazione clinica delle neuropatie periferiche**

---

Le patologie neurologiche da cause professionali o da traumi accidentali sono in costante aumento, e parimenti è in crescita la richiesta da parte dei pazienti di un trattamento riabilitativo che permetta loro la possibilità, oltre di riacquistare una normale qualità della vita, di un reinserimento nel mondo del lavoro. Questa spinta ha generato negli ultimi anni uno sviluppo sempre maggiore di tecnologie e di specializzazioni neuroriabilitative riguardanti le patologie del SNC, mentre ben poco è stato compiuto per ciò che concerne le patologie del nervo periferico.

In ambito clinico, mentre la riabilitazione delle lesioni centrali ha visto la nascita di numerose sub-specialità, quali le stroke units e le unità spinali, la riabilitazione delle lesioni nervose periferiche non possiede ancora delle linee guida standardizzate che permettano di individuare quale sia il trattamento più indicato per le diverse forme cliniche (Casale et al. 2003).

I malati neuropatici, sofferenti per la sintomatologia dolorosa e disestesica, riducono la loro attività rinunciando a movimenti che potrebbero in qualche modo scatenare od accrescere la sintomatologia algica. La mobilizzazione sia passiva che attiva assistita favorisce nei pazienti la funzione trofica, metabolica e circolatoria del muscolo, delle parti molli, dell'osso e delle articolazioni (Oerlemans et al., 1999a,b). Tali aspetti, insieme alla riduzione dell'edema, contribuirebbero al controllo di fattori locali che, secondo una teoria metabolica, faciliterebbero la sensibilizzazione dei nocicettori e la cronicizzazione del dolore (Casale et al. 2003).

Tra i principali trattamenti clinici attualmente in uso per la riabilitazione delle varie forme di neuropatia è previsto anzitutto l'esercizio fisico come strumento terapeutico. Esso può essere generalmente distinto in chinesiterapia passiva e attiva.

La *chinesiterapia passiva* utilizza movimenti passivi nei casi in cui il movimento volontario risulta impossibile. L'obiettivo principale è quello di migliorare la circolazione locale riducendo la stasi venosa e linfatica. Il movimento passivo consente inoltre di evitare la rigidità articolare, la retrazione tendinea, la contrattura muscolare dovute all'immobilità protratta. Per *chinesiterapia attiva* si intende invece l'utilizzo del movimento attivo come strumento terapeutico. Generalmente, nelle lesioni complete, essa segue la chinesiterapia passiva al comparire dell'attività volontaria.

Non esistono studi clinici controllati che valutino, in modo comparativo l'efficacia delle diverse tecniche di riabilitazione motoria. Si ritiene comunemente che, tanto più precoce è la riabilitazione, tanto migliore sarà il risultato riabilitativo (Casale et al. 2003; Chow, 1989; Berger et al., 1988).

Nell'uomo, a seconda della lesione e del grado di recupero funzionale raggiunto, vengono utilizzate diverse tecniche, tra cui:

- manovre di facilitazione dell'attivazione motoneuronale: indotte in assenza di movimento, facilitano l'attivazione dei motoneuroni inattivi in quanto vengono attivati i motoneuroni adiacenti;
- esercizi in favore di gravità: possono essere eseguiti subito dopo la comparsa dell'attività volontaria, quando risulta impossibile compiere esercizi contro gravità;
- esercizi contro gravità: da effettuare tutte le volte che il movimento contro gravità è possibile;

- esercizi contro resistenza: per incrementare la forza una volta acquisito il movimento;
- esercizi per la coordinazione: in condizioni fisiologiche, affinché venga eseguito un movimento in modo corretto, è necessario che tutte le componenti muscolari, da prime mover, cioè quel muscolo o parte di esso che principalmente “muove” l’articolazione, siano costantemente sotto un raffinato controllo neuromotorio. In seguito a un danno nervoso, l’attività del prime mover viene sostituita dall’attività di muscoli sinergici o stabilizzanti, il che porta, come conseguenza, alla genesi di un movimento scoordinato che va corretto;
- elettrostimolazione: per mantenere l’attività muscolare durante il periodo di immobilità o reinnervazione, e per stimolare la rigenerazione nervosa periferica (Gordon et al., 2007);
- locomozione al treadmill: per stimolare il recupero funzionale dopo una trauma o una lesione (Moseley et al., 2005);
- tecniche di biofeedback elettromiografico: basate sull’auto-controllo dell’attività fisiologica;
- massoterapia: in caso di lesione completa del nervo, permette di migliorare la circolazione, soprattutto migliorando il ritorno venoso e ostacolando la stasi linfatica;
- tecniche di rieducazione sensitiva: il mantenimento di adeguate stimolazioni è indispensabile per un buon recupero sensitivo, in quanto è noto che l’immobilità provoca una degenerazione dei recettori, mentre la loro stimolazione con stimoli comune induce la formazione di nuovi recettori (Weddell, 1961);
- ortesi: ovvero l’applicazione di presidi esterni per migliorare una funzione ridotta o sostituirne una persa;

- training e tecniche di rilassamento: sono in grado di ridurre o prevenire l'aumento dell'attività adrenocorticale stress-indotta, nonché di ridurre il livello delle catecolamine circolanti.

Nei modelli animali di lesione nervosa centrale e periferica, i trattamenti riabilitativi più estesamente studiati sono stati la stimolazione elettrica e la locomozione al treadmill, ed è stato visto che entrambi possono avere effetti positivi di incremento del recupero funzionale e di stimolazione dei processi di rigenerazione nervosa a seguito di una lesione nervosa periferica (Marqueste et al. 2004; Asensio-Pinilla et al. 2009). In questo lavoro, l'attenzione è focalizzata sulla locomozione al treadmill.

## 1.10 – Esercizio fisico e locomozione al treadmill

---

Vi sono numerosi studi nell'uomo, come negli animali, che provano come l'applicazione di procedure di riabilitazione motoria, dopo un danno o una lesione nervosa periferica generante un deficit nella funzione motoria, faciliti non solo il recupero della funzione stessa compromessa, bensì anche i processi di crescita e rigenerazione assonale, in particolare mediante l'applicazione di tecniche che promuovono l'uso degli arti affetti (Fouad et al., 2004). Queste tecniche, in particolare l'utilizzo di un programma di allenamento al treadmill, risulta essere applicabile ed effettivo in tutti i mammiferi, poiché hanno in comune un'alternanza ritmica dell'attività di scarica nei muscoli flessori ed estensori degli arti.

Nei quadrupedi, l'attività di scarica di reti spinali organizzate, chiamate "central pattern generators" (CPGs), rende possibile un recupero iniziale molto precoce della locomozione. I CPGs di ciascuna zampa posteriore sono distribuiti lungo la regione lombare della colonna spinale, con i segmenti più anteriori (L2/L4) che sembrano contenere gli elementi primari nella rete. I CPGs di ciascuna zampa conterrebbero già unità generatrici di un'attività di scarica regolata dei muscoli sinergici, in modo che i centri per i muscoli estensori e quelli per i muscoli flessori si inibiscano in alternanza. L'esistenza dei CPGs è indirettamente provata anche nell'uomo, ad esempio i neonati alla nascita, se posti su un tappeto rotante, camminerebbero in continuazione, avendo tuttavia le proiezioni motorie discendenti dal cervello alla spina dorsale ancora immature. Studi in gatti spinalizzati confermano che il comportamento primario di locomozione è inizialmente regolato da circuiti neurali preposti nella colonna spinale, la cui attivazione

viene facilitata dalla stimolazione sensoriale. La stimolazione cutanea, in particolare, sembra essere necessaria per l'iniziazione e il mantenimento dell'attività spontanea dei CPGs.

Nell'attivazione di un pattern locomotorio spinale, e nella sua modulazione, giocano un ruolo fondamentale i sistemi monoaminergici discendenti (noradrenergico, glutamatergico, serotoninergico). E' stata inoltre dimostrata la capacità, da parte di isolate frazioni spinali lombari in gatti e ratti, di generare autonomamente potenti patterns locomotori in presenza (tramite somministrazione intratecale o impianto di neuroni) di un adeguato livello di specifiche amine. Ciò suggerisce la possibilità che le procedure di riabilitazione motoria, quali l'esercizio fisico al treadmill, anticipino e migliorino il recupero di una lesione, non solo stimolando la rigenerazione tramite la formazione di nuove connessioni nervose dagli assoni lesionati, bensì anche stimolando lo sviluppo chimico dei neuroni nelle regioni lombari.

Negli studi animali utilizzando il treadmill, ratti e topi vengono allenati alla locomozione su un treadmill per roditori, in cui è possibile regolare la velocità e l'inclinazione analogamente ai tapis roulant utilizzati dall'uomo. Gli animali vengono rinforzati alla locomozione da un leggero shock elettrico di una griglia elettrificata, posta all'estremità del tappeto, dove essi finiscono se rimangono immobili.

Nel topo normale, il ciclo di locomozione si divide in due fasi: quella di posizionamento o *stance phase*, e quella di scivolamento o *swing phase* (Leblond et al., 2003). La *stance phase* inizia appena la zampa tocca la superficie, e termina appena la zampa inizia il suo movimento in avanti; la *swing phase* ha inizio appena la zampa si muove in avanti, e termina appena tocca di nuovo la superficie. La durata della *stance phase* diminuisce con la velocità, mentre quella della *swing phase* rimane invariata. La

coordinazione tra le due zampe posteriori può essere valutata per coppie di movimenti di zampe omolaterali (sinistra/destra), omologhe (anteriori/posteriori), e in diagonale.

Ad una velocità di locomozione normale, quale 0.15 m/s, le zampe anteriori e quelle posteriori camminano in stretta alternanza: ogni *swing phase* è seguita per metà ciclo dalla *swing phase* della zampa contralaterale, e le anteriori alternatamente alle posteriori. Dopo una lesione, a seconda della sua estensione, la coordinazione del ciclo viene compromessa, fino alla sua perdita totale nel caso di sezione spinale. E' quindi estremamente utile un'analisi comportamentale della locomozione, attraverso parametri la cui valutazione renda possibile quantificare il grado di compromissione della funzione motoria stessa.

### ***1.10.1 – Effetti sul recupero funzionale***

Nei topi, dopo transezione spinale (all'ottava toracica T8) non si hanno movimenti delle zampe posteriori per i primi 5-6 giorni; tuttavia i topi che si allenano al treadmill possono tornare ad esprimere la locomozione delle zampe posteriori a 14 giorni dalla spinalizzazione (Leblond et al., 2003). L'escursione angolare dell'anca, del ginocchio e della caviglia sono simili a quelle dei topi intatti, anche se le articolazioni sono a volte più flesse. L'alternanza asincrona tra le zampe omologhe recupera, mentre la sincronizzazione tra le zampe omolaterali rimane completamente persa.

E' chiaro che, nel caso della perdita completa degli input motori discendenti dal cervello, i CPGs spinali possono essere attivati mediante un meccanismo del tipo dell'arco riflesso, da un'adeguata stimolazione sensoriale periferica. Tuttavia, sembra che l'efficacia



del treadmill sia non solo nell'attivare e nel facilitare la ripresa di un'attività di scarica spontanea a livello spinale (si parla proprio di una "locomozione spinale"), ma di stimolare e anticipare un recupero funzionale, dovuto all'attivazione dei processi neuroplastici di compensazione e riparazione del danno.

Van Meeteren et al. nel 1997 hanno rivisto gli studi fino allora pubblicati sulla locomozione al treadmill in topi e ratti dove veniva valutato il recupero funzionale motorio seguente lesioni al nervo sciatico. Essi concludono che, se iniziato nella fase di denervazione (nei primi 14 giorni dopo la lesione), un moderato esercizio al treadmill risulta in un accelerato recupero sensorimotorio funzionale, perché l'esercizio sarebbe di beneficio per l'allungamento assonale, la maturazione del nervo, e per il recupero della proprietà di contrazione muscolare. Invece un esercizio forzato, per lo più se iniziato tardivamente nella cosiddetta fase di rigenerazione (dopo 14 giorni dalla lesione), tenderebbe ad avere un effetto deprimente, specie sulla funzione muscolare. Un severo programma di allenamento indurrebbe uno stress risultante in alterazioni fisiologiche e comportamentali, impedendo perlopiù il normale recupero funzionale dopo lesione allo sciatico nei ratti (Van Meeteren et al. 1997).

Per valutare il recupero funzionale, viene utilizzato un indice di funzionalità del nervo sciatico, lo "Sciatic Function Index" o SFI (Van Meeteren et al. 1997). Esso utilizza alcuni parametri anatomici rilevabili dalla semplice misurazione delle orme delle zampe normali e sperimentali degli animali, per quantificare l'afferenza e l'efferenza sensoriale del nervo leso rispetto alla normale trasmissione. E' stato proposto un nuovo indice adattato al topo, lo "Sciatic Static Index" (SSI, Baptista et al., 2007), che prende in considerazione solo i parametri statici del passo, eliminando quindi il bias dovuto alla possibile risposta emotiva di

fuga/immobilità dell'animale, quando è posto nell'apparato di rilevazione delle orme.

Van Meeteren et al. (1997) hanno calcolato un significativo miglioramento dello SFI nei ratti che praticavano esercizio fisico volontario, e successivamente (1998) hanno trovato un peggioramento nei ratti allenati al treadmill per 30 minuti due volte al giorno e per 21 giorni consecutivi dopo la lesione nervosa. Il peggioramento era valutato con l'analisi della locomozione libera e con la risposta riflessa di retrazione alla stimolazione elettrica, e veniva attribuito dagli autori allo stress indotto dallo shock elettrico del treadmill.

Byun et al. (2005) hanno invece calcolato valori più elevati dello SFI in ratti allenati al treadmill dopo lesione del nervo sciatico, allenando gli animali solamente 30 min/die per i primi 12 giorni PO.

Dai numerosi dati spesso contrastanti presenti in letteratura, risulta evidente come emerga la necessità di caratterizzare con maggiore dettaglio almeno due variabili, che sembrano essere fondamentali nella programmazione del protocollo dell'esercizio fisico riabilitativo: l'intensità dell'esercizio, e la finestra temporale entro cui praticarlo dopo la lesione nervosa.

### ***1.10.2 - Stimolazione della rigenerazione nervosa***

E' stato visto che in ratti allenati al treadmill dopo lesione al nervo sciatico (allenati 30 min, due volte/die, fino a 14 giorni PO), l'espressione di Cdc2 (Cell division cycle 2), una proteina della famiglia delle chinasi ciclin-dipendente (Cdk), viene up-regolata nelle cellule di Schwann proliferanti per rigenerazione assonale periferica (Seo et al., 2006). I ratti che si allenavano al treadmill

mostravano assoni più allungati dopo 7-14 giorni dalla lesione, e gli autori hanno proposto che il treadmill possa essere associato ad un'attivazione funzionale della proliferazione delle cellule di Schwann per promuovere la rigenerazione assonale.

In altri studi su ratti, come effetto del treadmill è risultata una normalizzazione del livello spinale e periferico dell'mRNA di BDNF dopo lesione allo sciatico (Byun et al., 2005) e dopo lesione spinale (Hutchinson et al., 2004). L'esercizio fisico in genere sembra far aumentare l'espressione spinale e muscolare anche della neurotrofina NT3 in topi con lesione spinale (Hutchinson et al., 2004). La famiglia delle neurotrofine consiste di 6 proteine (NGF, BDNF, NT-3/4/5/6), che promuovono la sopravvivenza dei motoneuroni (in coltura e in vitro) dopo lesione nervosa, inducendo la maturazione e il potenziamento dei terminali dei motoneuroni in sviluppo.

I livelli delle neurotrofine BDNF, NT-3 e NT-4 sono stati analizzati (Omura et al., 2005) in tre differenti modelli di lesione al nervo sciatico nei ratti (*sciatic nerve transection*, *sciatic nerve crush* e *mild acute compression*), e a seconda del tipo di lesione indotta, il livello delle neurotrofine variava sia nel nervo sciatico che nel muscolo soleo. L'up-regolazione di BDNF nei muscoli denervati suggerisce che esso venga sintetizzato per attrarre la re-innervazione, e il suo livello può essere considerato un parametro per valutare il grado di denervazione dei muscoli target. Livelli elevati di BDNF nelle cellule di Schwann durante gli stadi precoci di mielinizzazione incrementano la velocità e l'estensione dei processi finali, e il BDNF sembra proprio riflettere la fase di mielinizzazione del nervo sciatico leso. Tuttavia i suoi livelli sembrano essere massimi nel nervo e nel muscolo solo in caso di transezione del nervo, ed entro i primi 14 giorni dalla lesione.

NT-3 è la neurotrofina più abbondante nella fase più precoce dello sviluppo nervoso, ma solo durante la fase di mielinizzazione delle cellule di Schwann. Dopo transezione nervosa, i suoi livelli restano invariati invece nella muscolatura scheletrica.

NT-4 agisce invece come potente fattore di sopravvivenza per le sottopopolazioni di motoneuroni. Il suo livello muscolare decresce rapidamente a seguito di transezione del nervo, mentre aumenta dopo *sciatic nerve crush*. Nelle cellule di Schwann, NT-4 regola l'espressione delle glicoproteine associate alla mielina durante la rigenerazione del nervo. Engesser-Cesar et al. (2007) hanno allenato topi con lesione spinale a correre su una ruota rotante, ed hanno trovato, attraverso l'analisi cinematica della corsa su treadmill, che i topi allenati, rispetto al gruppo sedentario, mostravano una migliore abilità alla corsa ed un incremento della lunghezza delle fibre serotoninergiche caudali alla lesione.

In conclusione, sembra che quindi in generale il treadmill svolga un'azione stimolante dei processi di protezione e ricostruzione nervosa a seguito di una lesione. Tutti gli effetti dell'allenamento visti in letteratura, quando positivi, risultavano essere comunque massimi intorno ai 7-14 giorni dalla lesione, cioè tra la cosiddetta fase di denervazione e quella di rigenerazione. Un recente studio di Marqueste et al. (2004) ha dimostrato che l'allenamento al treadmill in ratti con lesione nervosa periferica (lesione e sutura del nervo peroneale) favorisce il recupero della risposta neuromuscolare, in particolare delle fibre afferenti di tipo III (mieliniche sottili) e IV (amieliniche), responsabili in maggioranza della nocicezione e dell'indice di fatica muscolare nella locomozione e nella contrazione muscolare. Il treadmill stimola la rigenerazione e reinnervazione muscolare di queste fibre lese, capaci quindi di individuare e mediare poi i cambiamenti metabolici che accorrono nell'interstitium, nonché della risposta

respiratoria e cardiovascolare durante l'esercizio fisico (queste fibre sono infatti anche chiamate "metaborecettori").

### ***1.10.3 - Fattori neurotrofici e proteine mieliniche***

Le neurotrofine, originariamente descritte per il loro ruolo fondamentale nella crescita e nella differenziazione neuronale, sono state rivalutate per il loro ruolo di regolatrici della plasticità sinaptica. I livelli di neurotrofine e/o dei loro recettori possono essere alterati dall'attività neuronale, con un potenziale cambiamento della trasmissione sinaptica. BDNF e NT3 sono importanti per la regolazione della funzione sensorimotoria, che ha luogo nell'interfaccia tra muscoli, DRG e colonna spinale.

L'espressione di BDNF e NT3 è incrementata nel midollo e nei muscoli scheletrici dopo esercizio fisico volontario (Gomez-Pinilla et al., 2001), e ciò altera l'espressione della sinapsina-I nei motoneuroni. L'esercizio inoltre incrementa la capacità di crescita assonale in colture di neuroni di DRG, e di rigenerazione nervosa in vivo. L'inibizione farmacologica dei recettori TrK per le neurotrofine, prima dell'esercizio, indica che l'attivazione del segnale neurotrofico è necessario all'effetto di priming che l'esercizio ha sulla rigenerazione assonale (Molteni et al., 2004). Animali sottoposti a *sciatic nerve crush* e sacrificati dopo 7 giorni di libero accesso ad una ruota rotante, mostravano neuroni dei DRG (L4-L5) più lunghi degli animali sedentari. La crescita assonale era maggiore e con più ramificazioni nei neuriti dei topi allenati, crescita direttamente proporzionale al numero di circonvoluzioni effettuate con la ruota. Nei neuroni dei ratti allenati, la crescita era indipendente dalla sintesi e trascrizione di nuovo mRNA. Inoltre, in questi animali anche i nervi sciatici

lesionati rigeneravano maggiormente. Già dopo solo tre giorni di esercizio, i livelli di BDNF e NT3 nei DRG erano significativamente aumentati. Anche i livelli dell'mRNA di sinapsina-I e di GAP-43 erano aumentati, indicando un ulteriore sviluppo rigenerativo.

E' evidente quindi che una lesione induce la trascrizione di nuovi prodotti genetici in vivo, i quali stimolano la capacità di ricrescita assonale; l'aumento della crescita e l'aumento delle neurotrofine indotto dall'esercizio (quindi in vivo) attiva l'espressione di proteine che codificano e che sono necessarie per una rapida rigenerazione assonale. L'incremento di sinapsina-I indica che agli assoni in ricrescita (come già visto in caso di assotomizzazione) viene fornito un maggior apporto di questa proteina nelle vescicole sinaptiche, necessaria per la formazione di membrane assoplasmatiche. L'aumento di GAP-43, d'altro canto, correla direttamente con la crescita assonale, come già visto in letteratura.

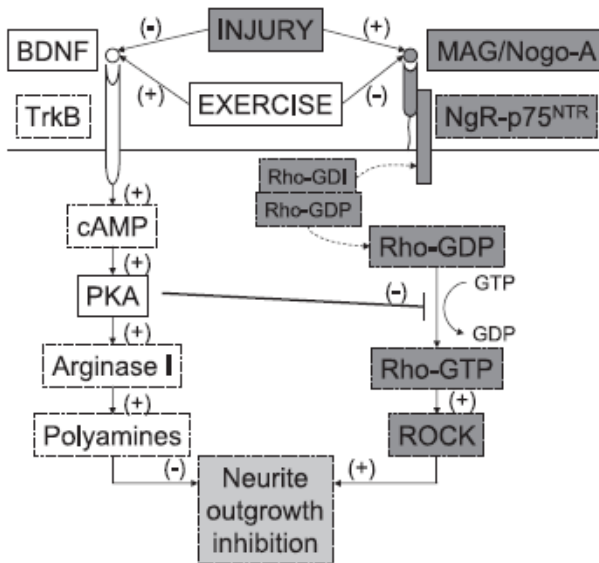
BDNF determina la sintesi e la fosforilazione di sinapsina-I, e ciò risulta in un elevato rilascio neurotrasmettitoriale. La sinapsina può quindi essere usata come marker per valutare il ruolo di BDNF nell'adattamento sinaptico e funzionale. È stato visto nei ratti che il livello di sinapsina-I diminuisce progressivamente dopo lesione spinale. Tuttavia, l'esercizio fisico volontario ne ristabilisce dopo 28 giorni i livelli iniziali (Ying et al., 2005). Sempre in questi ratti, 3 giorni di esercizio erano sufficienti a normalizzare i livelli iniziali di BDNF; questi aumentavano con il protrarsi dell'esercizio nei giorni seguenti la lesione, e l'aumento veniva misurato nei motoneuroni delle corna dorsali. I livelli di NT3 non erano modificati dalla SCI, tuttavia l'esercizio fisico li aumentava.

La proteina di legame del fattore ciclico di trascrizione AMP (CREB) è richiesta per varie forme di memoria spaziale ed apprendimento, e sembra giocare un ruolo fondamentale nella

resistenza nervosa ad un trauma assieme a BDNF. CREB è caratterizzata dall'abilità di modulare l'espressione genetica di BDNF, e quindi la sopravvivenza delle cellule nel SNC. Dopo lesione spinale nei ratti, il livello di CREB tende a diminuire, mentre in quelli allenati esso si mantiene vicino ai livelli di controllo.

Gli effetti benefici dell'esercizio volontario sull'espressione di BDNF, sinapsina-I e CREB sono stati osservati anche dopo *fluid percussion injury* (FPI) nell'ippocampo del cervello di ratti (Giriesbach et al., 2004). In questo studio è stata posta attenzione alla finestra temporale in cui l'esercizio sembrerebbe essere più o meno di beneficio dopo la lesione. In particolare, i cambiamenti molecolari promossi dall'esercizio avrebbero luogo ed effetto non nella fase acuta (0-7 giorni dall'operazione) bensì quando l'esercizio sia somministrato in una fase più cronica (dopo 14 giorni PO). Gli autori spiegano questa differenza con l'aumento della richiesta energetica (es. ATP) con l'esercizio, che aggraverebbe la sua mancanza nella prima settimana-10 giorni PO a seguito di danno neuronale. L'attività fisica prematura viene qui associata ad una compromissione dell'acquisizione di un compito cognitivo, in correlazione ad una mancata normalizzazione dei livelli di BDNF, ed ad un decremento di quelli di CREB e di sinapsina-I fosforilata.

D'altronde, come precedentemente menzionato, Hutchinson et al., (2004) hanno trovato livelli normalizzati di BDNF in ratti con *spinal cord injury* solo dopo l'allenamento al treadmill, e non dopo altre forme di esercizio fisico (*standing* oppure nuoto). Solamente negli animali che praticavano il treadmill vi era un significativo miglioramento dell'allodinia. In questi ratti, in particolare, l'allenamento al treadmill iniziava 4 giorni dopo la lesione, durava 20-25 min/die, per 5 giorni alla settimana, per 7 settimane.



**Figura 14.** Modello di interazione e modulazione reciproca tra lesione ed esercizio fisico (da Chytrava et al. 2008).

Il sistema nervoso centrale, a seguito di un danno o lesione, promuove uno sviluppo ostile dei neuroni rigeneranti. L'attività di inibizione dei neuriti in ricrescita viene svolta anche da specifiche componenti della mielina, come le glicoproteine associate alla mielina MAG e Nogo-A. MAG è un membro della famiglia di proteine simili alle immunoglobuline, ed è espresso negli oligodendrociti. Nogo-A appartiene invece alla famiglia di proteine reticolari, ed è espresso negli oligodendrociti e nei neuroni.

Il principale modulatore di MAG e Nogo-A è BDNF. Studi in vitro hanno mostrato che neuroni stimolati con BDNF guadagnano una elevata capacità di azione contro gli effetti degli inibitori associati



alla mielina, come MAG e Nogo-A, attraverso un meccanismo coinvolgente l'azione della proteina chinasi A (PKA) (Chytrova et al., 2008) (Figura 14). I risultati ottenuti da questi studi fanno pensare che un'elevata produzione di BDNF, come a seguito di esercizio fisico, può favorire i processi di rigenerazione per lo più aiutando il SNC a superare la sua resistenza ad essa. Difatti, è stato visto che l'esercizio normalizza i livelli di MAG e Nogo-A (incrementati dopo lesione centrale), e che il blocco contemporaneo di BDNF controagisce all'effetto dell'esercizio su MAG e Nogo-A. L'esercizio aumenta i livelli di BDNF e PKA, mentre il blocco dei recettori TrKB del BDNF abolisce i cambiamenti indotti dall'esercizio fisico sui livelli delle proteine sinaptofisina (SYP) e GAP43, che sono up-regolate dall'esercizio (Figura 14).

#### ***1.10.4 - Esercizio al treadmill e dolore neuropatico***

E' di senso comune il fatto che, a seguito di una lesione nervosa periferica, la percezione del dolore sia una variabile fondamentale per la motivazione all'esercizio fisico da parte dei pazienti, e per lo stress che il dolore può indurre negli animali durante la locomozione al treadmill. Inoltre, poiché i meccanismi che innescano e mantengono il dolore neuropatico sono chiaramente in stretta relazione con i meccanismi di rigenerazione nervosa e recupero funzionale, nel processo di guarigione da una lesione nervosa periferica è plausibile un ruolo centrale del dolore. Tuttavia, manca quasi completamente una letteratura sugli effetti dell'esercizio fisico sul dolore neuropatico.

Hutchinson et al. (2004) hanno misurato parallelamente all'allenamento al treadmill la soglia per l'allodinia (*Von Frey test*)

e per l'iperalgisia (*noxious pinch test*), e hanno trovato effetti significativamente positivi del treadmill sul dolore neuropatico in entrambi i test. Essi correlano il miglioramento dell'ipersensibilità tattile alla normalizzazione non solo dei livelli centrali, ma anche dei livelli periferici muscolari di BDNF (che solo il treadmill sarebbe capace di ridurre, mentre invece altri tipi di esercizio come il nuoto o lo *standing* sarebbero capaci di ridurre solo quelli centrali).

Il ruolo di BDNF nel mantenere la plasticità sinaptica (BDNF stimola il rilascio di neurotrasmettitori attraverso la modulazione di sinapsina-I), determinerebbe una facilitazione dell'eccitabilità nervosa sensoriale, di cui sarebbe conseguenza l'allodinia tattile. Il treadmill, che sembra ridurre l'allodinia, attraverso una stimolazione ritmica (e non statica, come negli altri esercizi fisici) dei meccanorecettori a lento adattamento BDNF-dipendenti e delle loro proiezioni alle lamine centrali, tenderebbe a normalizzare la sensibilità tattile, agendo sia centralmente che perifericamente. La spiegazione del meccanismo neurochimico d'azione rimane tuttavia evasiva.

Asensio-Pinilla et al. (2009) hanno trovato un effetto positivo dell'esercizio fisico al treadmill sull'allodinia meccanica, oltre che di stimolazione della rigenerazione nervosa, in ratti dopo lesione del nervo sciatico. Questi effetti venivano amplificati dalla combinazione dell'esercizio al treadmill con l'elettrostimolazione muscolare della zampa lesionata. In questi animali, l'esercizio al treadmill iniziava 5 giorni dopo la lesione e durava 4 settimane; tuttavia gli effetti antiallodinici osservati dagli autori iniziavano dopo i 30 giorni, cioè dopo l'interruzione dell'allenamento al treadmill (Asensio-Pinilla et al., 2009). Gli autori concludono che la riabilitazione neuromotoria ha effetto solo se iniziata in una fase

precoce di rigenerazione nervosa, con un allenamento al treadmill di moderata intensità.

Da questi pochi dati presenti in letteratura, l'effetto del treadmill sui sintomi del dolore neuropatico sembra dunque essere di segno positivo. Restano tuttavia ancora da spiegare il meccanismo di azione che innesca l'esercizio fisico al treadmill per modulare il dolore neuropatico, e il tipo di protocollo di allenamento da utilizzare affinché esso sia efficace non solo per la stimolazione della rigenerazione nervosa, ma anche sul dolore.

Sul possibile meccanismo di azione, la letteratura offre diversi spunti interpretativi. Abbiamo visto come numerosi siano i lavori che dimostrano come in generale l'esercizio fisico a seguito di un danno nervoso sia centrale che periferico stimoli la rigenerazione assonale e il recupero funzionale, e questo effetto è stato messo in correlazione con l'aumento dei livelli di BDNF sia centrali che periferici, direttamente proporzionale all'esercizio fisico svolto. Riassumendo le evidenze:

- L'esercizio volontario aumenta i livelli di BDNF dopo 3 o 7 giorni nel muscolo soleo di ratti intatti (Gomez-Pinilla et al. 2002);
- L'esercizio volontario aumenta I livelli di BDNF dopo 3 o 7 giorni nel tratto lombare spinale di ratti intatti (Gomez-Pinilla et al. 2002);
- L'esercizio volontario incrementa la rigenerazione assonale e I livelli di BDNF nei DRG, 3 o 7 giorni dopo sciatic nerve crush (Molteni et al. 2004);
- L'esercizio volontario ristabilisce i normali livelli di BDNF nei motoneuroni e nei DRG, 3 giorni dopo spinal cord injury nei ratti (i livelli di BDNF sono direttamente proporzionali alla quantità di esercizio) (Ying et al. 2005);
- L'esercizio volontario normalizza i livelli di MAG e Nogo-A (inibitori della crescita neuronale) 3 giorni dopo *traumatic brain*

*injury* nei ratti; antagonizzando BDNF si inverte la down-regolazione di MAG e Nogo-A indotta dall'esercizio fisico (Chytrova et al. 2008);

- L'esercizio al Treadmill aumenta il recupero funzionale (indice SFI) e normalizza i livelli di BDNF in ratti 12 giorni dopo *sciatic nerve crush* (Byun et al. 2005);

- L'esercizio al Treadmill migliora l'allodinia e normalizza i livelli centrali e periferici di BDNF cinque settimane dopo *spinal cord injury* nei ratti (Hutchinson et al. 2004).

Tuttavia, aldilà dell'effetto di stimolazione della rigenerazione nervosa, che potrebbe tener conto solo del lento recupero funzionale e non del miglioramento immediato dell'allodinia meccanica, BDNF sembra poter rendere conto anche di una possibile azione anti-iperalgica.

Due lavori hanno messo in luce il possibile ruolo antinocicettivo di BDNF a livello delle corna dorsali del midollo e dei DRG a seguito di una lesione nervosa periferica, al fianco della diffusa conoscenza di BDNF come pro-nocicettivo e pro-infiammatorio.

Pezet et al. (2002a) hanno dimostrato che l'applicazione in acuto di BDNF in preparati di corna dorsali di ratto isolate con attaccati i DRG, in una dose dell'ordine dei microgrammi, esercita una facilitazione del rilascio potassio-dipendente di GABA, mediato dall'attivazione dei recettori TrkB presenti nelle lamine superficiali delle corna dorsali. Somministrato intratecalmente in acuto nei ratti, BDNF ha un immediato effetto antinocicettivo (innalza notevolmente la soglia termica misurata al Plantar test). Questo effetto è tuttavia transitorio (si esaurisce dopo 15 min). Somministrando l'antagonista per la tirosin-chinasi K-252a, l'effetto analgesico viene bloccato.

BDNF al livello delle corna dorsali del midollo sembra quindi modulare direttamente l'attività sinaptica dei neuroni sensoriali,

mediante il meccanismo di facilitazione della trasmissione GABAergica. Ma cosa può succedere in caso di iperalgesia dovuta a una lesione nervosa periferica?

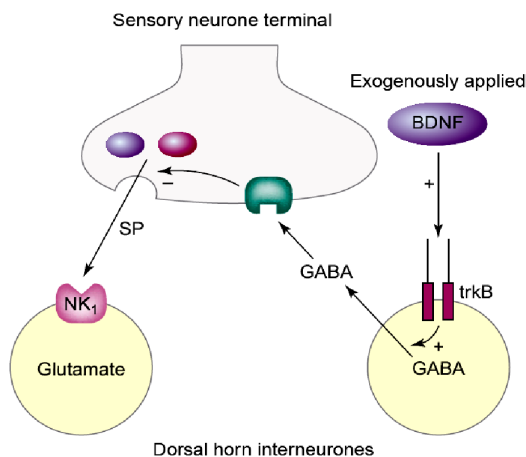
Lever et al. (2003) hanno utilizzato il modello della legatura dei nervi spinali e hanno visto che, al contrario di ciò che succede nei modelli di dolore infiammatorio (Pezet et al., 2002b), dopo lesione nervosa periferica non vi è rilascio di BDNF nelle corna dorsali a seguito della stimolazione dei neuroni sensoriali. Ciò potrebbe spiegare il ridotto tono GABAergico che si osserva nelle corna dorsali dei ratti neuropatici. Essi hanno dunque somministrato intratecalmente una singola dose di BDNF a 7 giorni dalla legatura, e hanno trovato che esso è in grado di modulare l'iperalgesia termica (Plantar test) ma non l'allodinia meccanica (Dynamic aestesiometer plantar test) sviluppata nella zampa ipsilaterale alla lesione. Gli autori spiegano questa differenza con la necessità di una disponibilità di BDNF per maggior tempo, piuttosto che solo in acuto come loro avevano invece misurato.

Per gli autori, il razionale è il seguente: poiché le fibre mieliniche lesionate, principali generatori dell'allodinia meccanica, sono normalmente sotto controllo tonico GABAergico (via recettori GABA<sub>A</sub>), la facilitazione BDNF-dipendente del rilascio di GABA nelle corna dorsali dovrebbe indurre un'inibizione dell'allodinia meccanica. Tuttavia una singola iniezione intratecale di BDNF induce un incremento solamente breve del rilascio di GABA endogeno, non sufficiente a ristabilire il tono GABAergico inibitorio. Quindi ci sono dati a supporto dell'ipotesi che un'applicazione cronica di BDNF sia in grado di ristabilire e normalizzare questo tono inibitorio, riducendo anche l'iperalgesia meccanica.

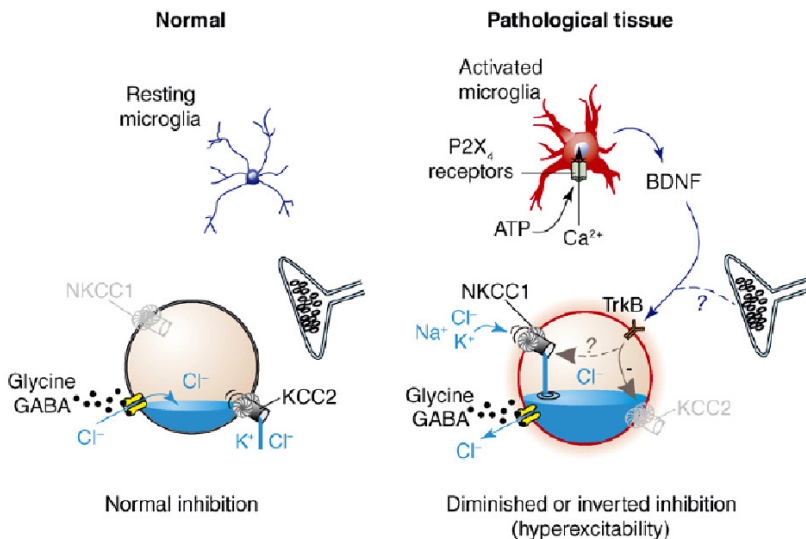
Poiché abbiamo visto che, a seguito di una lesione nervosa periferica, l'aumento di BDNF endogeno nel midollo può essere

‘cronicamente’ indotto con l’esercizio fisico in una modalità attività-dipendente (Gomez-Pinilla et al. 2002; Molteni et al. 2004; Ying et al. 2005; Byun et al. 2005; Hutchinson et al. 2004), l’effetto analgesico della locomozione al Treadmill potrebbe essere spiegato tramite questo meccanismo.

Vediamo ora quanto riguarda l’inizio e la durata temporale dell’allenamento, di modo che esso possa essere efficace anche per il dolore neuropatico. Lever et al. (2003) hanno trovato che il rilascio attività-dipendente di BDNF dai terminali dei neuroni primari sensoriali nelle corna dorsali del midollo dei ratti con SNL diviene assente esattamente 7 giorni dopo l’operazione. Questo risultato dimostra che a seguito di una lesione nervosa periferica, ci



**Figura 15.** Se somministrato topicamente nel corno dorsale, BDNF facilita il rilascio di GABA tramite l’attivazione dei recettori trkB. Agendo attraverso i recettori GABA<sub>A</sub>, il GABA inibisce il rilascio di sostanza P dai neuroni sensoriali. Quindi, il rilascio di GABA indotto da BDNF può essere di beneficio in condizioni in cui il rilascio e il contenuto di GABA è alterato, come nel dolore neuropatico. Adattato da Malcangio e Lessmann, 2003.



**Figura 16. Sommario della cascata di eventi relativi a modulazione GABAergica, attivazione della microglia e funzione di BDNF, in condizioni normali (sinistra) e patologiche (destra).** In condizioni normali (sinistra), la concentrazione del cloro è sufficientemente bassa che quando il GABA o la glicina aprono i canali GABA<sub>A</sub> o i canali della glicina, rispettivamente, il cloro fluisce nelle cellule, causando un'inibizione iperpolarizzante. In condizioni patologiche (destra), la microglia viene attivata, e inizia ad esprimere i recettori purinergici P2X<sub>4</sub>. L'ulteriore stimolazione di questi recettori induce la microglia a secernere BDNF, il quale, a turno, agisce sui recettori TrkB per down-regolare KCC2, diminuendo la capacità di estrusione del cloro della cellula (BDNF può anche originare dai terminali nervosi). L'accumulo di cloro causa un collasso nel gradiente trans membrana del cloro, e un decremento dell'inibizione iperpolarizzante delle cellule. Invece, nella maggior parte dei casi, il flusso anionico viene invertito, e il GABA (come la glicina) diviene depolarizzante, aumentando sostanzialmente l'eccitabilità delle cellule. Il bloccaggio del signaling microglia-BDNF-TrkB ristabilisce la normale omeostasi del cloro. L'up-regolazione di NKCC1 agisce sinergicamente alla down-regolazione di KCC2; la regolazione di questi due trasportatori comprende percorsi cellulari comuni e distinti. Adattato da Lever et al., 2003.

potrebbe essere una progressiva inibizione del tono GABAergico BDNF-dipendente, con culmine a 7 giorni (Figura 15) (Malcangio e Lessmann, 2003).

E' stato dimostrato che l'attivazione di ATP nella microglia spinale causa uno shift di depolarizzazione nel potenziale anionico dei neuroni della lamina I delle corna dorsali. Questo shift inverte la polarità della corrente attivata dal GABA a seguito di danno nervoso periferico (Coull et al. 2005).

In particolare, l'attivazione di ATP nella microglia spinale tramite i recettori P2X causa un collasso del gradiente anionico di membrana ed induce il rilascio di BDNF dalla microglia nei neuroni nocicettivi (per una descrizione dettagliata dei meccanismi, vedi Figura 16).

Bloccando il signalling tra BDNF e i suoi recettori TrkB si normalizzerebbe l'allodinia meccanica e lo shift del potenziale anionico, sia dopo lesione nervosa, che dopo somministrazione di ATP nella microglia. Tutto ciò spiega come, a seguito di una lesione nervosa periferica, l'aumento del rilascio di BDNF nelle corna dorsali indotto dall'attivazione della microglia abbia un effetto iperalgesico, ed è probabilmente responsabile dell'ipereccitabilità delle fibre nervose sensoriali afferenti. D'altra parte, l'attivazione di glia e microglia è stata già messa in stretta relazione con lo sviluppo e il mantenimento del dolore neuropatico. A questo punto si delineano due possibili meccanismi di azione di BDNF a livello delle corna dorsali del midollo. Il primo tiene conto del mantenimento del tono inibitorio GABAergico, tono che viene perso immediatamente dopo la lesione. Un esercizio precoce al treadmill potrebbe essere in grado di ristabilirlo entro pochi giorni, con un rapido effetto antinocicettivo. Il secondo viene indotto invece dall'attivazione della microglia, e tiene conto dell'ipereccitabilità dei nocicettori primari e del conseguente processo di sensitizzazione centrale.

Presi insieme, questi dati potrebbero delineare una “finestra temporale” in cui l'esercizio fisico potrebbe avere un effetto



antinocicettivo. Questa fase sembra rientrare nella prima settimana da una lesione nervosa periferica. Nella prima settimana infatti:

1) l'attivazione della microglia, con il conseguente aumento della comunicazione microglia-neuroni tramite BDNF (che a seguito di lesione periferica viene trasportato anterogradamente con funzione di ipereccitazione dei neuroni sensoriali afferenti), aumenta il contributo della sensitizzazione centrale;

2) l'attivazione della microglia, invertendo come è stato visto il gradiente anionico della corrente attivata dal GABA, cambia di segno la funzione degli interneuroni GABAergici nelle corna dorsali, il cui tono inibitorio veniva mantenuto dall'esercizio al treadmill nei primi 7 giorni, invertendolo a eccitatorio;

3) l'esercizio prolungato oltre i 7 giorni potrebbe stimolare ancor di più l'attivazione di ATP nella microglia, annullando del tutto il precedente effetto analgesico;

4) è noto come l'esercizio fisico induca, sia centralmente che perifericamente, una attivazione degli astrociti (Li et al., 2005). D'altra parte, è stato visto che gli astrociti spinali possono rilasciare il trasmettitore eccitatorio glutammato secondo diversi meccanismi (Malarkey e Parpura, 2008), e abbiamo visto nei capitoli precedenti come, a seguito di una lesione nervosa periferica, la loro attivazione, come conseguenza della precedente attivazione della microglia, è stata messa in relazione ai processi di sensitizzazione centrale, nel senso di un mantenimento del dolore neuropatico. Un esercizio fisico prolungato potrebbe perciò determinare un aggravamento del dolore neuropatico, indotto da una protratta attivazione degli astrociti spinali.



## **Capitolo 2**

---

### **SCOPO DELLA TESI**



## 2.1 – Nuovi trattamenti per il dolore

---

Il protrarsi o la costante presentazione del dolore neuropatico può sviluppare uno stato patologico, che porta a modificazioni nel substrato neuronale, nonché a modelli alterati di risposte comportamentali.

Le terapie convenzionalmente in uso per il trattamento del dolore, come i farmaci attualmente in commercio, sono numerose ed efficaci nel dare sollievo al dolore infiammatorio; tuttavia non esistono cure chiare e definitive per le sindromi algiche di natura cronica come il dolore neuropatico.

Inoltre, nonostante la regressione del dolore neuropatico sembri essere strettamente correlato ai processi di rigenerazione nervosa e recupero funzionale, i paradigmi di riabilitazione neuromotoria in uso sui pazienti sembrano non tener conto di un possibile effetto diretto dell'esercizio fisico sul dolore stesso.

Nell'emergere sempre più pressante della necessità di una terapia clinica di combinazione dei trattamenti farmacologici con la terapia neuroriabilitativa, spesso farmaci antinfiammatori, analgesici ed esercizio fisico si trovano ad essere integrati in un programma di cura che vede l'interazione di diversi trattamenti, molto spesso sostituiti o modificati nel tempo a causa della loro inefficacia o dell'insoddisfazione dei pazienti.

Da un lato, la ricerca farmacologica sta cercando di individuare i complessi meccanismi molecolari del dolore neuropatico, in modo da poter sintetizzare nuove sostanze che abbiano come target i generatori del dolore sia periferici che centrali.

Dall'altro, la neurologia sperimentale sta cercando di studiare nuove tecniche di riabilitazione neuromotoria e sensoriale, che

siano di stimolazione dei meccanismi di rigenerazione e plasticità nervosa.

L'attività di ricerca che ho svolto si è dunque focalizzata nello studio di a) un nuovo trattamento farmacologico analgesico contro il dolore infiammatorio, b) l'efficacia di questo nuovo trattamento anche per il dolore neuropatico, e c) un trattamento fisico di tipo neuroriabilitativo efficace anch'esso sul dolore neuropatico, di possibile integrazione a quello farmacologico.

In particolare, come nuovo trattamento farmacologico ho utilizzato le neurotossine botuliniche (BoNTs), come abbiamo visto già estesamente utilizzate in clinica, ma solo di recente nel trattamento del dolore, per cui non se ne conoscono ancora i meccanismi e gli effetti; e come nuovo trattamento comportamentale, ho utilizzato l'esercizio fisico al treadmill, come abbiamo visto anch'esso utilizzato frequentemente per la riabilitazione dalle lesioni nervose periferiche, per verificarne gli effetti sul dolore neuropatico.

E' necessario sottolineare, nella ricerca di un trattamento per le neuropatie periferiche, l'importanza di studi combinati e comparativi che valutino l'interazione tra dolore e recupero funzionale, in quanto variabili interdipendenti e strettamente correlate per la guarigione.

Alcuni risultati conseguiti in questa ricerca sono stati oggetto di pubblicazione (Luvisetto et al., 2006, 2007), altri sono stati presentati a congressi internazionali (Cobianchi et al., 2009a) e sono in via di pubblicazione (Cobianchi et al., 2009b). E' nella mia speranza che questi nuovi risultati possano contribuire, oltre a una migliore comprensione dei meccanismi sottostanti lo sviluppo e il decorso del dolore neuropatico, alla formulazione di cure più efficaci per i pazienti che soffrono di sindromi dolorose di difficile trattamento conseguenti alle neuropatie periferiche.

## **2.2 – Le neurotossine botuliniche (BoNTs) per il dolore infiammatorio**

---

E' stato visto come i differenti serotipi (A-G) delle neurotossine del botulino si legano ai terminali presinaptici nervosi, dove selettivamente tagliano SNAP-25 (BoNT/A, /C1, /E), syntaxina-1 (/C1), e VAMP/sinaptobrevina (/B, /D, /F, /G), tutte proteine appartenenti al complesso SNARE, responsabile per il rilascio del neurotrasmettitore (Humeau et al., 2000; Schiavo et al., 2000). Il taglio di una di queste proteine risulta in una formazione incompleta del complesso SNARE, prevenendo la fusione delle vescicole con la membrana presinaptica, quindi inibendo il rilascio di neurotrasmettitore (Hua e Scheller, 2001; Sudhof, 2000).

L'azione specifica delle BoNTs esercitata sui terminali nervosi le rende utili sia nella ricerca di base che in quella clinica (Jahn et al., 1995; Pearce et al., 1997; Schiavo et al., 1994). L'iniezione intramuscolare di BoNTs sta velocemente diventando un diffuso trattamento per una varietà di disordini causati da iperfunzionalità dei terminali colinergici (Jankovic e Brin, 1997; Jost e Kohl, 2001; Munchau e Bhatia, 2000; Silberstein e Aoki, 2003). Alcuni studi hanno evidenziato l'efficacia delle BoNTs nel diminuire il dolore con effetti di durata maggiore del solo rilassamento muscolare muscolare (Freund e Schwartz, 2003; Lange et al., 1987). Questi risultati, insieme all'effetto sul dolore miofasciale, lombare e il mal di testa da tensione (Difazio e Jabbari, 2002; Gobel et al., 2001; Loder e Biondi, 2002), suggeriscono un'attivazione di processi analgesici più complessi del semplice rilassamento muscolare (Aoki 2003; Argoff, 2002; Guyer, 1999; Lang, 2003; Lew, 2002; Voller et al., 2003).

Il test della formalina, un modello preclinico usato per investigare l'effetto analgesico delle sostanze, può essere utilizzato per confermare questa ipotesi (Dubuisson e Dennis, 1977). È stato visto che l'iniezione sottocutanea di formalina induce un immediato incremento dell'attività delle fibre C afferenti, ed evoca una serie di risposte comportamentali che coinvolgono direttamente la zampa lesionata (Porro e Cavazzuti, 1993). Queste risposte hanno un andamento bifasico, con una fase precoce di breve durata (fase 1), dovuta alla stimolazione diretta dei nocicettori e all'iniziazione dell'infiammazione, seguita da una seconda fase prolungata (fase 2), che riflette i processi di sensitizzazione del dolore (Coderre et al., 1990; Dickenson e Sullivan, 1987; Tjolsen et al., 1992). Tra queste due fasi si osserva una fase quiescente, che sembra essere una fase inibitoria, dovuta a una modulazione centrale inibitoria del comportamento nocicettivo (Green e Dickenson, 1997; Henry et al., 1999; Matthies e Franklin, 1992).

Recentemente, Cui et al. (2004) hanno dimostrato che l'iniezione sottocutanea di BoNT/A (BOTOX®) nella zampa del ratto riduce significativamente il dolore indotto dalla formalina durante la fase 2, suggerendo che l'effetto della BoNT/A sia una conseguenza di una inibizione dei meccanismi neuronali che comprendono il rilascio di sostanze eccitatorie durante il processo di sensitizzazione del dolore.

Nell'*Esperimento 1*, investigando gli effetti centrali di BoNT/A e BoNT/B, si è voluto estendere lo studio sugli effetti delle BoNTs sul dolore infiammatorio nel test della formalina.



## **2.3 – Le neurotossine botuliniche (BoNTs) per il dolore neuropatico**

---

Rispetto al dolore infiammatorio, il dolore neuropatico è un problema clinico maggiore e non offre vantaggi biologici, causando sofferenza e distress, nell'ordine di un vero problema sociale (Loeser e Melzack, 1999). Essendo un dolore maladattativo, è tipico di lesioni primarie o disfunzioni nel sistema nervoso, e può derivare da cause diverse come le patologie a cui esso è correlato (cancro, diabete, sclerosi multipla, neuralgia post-erpetica, ecc.), da agenti infettivi o chemioterapici, da un trauma fisico o da chirurgia, e altre cause (Woolf e Mannion, 1999).

Il dolore neuropatico si presenta in una complessa combinazione di sintomi o deficit sensoriali, come il dolore spontaneo, l'iperalgesia e l'allodinia, per la quale stimoli normalmente non nocivi, come un tocco leggero, divengono dolorosi (Jensen et al. 2001; Zimmermann, 2001; Baron, 2006).

I pazienti che soffrono di dolore neuropatico non rispondono ai convenzionali trattamenti con NSAIDs, e mostrano una ridotta sensibilità agli oppiacei, spesso associata a spiacevoli effetti collaterali (Sindrup e Jensen, 1999). Solitamente, essi vengono empiricamente trattati con antidepressivi e anticonvulsivi che hanno un'efficacia limitata, e numerosi effetti collaterali (Gilron e Max, 2005; Sindrup et al., 2005). In aggiunta ai trattamenti correnti, alcuni nuovi agenti farmacologici sono in via di sviluppo (Dworkin et al., 2003; Ossipov e Porreca, 2005; Rice e Hill, 2006). L'utilizzo delle neurotossine del botulino (BoNTs) come possibili nuovi analgesici sembra essere di grande attrazione, e dovrebbe destare un'attenzione particolare nella comunità scientifica.

Nonostante siano stati pubblicati risultati molto promettenti circa un ruolo analgesico delle BoNTs nella modulazione del dolore infiammatorio (Cui et al., 2004; Luvisetto et al., 2006), il loro possibile uso nel trattamento delle neuropatie è ancora materia di intensa ricerca. Recentemente, sono stati documentati alcuni casi in cui la BoNT/A è risultata efficace nella neuralgia postoperatoria (Liu et al., 2006), nella neuropatia diabetica (Yuan et al., 2009) e in diverse neuropatie dolorose (Ranoux et al., 2008). Sono in via di sviluppo anche gli studi su modelli animali di dolore neuropatico (Bach-Rojecky et al., 2005; Park et al., 2006; Kitamura et al. 2009; Favre-Guilmard et al. 2009).

Nell' *Esperimento 2*, utilizzando il *Chronic Constriction Injury* (CCI) come modello animale del dolore neuropatico (Bennett e Xie, 1988), ho voluto studiare gli effetti del serotipo A della neurotossina botulinica (BoNT/A) sul dolore neuropatico.

## **2.4 – L’esercizio fisico al treadmill nel trattamento del dolore neuropatico**

---

L’attività fisica è una componente peculiare delle terapie neuro riabilitative per il recupero funzionale a seguito di lesioni traumatiche del sistema nervoso (Edgerton et al., 2004; Berham e Harkema, 2007; Storch e Kruszynski, 2008).

Attraverso una stimolazione fisica a lungo termine, la locomozione al treadmill appare superiore nel promuovere un miglioramento nel recupero funzionale dopo lesioni alla colonna spinale, sia negli animali che nei soggetti umani (Dietz e Harkema, 2004; Fouad et al., 2004; Harkema, 2008; Heng e de Leon, 2009; Hutchinson et al., 2004; Leblond et al., 2003; Rossignol et al., 2004; Trimble et al., 1998; inoltre vedi anche Mehrholz et al., 2008, per risultati contrastanti nei pazienti umani).

D’altra parte, gli effetti del treadmill sul recupero funzionale dopo lesione nervosa periferica sono stati meno estesamente studiati, e sembrano essere meno chiari. Anche se alcuni promettenti risultati sono stati ottenuti in modelli animali di lesioni nervose periferiche (Byun et al., 2005; Marqueste et al., 2004; Sabatier et al., 2008; Seo e al., 2006, 2009), non vi sono ancora sufficienti evidenze che stabiliscono direttamente quale protocollo di allenamento al treadmill sia più efficace per promuovere il recupero funzionale.

E’ stato visto precedentemente come le lesioni nervose spesso risultano in condizioni di dolore cronico, caratterizzate da sintomi di iperalgesia e allodinia. Diversi studi hanno dimostrato effetti positivi della locomozione al treadmill sulla rigenerazione e sul recupero funzionale dopo lesione nervosa periferica (Byun et al. 2005; Marqueste et al., 2004; Sabatier et al., 2008; Seo e al., 2006,

2009), ma gli effetti sui sintomi del dolore neuropatico non sono stati ancora investigati, se non in un recentissimo lavoro di comparazione tra gli effetti dell'elettrostimolazione e quelli della locomozione al treadmill (Asensio-Pinilla, 2009).

Poiché l'allodinia meccanica pregiudica l'uso dell'arto lesionato, e compromette il successo della riabilitazione (Vogelaar et al., 2004), nell' *Esperimento 3* si è voluto analizzare quale protocollo di allenamento al treadmill fosse efficace nell'alleviare l'allodinia meccanica indotta da una lesione nervosa mono-laterale, la Chronic Constriction Injury (CCI) del nervo sciatico nel topo (Bennet e Xie, 1988). Partendo dal giorno 3 post-CCI, sono stati adottati due differenti protocolli di corsa al treadmill: i) un allenamento di breve durata, per solo una settimana dopo la lesione, e ii) un allenamento di lunga durata, per più di una settimana. Oltre all'allodinia meccanica, è stato studiato anche il trend temporale del recupero funzionale.

Parallelamente ai test comportamentali, sono stati indagati anche gli effetti del treadmill sull'attivazione delle cellule gliali spinali (microglia e astrociti), che sono profondamente coinvolte nella patogenesi del dolore neuropatico (Colburn et al., 1997, 1999; Aldskogius e Kozlova, 1998; Jergova e Cizkova, 2007; Scholz e Woolf, 2007; Tsuda et al. 2005; Milligan e Watkins, 2009). L'attivazione delle cellule gliali spinali è stata investigata con tecniche di immunofluorescenza per specifici markers biologici, come il CR3/CD11b (complement receptor 3/cluster of differentiation 11b), estensivamente usato come marcatore della microglia attivata, e il GFAP (glial fibrillary acidic protein), marcatore degli astrociti attivati. Entrambi questi markers biologici vengono up-regolati nel midollo spinale a seguito di diversi danni nervosi, centrali e periferici (Coyle, 1988; Hashizume et al., 2000; Garrison et al., 1991).

La lesione di un nervo è normalmente seguita da cambiamenti nella sintesi neuronale di proteine necessarie a sostenere la rigenerazione susseguente. Due di queste proteine, Cdc2 (cell division cycle 2), una chinasi ciclin-dipendente che promuove la transizione della fase G2-M nel ciclo cellulare, e GAP-43 (growth-associated protein 43), sono particolarmente espresse nel nervo periferico a seguito di CCI (Nahin et al. 1994; Han et al., 2007). Poiché è stata recentemente dimostrata una relazione tra locomozione al treadmill e up-regolazione periferica di Cdc2 e GAP-43 (Seo et al., 2006, 2009), in questo esperimento sono stati investigati gli effetti dei due differenti protocolli di allenamento al treadmill sull'espressione di queste proteine nei nervi sciatici con CCI.

Nell'*Esperimento 3* ho voluto fornire una prova diretta che l'allenamento al treadmill di breve durata, ma non quello di lunga durata, è efficace sia nel ridurre l'allodinia indotta dalla neuropatia, sia nell'aumentare la rigenerazione del nervo periferico, con un miglioramento conseguente del recupero funzionale. Alcuni risultati di questo lavoro sono in via di pubblicazione (Cobianchi et al., 2009a,b).



## **CAPITOLO 3**

---

### **MATERIALI E METODI**





## **3.1 – Materiali e metodi**

---

### ***3.1.1 - Animali***

In tutti gli esperimenti che di seguito verranno descritti, sono stati utilizzati topi CD1 maschi adulti provenienti dai Charles River Labs (Como, Italia), del peso di circa 40 gr all'inizio dell'esperimento. Al loro arrivo nel laboratorio, almeno 2 settimane prima dell'esperimento, gli animali sono stati stabulati in gruppi di 4 per gabbia, in gabbie standard di plastica trasparente, e mantenuti in condizioni standard di stabulazione: libero accesso a acqua e cibo, ciclo luce/buio di 12 ore, temperatura costante di 23°C.

La manipolazione e la cura degli animali erano in accordo alle linee guida della Commissione per la Ricerca e Materie Etiche della IASP (Pain® 1983, 16, 109-110), e con la legge nazionale italiana sull'uso degli animali per la ricerca (DL116/92, applicazione della Direttiva del Concilio delle Comunità Europee 86/609/EEC).

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati tra le ore 11:00 del mattino e le ore 16:00 del pomeriggio.

### ***3.1.2 – Sostanze***

Le BoNTs, isolate e purificate (Rossetto et al., 1992; Schantz e Johnson, 1992), sono un gentile dono del prof. Cesare Montecucco (Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università di Padova). Le tossine sono state congelate in azoto liquido e

conservate alla temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ , in 10mM NaHepes, 150 mM NaCl, pH 7.2. Soluzioni stoccate della molecola purificata 150-kDa-doppia catena di BoNT/A e BoNT/B sono state testate per l'attività nel modello murino *ex vivo* di emidiaframma, e per il taglio *in vitro* di SNAP-25 e VAMP/sinaptobrevina. Soluzioni iniettabili delle BoNTs sono state preparate diluendole in salina (0.9% NaCl).

## 3.2 - Esperimento 1

### Le neurotossine del botulino sul dolore infiammatorio indotto da formalina: effetti centrali vs. periferici

---

BRAIN RESEARCH 1082 (2006) 124–131



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



[www.elsevier.com/locate/brainres](http://www.elsevier.com/locate/brainres)

**BRAIN  
RESEARCH**

Research Report

#### **Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: Central vs. peripheral effects in mice**

Siro Luvisetto<sup>a</sup>, Sara Marinelli<sup>a</sup>, Francesco Lucchetti<sup>a</sup>, Fabrizio Marchi<sup>a</sup>, Stefano Cobianchi<sup>a</sup>, Ornella Rossetto<sup>b</sup>, Cesare Montecucco<sup>b</sup>, Flaminia Pavone<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Istituto di Neuroscienze del CNR, Psicobiologia e Psicofarmacologia, Centro Europeo di Ricerca sul Cervello, Via del Fosso di Fiorano 64, 00143-Roma, Italy

<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali, Università di Padova, V.le G. Colombo 3. 35121-Padova, Italy

#### **3.2.1 – Procedura chirurgica**

E' stata praticata l'iniezione intra-cerebro-ventricolare (icv) delle tossine. Come anestetico per gli animali, è stato utilizzata una mistura di Ketamina (100 mg/Kg, ip) e Xylazina (5 mg/Kg, ip) (Sigma, St. Louis, MO), come precedentemente descritto (Luvisetto et al., 2003, 2004). Sotto anestesia, i topi sono stati impiantati con cannule intracraniche croniche. La testa dell'animale veniva fissata in un apparato stereotassico, e vi veniva praticata un'incisione nella membrana atlanto-occipitale. Le cannule guida di acciaio inossidabile erano impiantate in accordo alle coordinate stereotassiche (antero-posteriore, AP 0.0 mm; medio-laterale, ML  $\pm$  1.0 mm dal bregma) dell'Atlante del cervello del topo (Franklin e Paxinos, 1997). Le cannule venivano fissate al

cranio del topo con cemento policarbonato. Le cannule eiettanti di acciaio inossidabile, connesse a una pompa di infusione tramite un tubicino di polietilene, venivano calate all'interno dei ventricoli laterali cerebrali (dorso-ventrale, DV 2.5 mm dal bregma).

### ***3.2.2 - Somministrazione delle sostanze***

Per quanto riguarda la somministrazione periferica, è stato sottocutaneamente (sc) iniettato nella superficie plantare della zampa posteriore destra dei topi un volume di 20 µl di salina (0.9% NaCl) o di differenti soluzioni di BoNTs (BoNT/A: 3.75, 7.5, 15.0 pgtox/topo; BoNT/B: 3.75, 7.5 pgtox/topo), utilizzando una microsiringa munita di un ago di 26 gauge. Le dosi delle tossine sono state scelte sulla base della tossicità e degli effetti comportamentali delle BoNTs iniettate icv nel topo (Luvisetto et al., 2003, 2004). Inoltre, risultati preliminari hanno mostrato che le dosi scelte non inducono alcuna alterazione significativa dell'attività locomotoria spontanea negli animali. Questi dati hanno dimostrato, in accordo con studi preclinici sui margini di sicurezza dell'iniezione intramuscolare di BoNTs nei topi (Aoki, 2001), che la BoNT/B somministrata via sc nella zampa di topi era più tossica della BoNT/A. Per questi motivi non sono state testate concentrazioni di BoNT/B più elevate di 7.5 pgtox/topo.

Per la somministrazione centrale, è stato iniettato icv un volume di 1 µl (singola iniezione, 1 µl/min) di salina (0.9% NaCl) o di differenti soluzioni di BoNT/A o BoNT/B (1.875, 3.75 pgtox/mouse), 6 giorni dopo l'impianto chirurgico delle cannule. Come precedentemente riportato (Luvisetto et al., 2003), 3.75 pgtox/topo era l'ammontare massimo di BoNTs iniettabili icv senza effetti tossici. Per questo motivo non sono state testate

concentrazioni di BoNTs più elevate di 3.75 pgtox/topo. Per ottenere la curva dose-risposta per la BoNT/A, sono state iniettate delle ulteriori concentrazioni più basse di 3.75 pgtox/topo via sc (1.875) o icv (0.937).

### ***3.2.3 – Test della formalina***

Per misurare il dolore infiammatorio è stato utilizzato il test della formalina. Gli animali sono stati testati 3 giorni dopo l'iniezione icv o sc. E' stato precedentemente riportato che questo è il tempo minimo necessario per minimizzare i possibili effetti tossici dell'iniezione di BoNTs (Luvisetto et al., 2003, 2004).

Il giorno del test, un animale alla volta veniva messo per 1 ora in una gabbia standard di plexiglass (30x12x13 cm), la quale serviva come camera di osservazione. Dopo questo periodo di adattamento, l'animale veniva iniettato nella superficie dorsale della zampa destra posteriore con 20 µl di soluzione di formalina (5% in salina), utilizzando una micro siringa equipaggiata con un ago di 26 gauge. Il topo veniva quindi riposto nella gabbia, e partiva il periodo di osservazione.

L'attività di licking, ovvero l'ammontare totale del tempo trascorso dall'animale leccandosi e/o mordendosi la zampa iniettata, è stata presa come indice di dolore. L'attività di licking è stata registrata continuativamente per 40 min ed è stata calcolata in blocchi consecutivi di periodi di 5 min. Uno specchio veniva posizionato dietro la gabbia per permettere una visione completa dell'animale. Inoltre, venivano registrati l'attività generale (il tempo trascorso esplorando l'ambiente camminando, voltandosi o sollevandosi) e il self-grooming (il tempo trascorso nella pulizia del muso e del

corpo), continuativamente per 40 min e calcolati in blocchi consecutivi di periodi di 5 min.

### ***3.2.4 – Analisi dei dati***

I dati del test della formalina sono stati divisi in 3 fasi: fase 1 (0-5 min), interfase (5-10 min) e fase 2 (10-40 min), e sono stati analizzati separatamente tramite un'ANOVA a una via, per ciascun serotipo di botulino. Se necessari, venivano calcolati i confronti post-hoc utilizzando il test PLSD di Fisher. Sono state considerate significative differenze con  $p < 0.05$ .

### **3.3 - Esperimento 2**

#### **Effetti della BoNT/A in un modello di dolore neuropatico**

---

*Neuroscience* 145 (2007) 1–4

#### **RAPID REPORT**

#### **ANTI-ALLODYNIC EFFICACY OF *BOTULINUM* NEUROTOXIN A IN A MODEL OF NEUROPATHIC PAIN**

S. LUVISETTO, S. MARINELLI, S. COBIANCHI  
AND F. PAVONE\*

*CNR Institute of Neuroscience, Psychobiology and Psychopharmacology, Via del Fosso di Fiorano 64, I-00143 Roma, Italy*

#### ***3.3.1 – Procedura chirurgica***

Seguendo la procedura originariamente proposta da Bennet e Xie (1988) adattata al topo, è stato utilizzato il modello CCI di dolore neuropatico. Il CCI del nervo sciatico veniva effettuato sotto anestesia con cloralio idrato (500 mg/kg). In accordo con Bennet e Xie, il terzo medio del nervo sciatico destro veniva esposto attraverso una incisione longitudinale della cute di circa 1.5 cm. Attorno al nervo sciatico, venivano praticate tre legature lente con filo non assorbibile (Prolene 7-0, Johnson & Johnson). La ferita veniva quindi richiusa con filo per suture (Vycril 4-0, Johnson & Johnson).

#### ***3.3.2 – Gruppi sperimentali***

Gli animali così operati sono stati divisi nei seguenti gruppi sperimentali:

- I. topi *naives* (non operati con CCI), per verificare la normale soglia sensoriale negli animali;
- II. topi operati *sham* (n=6), testati per verificare l'allodinia meccanica nelle zampe non-lesionate;
- III. topi con CCI e successivamente iniettati ipl con salina, 20  $\mu$ l (0.9% NaCl), ipsi- e contra-lateralmente alla lesione, iniettati 5 giorni dopo la CCI come gruppo di controllo al trattamento farmacologico (n=9);
- IV. topi con CCI iniettati ipl ipsi- e contra-lateralmente alla lesione con BoNT/A 0.005 nM in 0.9% NaCl, corrispondente a 15 pg per zampa, iniettati 5 oppure 12 giorni dopo CCI, per verificare l'effetto della BoNT/A in due punti temporali successivi all'inizio della neuropatia indotta da CCI;
- V. topi con CCI iniettati ipl ipsi- e contra-lateralmente alla lesione con BoNT/A 0.005 nM in 0.9% NaCl, corrispondente a 15 pg per zampa, iniettati 3 giorni prima la CCI, per verificare l'effetto preventivo della BoNT/A sul successivo instaurarsi della neuropatia indotta da CCI;
- VI. topi con CCI iniettati ipl ipsi- e contra-lateralmente alla lesione con BoNT/A 0.0025 nM in 0.9% NaCl, corrispondente alla dose di 7.5 pg per zampa, iniettati 5 giorni dopo CCI, per verificare l'effetto di una dose piú bassa;
- VII. topi iniettati ipl ipsi- e contra-lateralmente alla lesione con BoNT/B 0.00125 nM in 0.9% NaCl, corrispondente alla dose di 3.75 pg per zampa, iniettati 5 giorni dopo CCI, per verificare l'effetto della BoNT/B sul decorso della neuropatia indotta da CCI.



### **3.3.3 – Allodinia meccanica**

L'inizio della neuropatia e il suo decorso sono stati valutati utilizzando il *Dynamic aesthesiometer plantar test* (Model 37400, Ugo Basile, Italia) per l'allodinia meccanica, misurando la sensitività di entrambe le zampe posteriori (la destra, su cui veniva praticata la CCI, e la contralaterale intatta) a uno stimolo meccanico puntiforme normalmente non-nocivo, a differenti intervalli di tempo dal giorno 3 al giorno 81 post-CCI. In ogni giorno di test, venivano registrate le forze dello stimolo che elicitarono la risposta di retrazione della zampa, come media di 3 misurazioni consecutive per ciascuna zampa, con un intervallo di 10 sec tra ogni misurazione. I dati sperimentali sono stati espressi come  $\text{media} \pm \text{S.E.M.}$ .

Gli effetti dell'iniezione contra-laterale delle tossine sono stati investigati per verificare se un effetto di rilassamento muscolare potenzialmente indotto dalle tossine poteva interferire con il dolore neuropatico.

### **3.3.4 – Incapacitance test**

Oltre alla misurazione dell'allodinia meccanica come sintomo di dolore neuropatico, gli animali sono stati testati anche per valutare il recupero funzionale. E' stato misurata la distribuzione e lo spostamento del peso sulle zampe posteriori mediante un *Incapacitance test* (Linton, Norfolk, UK), che consiste in una bilancia che misura contemporaneamente in modo separato la forza che ciascuna zampa posteriore esprime in base al peso corporeo che l'animale sposta su di essa. I topi venivano delicatamente posizionati in una camera inclinata di Plexiglass, in

modo che ciascuna zampa posteriore posasse su un separato piano di forza. Veniva posta attenzione al fatto che il peso dell'animale fosse diretto sui piani di forza e non dissipato sulle pareti della camera dove l'animale era posizionato. La forza esercitata da ciascuna zampa posteriore (misurata in grammi) veniva mediata su un periodo di 3 sec, indicando la tendenza dell'animale a spostare il suo peso da un lato all'altro. I dati registrati da tre misurazioni consecutive per ogni animale erano mediati tra loro. In accordo con Helyes et al. (2009), la percentuale di peso distribuita sulla zampa ipsilaterale alla lesione era calcolata in base all'equazione:

$$[\text{forza ipsilaterale} / (\text{forza ipsilaterale} + \text{forza contralaterale})] \times 100.$$

### 3.3.5 – *Walking track analysis*

L'analisi delle impronte degli animali durante la libera locomozione (*walking track analysis*) è un utile strumento di valutazione del recupero dei nervi periferici lesionati nei roditori (Varejao et al., 2001; Inserra et al., 1998). Attraverso l'analisi delle impronte dei topi durante la locomozione libera, è stato indagato se l'effetto anti-allodinico della somministrazione delle tossine correlava con il recupero funzionale della zampa con il CCI. In particolare, il graduale recupero della funzionalità della zampa è stato monitorato attraverso l'analisi dei pattern della locomozione libera individuale, misurando alcuni parametri sulle impronte dei topi.

E' stato quindi calcolato lo *Sciatic Static Index* (SSI; Baptista et al., 2007), un indice di funzionalità del nervo sciatico, che

utilizza la misurazione di due parametri sulle impronte dei topi, la lunghezza della zampa (PL) come distanza tra il 3° dito e l'aspetto più posteriore dell'impronta, e la sua apertura (TS) come la distanza dal 1° al 5° dito della zampa stessa, per calcolare la seguente formula:

$$SSI = +101.3 \times (ETS - NTS) / NTS - 54.03 \times (EPL - NPL) / NPL - 9.5$$

dove ETS è l'apertura della zampa sperimentale (ipsilaterale al CCI), NTS è l'apertura normale (della zampa contralaterale), EPL è la lunghezza della zampa sperimentale, e NPL la lunghezza della zampa normale. L'indice SSI è un valore compreso tra 0 e -100, dove 0 rappresenterebbe la funzione normale del nervo sciatico, e invece -100 rappresenterebbe la completa perdita della funzione.

Le impronte degli animali sono state ottenute bagnando con inchiostro nero per timbri la superficie plantare delle zampe posteriori, e facendo camminare gli animali liberamente da un'estremità all'altra di un corridoio di Perspex (15 x 5 x 50 cm) ricoperto di strisce di normale carta bianca (Dijkstra et al., 2000; Islamov et al., 2002) Per ciascun animale, i parametri delle impronte erano calcolati da almeno 5 impronte, raccolte su 3 differenti strisce di carta.

### ***3.3.6 – Istologia e saggi d'immunofluorescenza***

Gruppi addizionali di topi, soggetti allo stesso modo alla procedura del CCI e testati per verificare l'allodinia meccanica 3 giorni dopo la lesione e prima della somministrazione della tossina, sono stati sacrificati il giorno 7 o il giorno 10 post-CCI

dopo la somministrazione di BoNT/A o salina (che avveniva il giorno 5), per il prelievo di tessuti per saggi di immunofluorescenza (IF).

Gli animali sono stati sacrificati con una dose letale di cloralio idrato (500 mg/kg) (St. Louis, MO). I nervi sciatici (ipsilaterale e contralaterale alla CCI) degli animali, incluse le porzioni con le legature, venivano immediatamente rimossi e mantenuti in immersione per 24 h in 4% paraformaldeide in PBS 1x, e dopo crioprotezione con una soluzione di 30% di saccarosio in PBS 1x, mantenuti a -80°C. Sono state dunque effettuate sezioni al criostato dei nervi, dello spessore di 25µm, montate poi su vetrini elettrostatici. Per la doppia IF, le sezioni dei nervi sciatici erano incubate overnight con un anticorpo mouse anti-GAP-43 (1:100, Sigma) e con un anticorpo rabbit anti-Cdc2 (1:100, Calbiochem), sciacquate 3 volte in PBS e quindi incubate con un mix degli anticorpi secondari goat anti-mouse coniugato a fluoresceina (FITC, 1:100, Jackson ImmunoResearch) e goat anti-rabbit coniugato a rodamina (TRITC, 1:100, Jackson ImmunoResearch) per 2 h a temperatura ambiente. Infine, le sezioni venivano sciacquate 3 volte in PBS e quindi incubate per 5 minuti con bisBenzimide DNA-fluorocromo (Hoechst 33258, 1:1000, Sigma), risciacquate con PBS, e i vetrini venivano coperti con coprivetrini, montati su glicerolo in PBS 3:1. Immagini dai vetrini venivano catturate a basso ingrandimento (10x) con un microscopio a fluorescenza Olympus Optical BX51, connesso a una camera digitale, e processate con il software I.A.S. della Delta Systems Italia. Per minimizzare la variabilità sperimentale, sezioni da differenti animali venivano trattate con le stesse soluzioni per tutto il procedimento di immunofluorescenza, e le immagini di ciascun campione venivano catturate con lo stesso tempo di esposizione del software I.A.S..

### ***3.3.7 – Analisi dei dati***

Tutti i valori dei test comportamentali sono stati espressi come medie $\pm$ SEM di 8-12 animali per gruppo. Per analizzare gli effetti della somministrazione di BoNT/A negli animali neuropatici, è stata usata un'ANOVA a due vie per misure ripetute. Confronti post-hoc sono stati calcolati utilizzando il test di Tukey-Kramer. Le differenze sono state considerate significative per  $p < 0.05$ .

### **3.4 - Esperimento 3**

#### **Effetti dell'esercizio fisico al treadmill sul dolore neuropatico e sul recupero dopo una lesione nervosa periferica**

---

##### ***3.4.1 – Procedura chirurgica***

Come modello di lesione nervosa periferica in grado di evocare sintomi di dolore neuropatico, è stato usato il CCI (Bennet e Xie, 1988). La procedura è stata precedentemente esposta nel paragrafo 3.3.1.

Prima del CCI, tutti i topi erano sottoposti a un addestramento alla locomozione al treadmill di 2 settimane. L'operazione chirurgica veniva praticata 2 ore dopo l'ultima sessione di allenamento pre-CCI. Nella descrizione seguente, le zampe posteriori intatta (sinistra) e lesionata con CCI (destra) verranno chiamate rispettivamente come contralaterale e ipsilaterale (al CCI).

##### ***3.4.2 – Esercizio fisico al treadmill***

Le sessioni di locomozione al treadmill erano condotte su un treadmill motorizzato a cinque corsie, equipaggiato con un'unità elettronica di controllo (Treadmill Model LE8710, panlab, Cornella, Spagna) e una griglia elettrificata all'estremità opposta al senso di marcia. L'intensità dello shock elettrico era di 0.4 mA, per fornire un leggero stimolo negativo. L'inclinazione del treadmill era di 0° (nessuna inclinazione). Tutti gli animali venivano prima

acclimatati al tappeto del treadmill per 5 min prima di iniziare la locomozione.

La locomozione iniziava a una velocità bassa di 20 cm/sec, equivalente alla normale velocità di locomozione dei topi, e veniva incrementata di 2 cm/sec ogni 5 min, fino a una velocità massima di 52 cm/sec. La locomozione continuava fino all'esaurività, definita come l'incapacità al mantenimento della velocità di corsa nonostante il contatto ripetuto con la griglia elettrica. Gli animali venivano rimossi dal treadmill se restavano per più di 5 sec sulla griglia senza tentare di reingaggiarsi nella corsa. Il tempo all'esaurività era registrato automaticamente dall'inizio della sessione di corsa, con un cut off di 60 min.

In un esperimento preliminare, è stato osservato che i topi CD1 sono solitamente capaci di correre al treadmill secondo le velocità del protocollo in uso. Solo pochi animali rifiutavano ripetutamente il compito, ed essi venivano scartati dall'esperimento.

Prima del CCI, gli animali sono stati addestrati in sessioni giornaliere per 2 settimane, 5 giorni/settimana. Ogni giorno di test, l'analisi comportamentale veniva effettuata durante la tarda mattinata (11.00AM/01:00PM), mentre le sessioni di corsa al treadmill venivano effettuate durante il pomeriggio (02:00PM/04:00PM).

In studi preliminari, è stato osservato che i topi sottoposti a CCI sono in grado di correre al treadmill dal giorno 3 post-CCI secondo i protocolli utilizzati in questo esperimento, senza segni osservabili di stress. Inoltre, il peso corporeo dei topi non variava durante la corsa intensiva al treadmill.

### **3.4.3 – Gruppi sperimentali**

Al 3° giorno post-CCI, tutti i topi precedentemente addestrati per la locomozione al treadmill sono stati assegnati a caso a 3 gruppi sperimentali:

- I. topi che non corrono per tutto il corso temporale post-CCI (*noT*; gruppo di controllo; n=23);
- II. topi che corrono 1 h/giorno per 5 giorni/settimana dal giorno 3 al giorno 7 post-CCI (*T3-7*; n=23);
- III. topi che corrono 1 h/giorno per 5 giorni/settimana dal giorno 3 al giorno 56 post-CCI (*T3-56*; n=14).

In ogni gruppo sperimentale, alcuni animali erano considerati per l'analisi comportamentale mentre altri venivano sacrificati per l'istologia e l'immunofluorescenza (IF) a differenti intervalli temporali dal CCI. Per confronto, è stato testato un gruppo addizionale di topi totalmente sedentari, che sono stati sottoposti al CCI, ma non alla locomozione al treadmill, né prima né dopo il CCI (*ctrl*; n=11).

### **3.4.4 – Allodinia meccanica**

L'inizio della neuropatia indotta dal CCI è stato verificato misurando all'estesimetro la soglia di entrambe le zampe posteriori per uno stimolo meccanico puntiforme non-nocivo (*Dynamic Aesthesiometer Plantar test*). Il test veniva condotto come precedentemente descritto per l'esperimento precedente nel paragrafo 3.3.3. I topi sono stati testati dal giorno 9 pre-CCI al giorno 81 post-CCI.



### ***3.4.5 – Incapacitance test***

Lo spostamento del peso corporeo tra le due zampe posteriori dell'animale è stato determinato tramite un tester dell'incapacitanza, adattato per i topi (Linton Instruments, Norfolk, UK). La procedura è stata descritta nell'esperimento precedente (vedi paragrafo 3.3.4). Gli animali venivano testati dal giorno 7 pre-CCI al giorno 81 post-CCI.

### ***3.4.6 – Walking track analysis***

Il recupero graduale della funzionalità della zampa lesionata è stato monitorato dal giorno 4 al giorno 82 post-CCI attraverso il calcolo dello sciatic static index (Baptista et al., 2007), seguendo la procedura precedentemente descritta (vedi par. 3.3.5).

### ***3.4.7 – Istologia e saggi d'immunofluorescenza***

Per i saggi di IF per l'attivazione di microglia e astrociti, alcuni topi appartenenti ai suddetti gruppi sperimentali sono stati sacrificati al giorno 7 (*noT*, n=6; *T3-7*, n=6) o al giorno 17 (*noT*, n=6; *T3-7*, n=6; *T3-56*, n=6) post-CCI. Gli animali sono stati anestetizzati con cloralio idrato (500 mg/kg, ip); i nervi scitici ipsilaterali e contralaterali venivano immediatamente rimossi prima della perfusione, e venivano mantenuti in immersione per 48 h in paraformaldeide a +4°C. la perfusione trans cardiaca veniva effettuata con 100 ml di salina, seguiti da 100 ml di paraformaldeide 4% in 0.1 M PBS (pH 7.2).

Dopo la perfusione, l'intera colonna spinale di ciascun animale veniva rimossa e successivamente mantenuta in fissazione per 12 h. Sia i nervi che la colonna spinale, dopo crioprotezione con soluzione 30% di saccarosio in PBS, venivano conservati a -80°C fino al sezionamento.

Sezioni trasversali, di spessore di 40 µm, dei segmenti spinali L4/L5 venivano tagliate su un criostato, e conservate in PBS secondo la procedura free-floating per IF. Le sezioni di midollo spinale venivano prima incubate overnight con gli anticorpi mouse anti-CD11b (1:100, Chemicon), e mouse anti-GFAP (1:100, Sigma-Aldrich), in Triton X-100 0.3 % in PBS, sciaquate 3 volte in PBS, e poi incubate con goat anti-mouse fluoresceina-coniugato (FITC, 1:100, Jackson Immuno Research) o goat anti-mouse rodamina-coniugato (TRITC, 1:100, Jackson ImmunoResearch), per 2 h a temperatura ambiente. Infine, le sezioni venivano lavate 3 volte in PBS e quindi incubate con il marker nucleare bisBenzimide, DNA-fluorocromo (Hoechst 33258, 1:1000, Sigma-Aldrich) per 5 minuti. Le sezioni di midollo spinale venivano quindi montate su vetrini, coperti con coprivetrino con tramite glicerolo in PBS 3:1. I controlli includevano sezioni trattate con solo gli anticorpi secondari, e queste non mostravano un'apprezzabile colorazione. Alcuni topi in addizione, non soggetti al CCI (naive, n=4) sono stati utilizzati per stimare lo staining del Cd11b e del GFAP in animali non-lesionati. Le immagini del midollo spinale sono state catturate a una basso (10x) e alto (40x) ingrandimento, tramite un microscopio confocale a scansione laser Zeiss LSM 510 (Zeiss, Thornwood, CA, USA). Per la produzione delle immagini, sono stati aggiustati la luminosità e il contrasto delle immagini e le figure finali sono state assemblate utilizzando i software Adobe Photoshop CS3 e Adobe Illustrator 10.

Sezioni longitudinali dei nervi sciatici, dello spessore di 25  $\mu\text{m}$ , includenti la porzione con le legature, sono state tagliate al criostato e montate direttamente su vetrino. Per il doppio staining di IF, le sezioni di nervo sciatico sono state dapprima incubate overnight con l'anticorpo mouse anti-GAP-43 (1:100, Sigma) e l'anticorpo rabbit anti-Cdc2 (1:100, Calbiochem), sciacquate 3 volte in PBS, e poi incubate con un mix degli anticorpi secondari goat anti-mouse fluoresceina-coniugato (FITC, 1:100, Jackson ImmunoResearch) e goat anti-rabbit rodamina-coniugato (TRITC, 1:100, Jackson ImmunoResearch) per 2 h a temperatura ambiente. Infine, le sezioni venivano sciacquate 3 volte in PBS e quindi incubate per 5 minuti con bisBenzimide DNA-fluorocromo (Hoechst 33258, 1:1000, Sigma), risciacquate con PBS, e i vetrini venivano coperti con coprivetrini, montati su glicerolo in PBS 3:1. Immagini dai vetrini venivano catturate a basso ingrandimento (10x) con un microscopio a fluorescenza Olympus Optical BX51, connesso a una camera digitale (Diagnostic Instruments, Inc, USA), e processate con il software I.A.S. (Delta Systems Italia). Per quantificare le cellule gliali positive nel midollo spinale, 3 sezioni per animale sono state selezionate a caso e analizzate senza che lo sperimentatore ne conoscesse il gruppo di trattamento. In ogni gruppo sono stati inclusi 3 animali. Le immagini del corno dorsale (porzione mediale delle lamine I-IV) o del corno ventrale (colonna dorsolaterale lamina IX) del lato ipsilaterale di ogni animale sono state catturate a un elevato ingrandimento utilizzando un set costante di parametri di acquisizione. L'identificazione dei siti delle lamine è stata aiutata dallo staining con Hoechst dei nuclei cellulari. La quantificazione è stata fatta con il software ImageJ (versione 1.41, National Institutes of Health, USA). Il contrasto delle immagini è stato aggiustato in modo che il livello di background scomparisse, ed è stato utilizzato lo stesso livello di

cut-off per tutte le immagini. Il numero e l'area media delle cellule immunofluorescenti sono state automaticamente contate per ciascuna delle tre sezioni di midollo per animale, dopodiché ne è stata calcolata la media per ciascun gruppo di topi.

#### ***3.4.8 – Analisi statistica***

I dati sono presentati come medie $\pm$ SEM. I dati comportamentali sono stati analizzati tramite un'ANOVA a due vie per misure ripetute, seguita dal test Tukey-Kramer. I dati dell'IF sono stati confrontati tramite il test t di Student. Il criterio di significatività statistica era di  $p < 0.05$ .

## **CAPITOLO 4**

---

### **RISULTATI**



## 4.1 - Risultati dell' Esperimento 1

---

La Figura 17 mostra il decorso temporale della risposta di licking (parte di sinistra) e del tempo cumulativo di licking (parte di destra) durante la fase 1 (0-5 min) e la fase 2 (10-40 min) del dolore indotto da formalina nei differenti gruppi di topi iniettati sc con salina, BoNT/A (parte A) o BoNT/B (parte B). In confronto alla risposta di licking osservata nei topi iniettati sc con salina, l'iniezione sc di BoNT/A (3.75, 7.5, 15 pgtox/topo) non ha alterato significativamente il tempo di licking durante la fase 1 ( $F_{3,43}$ : 2.061;  $p=0.1195$ ); tuttavia è stata osservata una tendenza a ridurre la risposta di licking durante la fase 2 ( $F_{3,43}$ : 2.978;  $p<0.05$ ), maggiormente tra i 10 e i 20 min dall'inizio del test, e questo effetto è risultato dose-dipendente. D'altra parte, l'analisi della varianza ha mostrato un decremento significativo del tempo di licking durante la fase 1 ( $F_{2,30}$ : 1.057;  $p=0.3601$ ), anche se è stata osservata una tendenza a ridurre la risposta di licking.

La Figura 18 mostra il decorso temporale della risposta di licking (parte di sinistra) e il tempo cumulativo di licking (parte di destra) durante la fase 1 (0-5 min) e la fase 2 (10-40 min) del dolore indotto da formalina nei differenti gruppi di topi iniettati icv con salina, BoNT/A (parte A) o BoNT/B (parte B). La Fig. 2 mostra inoltre il tempo cumulativo di licking durante l'interfase (5-10 min). In confronto alla risposta di licking osservata dei topi iniettati icv con salina, l'analisi della varianza ha mostrato nei topi iniettati icv con BoNT/A una significativa riduzione del tempo di licking durante la fase 2 ( $F_{2,31}$ : 5.785;  $p<0.01$ ), mentre la fase 1 e l'interfase non venivano modificate significativamente (rispettivamente  $F_{2,31}$ : 0.252;  $p=0.7785$  e  $F_{2,31}$ : 1.156;

$p=0.3280$ ). Questo effetto era molto simile a quello osservato dopo l'iniezione sc di BoNT/A.

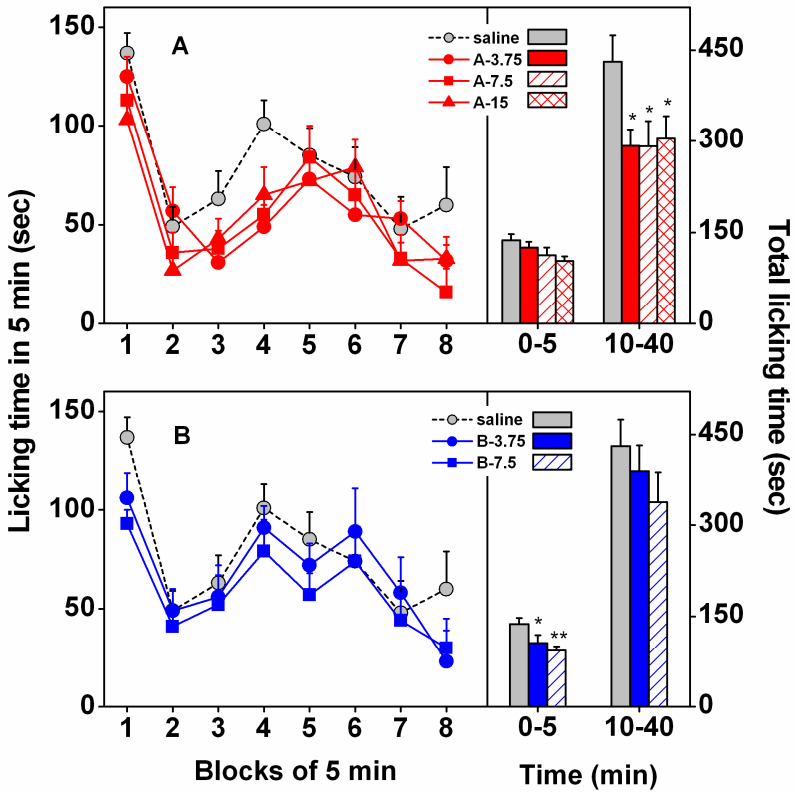
D'altra parte, l'iniezione icv di BoNT/B non ha alterato significativamente il tempo di licking durante entrambe le fasi (rispettivamente per la fase 1 la fase 2,  $F_{2,31}: 0.436$ ;  $p=0.6505$  e  $F_{2,31}: 2.053$ ;  $p=0.1454$ ), ma sorprendentemente, alla dose più elevata, piuttosto aumentava il tempo di licking durante l'interfase ( $F_{2,31}: 3.934$ ;  $p<0.05$ ).

Poiché mancavano effetti di dose-dipendenza per la BoNT/A durante la fase 2, per questo serotipo sono state testate concentrazioni addizionali (sc: 1.875; icv: 0.937). La Figura 19 mostra la curva dose-risposta degli effetti antinocicettivi della BoNT/A sulla fase 2 (10-40 min) del dolore indotto da formalina, riportato come percentuale di variazione rispetto ai topi iniettati con salina. La curva dose-risposta era più o meno simile per entrambe le modalità di somministrazione. Inoltre, BoNT/A esercitava un particolare effetto antinocicettivo con un incremento molto stretto della percentuale di antinocicezione per la porzione 0-1.875 pgtox/topo, e raggiungendo un plateau a dosi maggiori di 1.875 pgtox/topo. Il livello antinocicettivo massimo era uguale al 35%.

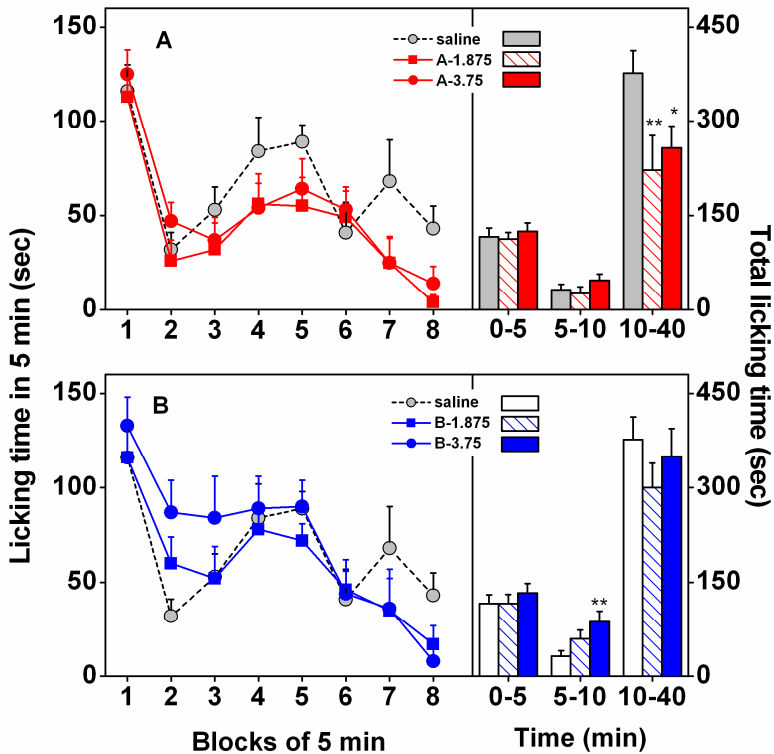
La Figura 20 mostra gli istogrammi raggruppati del corso temporale del comportamento di attività e di grooming, registrati nei gruppi di topi iniettati sc o icv con salina, BoNT/A o BoNT/B. Sono stati fatti i confronti tra le due modalità di somministrazione per la dose 3.75 pgtox/topo. Nei topi iniettati con salina sc o icv si osserva una tendenza simile: 1) un declino progressivo del tempo trascorso nell'attività durante il test della formalina, che indica l'abituazione degli animali, e 2) un comportamento di grooming piuttosto costante durante il test. I topi iniettati con BoNT/A o BoNT/B non si comportano diversamente rispetto ai topi iniettati



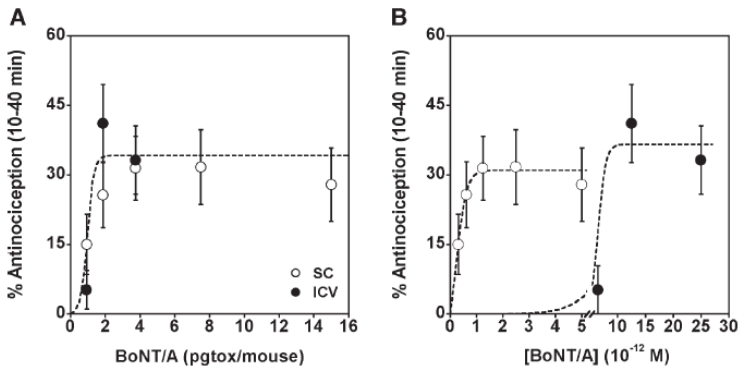
con salina: livelli di attività più elevati sono stati registrati solamente durante i primi 10 minuti negli animali iniettati sc con BoNT/B e in quelli iniettati icv con BoNT/A. Piuttosto, è importante sottolineare che la depressione del tempo di licking che si osserva nei topi BoNT/A durante la seconda fase del test della formalina, sia se iniettati sc che icv, non è accompagnata da alterazioni significative di attività e grooming. Inoltre, l'incremento del tempo di licking nei topi BoNT/B iniettati icv durante l'interfase del test non è accompagnata da alterazioni significative di questi comportamenti. Questi risultati dimostrano che le alterazioni del comportamento di licking nei topi iniettati con le BoNTs non sono dovuti ad alterazioni significative di altri comportamenti, come l'attività generale e il grooming.



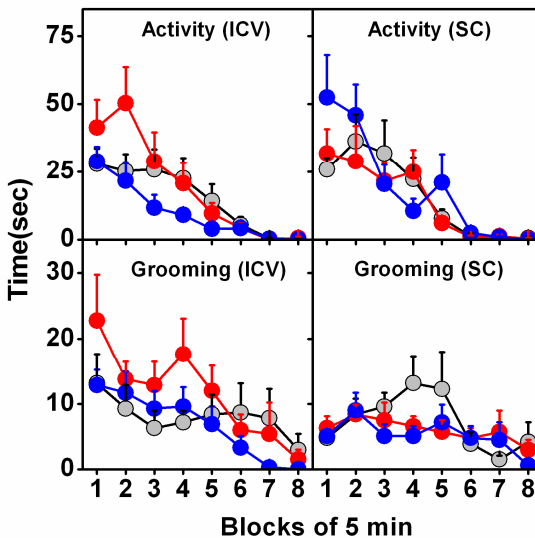
**Figura 17.** Effetti dell'iniezione sc di salina, BoNT/A o BoNT/B sul comportamento di licking indotto dall'iniezione di formalina. L'iniezione di salina ( $\circ$ ,  $n = 12$ ), BoNT/A. Il grafico mostra il tempo totale di licking durante la fase 1 (0–5 min) e la fase 2 (10–40 min) del test della formalina in: (A) topi iniettati sc con salina o BoNT/A ( $\bullet$ , 3.75,  $n = 11$ ;  $\blacksquare$ , 7.5,  $n = 12$ ;  $\blacktriangle$ , 15,  $n = 12$ ; pgtox/topo), e (B) topi iniettati sc con salina o BoNT/B ( $\bullet$ , 3.75,  $n = 11$ ;  $\blacksquare$ , 7.5,  $n = 10$ ; pgtox/topo). Significatività statistica: (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , vs. topi iniettati sc con salina (PLSD di Fisher).



**Figura 18.** Effetti dell'iniezione icv di salina, BoNT/A o BoNT/B sul comportamento di licking indotto dall'iniezione di formalina. L'iniezione di salina ( $\circ$ ,  $n = 12$ ), BoNT/A. Il grafico mostra il tempo totale di licking durante la fase 1 (0–5 min), l'interfase (5–10 min) e la fase 2 (10–40 min) del test della formalina in: (A) topi iniettati icv con salina o BoNT/A ( $\blacksquare$ , 1.875,  $n = 11$ ;  $\bullet$ , 3.75,  $n = 12$ ; pgtox/topo), e (B) topi iniettati icv con salina o BoNT/B ( $\blacksquare$ , 1.875,  $n = 12$ ;  $\bullet$ , 3.75,  $n = 12$ ; pgtox/topo). Significatività statistica: (\*)  $P < 0.05$ , (\*\*)  $P < 0.01$ , vs. topi iniettati icv con salina (PLSD di Fisher).



**Figura 19.** Curva dose-risposta dell'effetto antinocicettivo di BoNT/A sulla fase 2 del comportamento di licking indotto dall'iniezione di formalina. L'antinocicezione è calcolata con l'equazione:  $\% \text{Antinocicezione} = (1 - \text{LT2}_{\text{BoNT/A}} / \text{LT2}_{\text{SAL}}) \times 100$ , dove LT2 indica il tempo cumulative di licking registrato nei topi iniettati con BoNT/A o salina durante la fase 2 (10–40 min) del test della formalina. Le dosi di BoNT/A sono espresse come: (A) picogrammi di tossina per topo (pgtox/mouse) o (B) concentrazione molare.



**Figura 20.** Effetti dell'iniezione sc o icv di 3.75 pgtox/mouse di BoNT/A o /B sul decorso temporal del comportamento di activity e grooming durante i 40 min del test della formalina. Gruppi di controllo sono stati iniettati sc o icv solamente con salina. Il tempo trascorso in activity e grooming è stato registrato negli stessi esperimenti come nel Grafico 1 e 2.

## 4.2 - Risultati dell' Esperimento 2

---

Nella Figura 21 è rappresentata la normale soglia di retrazione delle zampe destra e sinistra posteriori nel gruppo di topi naive (senza CCI).

La Figura 22 mostra invece che il CCI nei topi di controllo induce lo sviluppo di una robusta allodinia meccanica, con un decremento del 40-50% della soglia di retrazione della zampa ipsilaterale rispetto alla contralaterale. Questa risposta allodinica è mantenuta per almeno un mese e, anche se ridotta, è ancora presente dopo 3 settimane dal CCI.

Negli animali con CCI, una singola iniezione di 15 pg/zampa di BoNT/A ha 5 o a 12 giorni dal CCI ha marcatamente antagonizzato l'allodinia meccanica ipsilaterale, mostrando un netto aumento della soglia di retrazione della zampa lesionata, con un recupero di circa il 30% (Figure 23, 24 e 26). L'effetto antiallodinico ipsilaterale è inoltre immediato, sin dal giorno successivo la somministrazione, e si mantiene sorprendentemente per almeno 3 settimane (Figura 23). A 90 giorni dal CCI, i topi a cui è stata iniettata questa dose di BoNT/A raggiungono all'incirca i valori della zampa contralaterale intatta, mentre gli animali di controllo iniettati con salina (Figura 22) o con una dose più bassa di BoNT/A (7.5 pg/zampa; Figura 22) si dimostrano ancora lontani da questi valori. Inoltre, gli animali iniettati con la dose di BoNT/A 7.5 pg/zampa, confrontati con la dose di BoNT/A 15 pg/zampa, mostrano un effetto antiallodinico di tipo dose-risposta (Figura 22). Tuttavia la riduzione dell'allodinia osservata dopo l'iniezione della dose più bassa non si manteneva per tutto il corso della neuropatia, ma solo fino al giorno 17 ( $p < 0.05$ ; Tukey-Kramer). Non sono state considerate dosi di BoNT/A più elevate di 15 pg/zampa in quanto

dopo somministrazione periferica essa è risultata essere la massima dose senza effetti collaterali (Luvisetto et al., 2003, 2006).

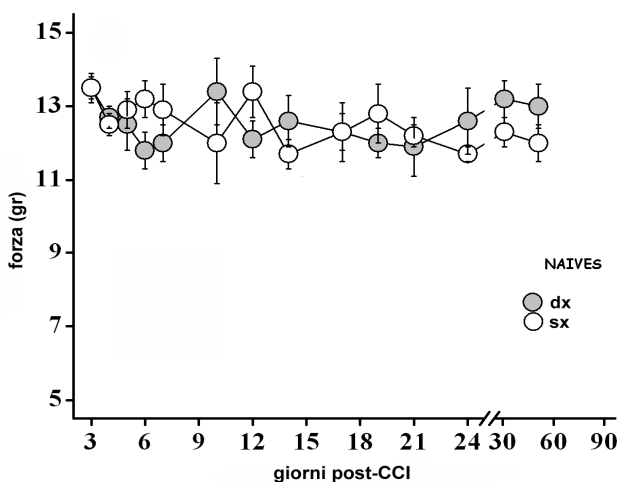
L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha dimostrato un effetto generale del trattamento ( $F_{3,27}=22,323$ ;  $P<0.0001$ ), del fattore tempo ( $F_{16,432}=15.158$ ;  $P<0.0001$ ) e dell'interazione significativa ( $F_{48,432}=6.061$ ;  $P<0.0001$ ). Dai confronti post-hoc tra controlli (topi iniettati con salina) e topi iniettati con BoNT/A sono emerse differenze significative dal giorno successivo l'iniezione fino al giorno 24 post-CCI ( $P<0.05$ , Tukey-Kramer). Il primo risultato maggiore di questo esperimento è quindi che una sola dose di BoNT/A è risultata efficace contro l'allodinia meccanica per tutto il decorso della neuropatia.

Nella Figura 25, invece, sono rappresentate le soglie di retrazione degli animali iniettati con BoNT/A 15 pg/zampa 3 giorni prima l'operazione del CCI (Figura 27 per il rapporto percentuale). In questi topi, l'iniezione preventiva di BoNT/A non ha risultato alcun effetto significativo sul decorso dell'allodinia meccanica.

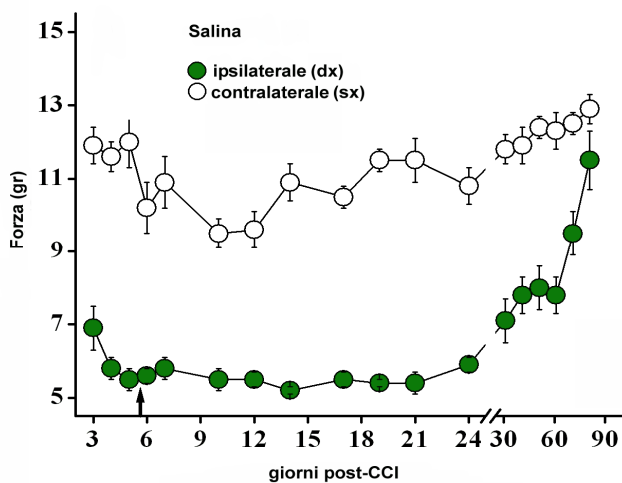
A differenza degli animali iniettati con BoNT/A, negli animali neuropatici la somministrazione di BoNT/B (3.75 pg/zampa) il giorno 5 post-CCI è risultata non avere alcun effetto significativo sull'allodinia meccanica (Figure 28 e 29). Il secondo importante risultato di questo esperimento è quello, dunque, che il serotipo /B della neurotossina del botulino non è efficace nel modello di dolore neuropatico del CCI. Per questo motivo, la somministrazione di BoNT/B e i suoi effetti non sono stati ulteriormente indagati nei test successivi. Non sono state considerate dosi di BoNT/B più elevate di 3.75 pg/zampa perché, dopo somministrazione periferica, questa è risultata essere già la dose massima senza effetti collaterali (Luvisetto et al., 2003, 2006). Poiché l'iniezione contralaterale di BoNT/A ha mostrato effetti simili a quelli osservati con l'iniezione contralaterale di salina (vedi per confronto

le forze di retrazione contralaterali nel gruppo di controllo, Figura 22, e nei gruppi BoNT/A, Figura 23 e 24), gli effetti antiallodinici osservati nella zampa ipsilaterale non possono dipendere dall'induzione di rilassamento muscolare da parte della tossina.

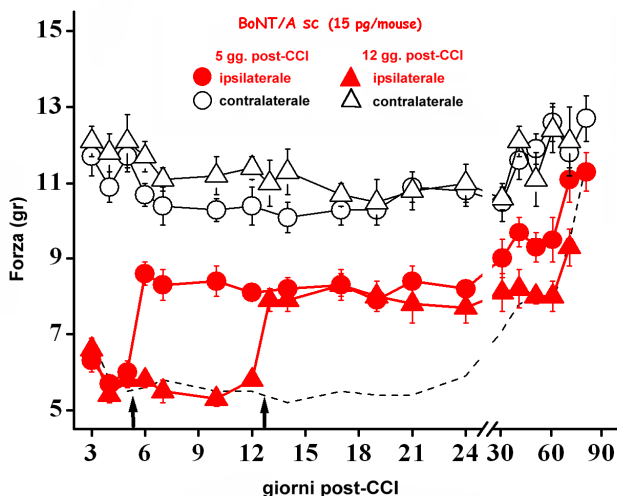
La Figura 30 mostra che la distribuzione bilanciata del peso tra le zampe posteriori, nonché l'indice del 50% del test di incapacitazione (Incapacitance test) presente prima del giorno 0 (il giorno dell'operazione), viene alterato dopo l'induzione del CCI, come evidenziato dal minore peso distribuito sulla zampa ipsilaterale: almeno il 20% del peso della zampa ipsilaterale veniva spostato sulla zampa contralaterale. Questo effetto durava 24 giorni, dopo i quali i topi iniziavano a recuperare il normale bilanciamento del peso. L'iniezione di BoNT/A (15 pg/zampa, ipl) induce una completa inversione dello sbilanciamento di peso, e l'indice di



**Figura 21.** Soglia di retrazione delle zampe destra e sinistra posteriori, gruppo naive.

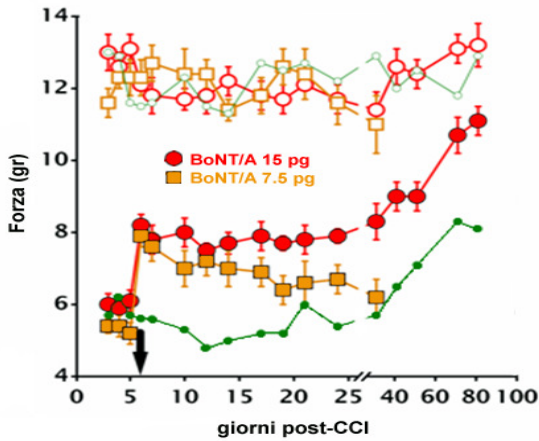


**Figura 22.** Soglia di retrazione delle zampe ipsilaterale e contralaterale al CCI. Gli animali sono stati iniettati il giorno 5 post-CCI con salina come gruppo di controllo.

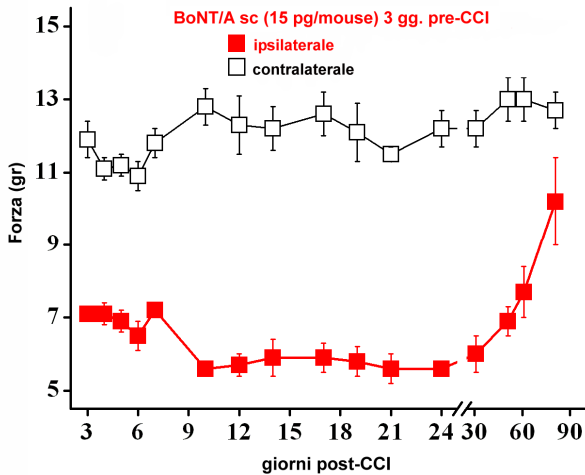


**Figura 23.** Soglia di retrazione delle zampe ipsilaterale e contralaterale al CCI, di animali iniettati il giorno 5 e il giorno 12 post-CCI con BoNT/A (15pg). La linea tratteggiata riporta il gruppo salina.

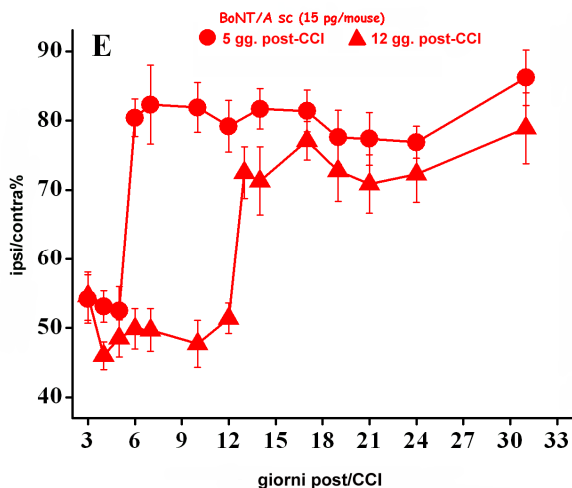




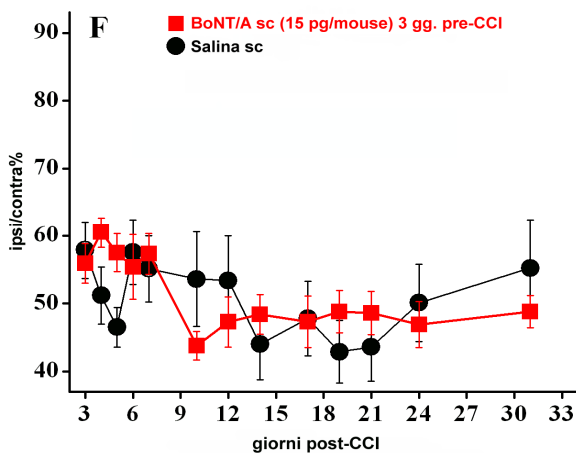
**Figura 24.** Soglia di retrazione delle zampe ipsilaterali (simboli pieni) e contra laterali (simboli vuoti) al CCI, di animali iniettati il giorno 5 post-CCI con BoNT/A 15 pg/zampa o con BoNT/A 7.5 pg/zampa. In verde è riportato il gruppo salina.



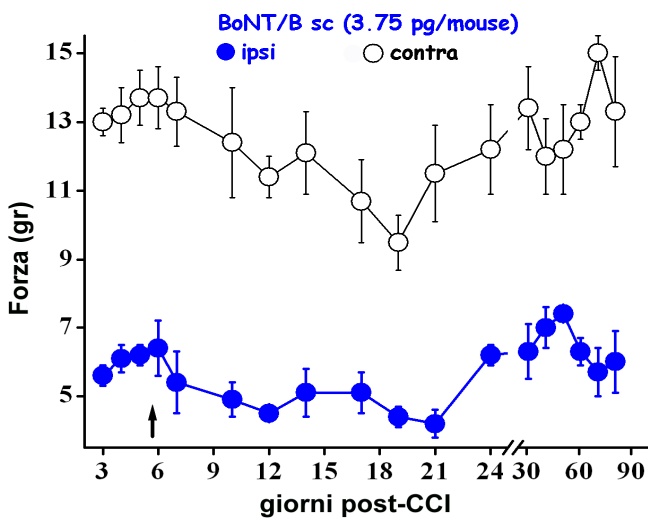
**Figura 25.** Soglia di retrazione delle zampe ipsilaterale e contralaterale al CCI, di animali iniettati 3 giorni prima del CCI con BoNT/A (15pg).



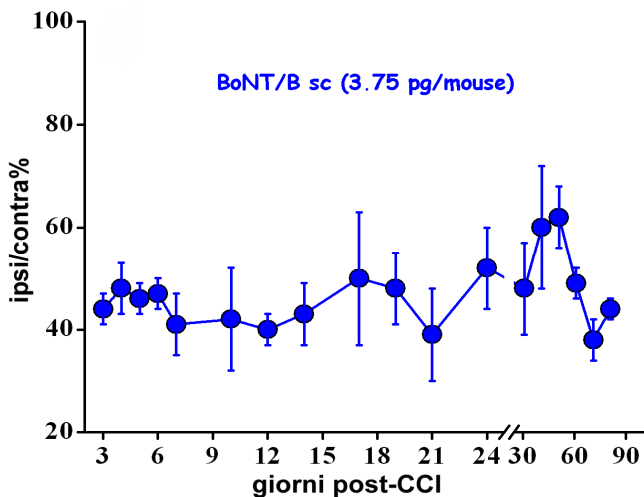
**Figura 26.** Rapporto percentuale tra soglia di retrazione ipsilaterale e contralaterale dei topi iniettati il giorno 5 e il giorno 12 post-CCI con BoNT/A (15pg).



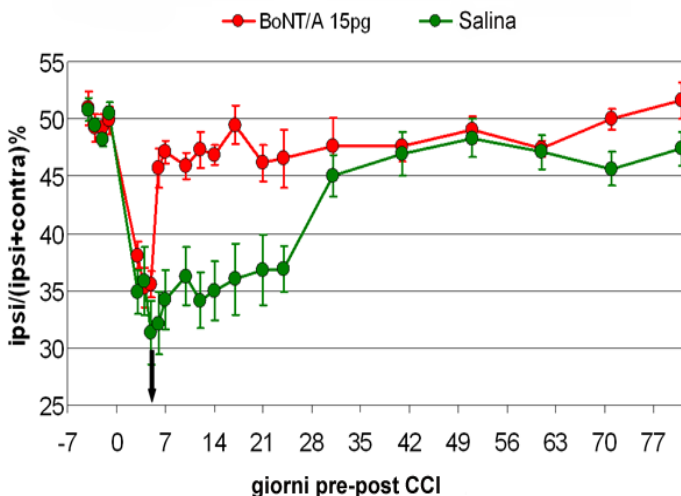
**Figura 27.** Rapporto percentuale tra soglia ipsilaterale e contralaterale dei topi iniettati 3 giorni pre-CCI con BoNT/A (15 pg) e con salina.



**Figura 28.** Soglia di retrazione delle zampe ipsilaterale e contralaterale al CCI, di animali iniettati il giorno 5 post-CCI con BoNT/B (3.75 pg).



**Figura 29.** Rapporto percentuale tra soglia ipsilaterale e contralaterale dei topi iniettati il giorno 5 post-CCI con BoNT/B (3.75 pg).



**Figura 30.** Effetto di una singola iniezione ipli di BoNT/A 15 pg/zampa o salina effettuata il giorno 5 post-CCI sulla distribuzione del peso dei topi (incapacitante test).

incapacitanza si avvicina ai valori di controllo registrati prima del CCI. Come per il test dell'estesimetro, questo effetto era già evidente il giorno successivo l'iniezione di BoNT/A, ed esso si manteneva per l'intero corso dell'esperimento. Una ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato un effetto significativo per il trattamento ( $F_{1,18}=22,312$ ;  $p<0.001$ ), per i giorni ( $F_{10,180}=7,487$ ;  $p<0.0001$ ), e un'interazione significativa ( $F_{10,180}=7,019$ ;  $p<0.0001$ ). Dai confronti post-hoc è emersa una differenza significativa tra topi iniettati salina e topi iniettati BoNT/A, dal giorno seguente l'iniezione di BoNT/A (giorno 6 post-CCI) fino al giorno 24 ( $p<0.05$ , Tukey-Kramer).

La Figura 31 mostra un tipico esempio del pattern di locomozione delle zampe posteriori di un topo iniettato ipl con salina e un topo iniettato con BoNT/A (15 pg/zampa), raccolti a 10 e a 40 giorni dopo il CCI. Nei topi iniettati con salina, il pattern di locomozione era simile a 10 e a 40 giorni dal CCI: l'apertura delle dita della zampa contralaterale (la sinistra) era ben definita e la lunghezza dell'impronta della zampa era normale, mentre l'apertura delle dita della zampa ipsilaterale al CCI (la destra) non era ben definita, la lunghezza dell'impronta era allungata, e la sua forma completamente anormale. Nei topi iniettati con BoNT/A, 40 giorni dopo il CCI la forma delle zampe ipsilaterali era normalizzata, con una ben definita apertura delle dita della zampa, indicando chiaramente un processo di recupero del corretto posizionamento della zampa.

La Figura 32 mostra lo sciatic static index ipsilaterale, calcolato dalle impronte degli animali iniettati ipl con salina o con BoNT/A (15 pg/zampa), partendo dal giorno 10 post-CCI.

Al giorno 10, sia i topi salina che i topi BoNT/A mostrano la parziale denervazione del nervo sciatico, come evidenziato dal valore dell'indice di circa -80. Nei topi iniettati con salina, i valori dello sciatic static index crescevano lentamente durante il decorso della neuropatia, ad indicare un debole recupero funzionale durante i tre mesi di osservazione degli animali. D'altra parte invece, i valori dello sciatic static index dei topi iniettati con BoNT/A crescevano rapidamente dopo 18 giorni

**Figura 31.** Esempi di impronte derivate da un topo iniettato ipl nella zampa destra (CCI) con salina (sopra), in confronto a un topo iniettato ipl nella zampa destra (CCI) con BoNT/A 15 pg/zampa (sotto). Per ciascun animale, sono riportate le impronte a 10 giorni (sinistra) e a 40 giorni (destra) dal CCI.

## Salina



10 gg. post-CCI



40 gg. post-CCI

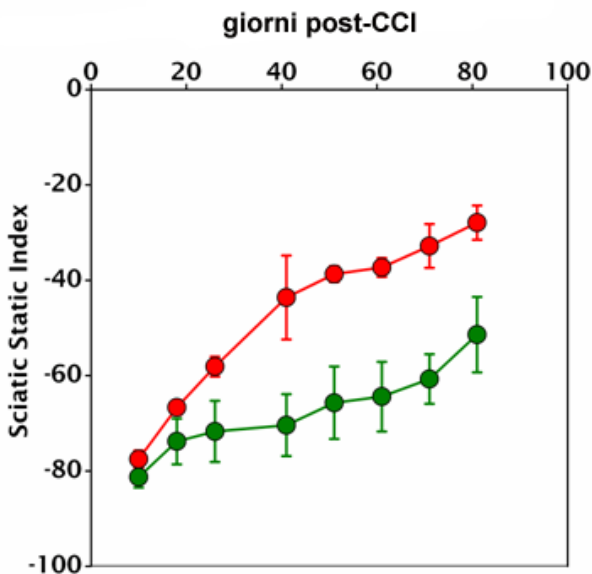
## BoNT/A



10 gg. post-CCI



40 gg. post-CCI



**Figura 32.** Effetti di una singola iniezione ipl ipsilaterale di salina o di BoNT/A (15 pg/zampa) sullo sciatic static index, calcolato secondo Baptista et al. (2007).

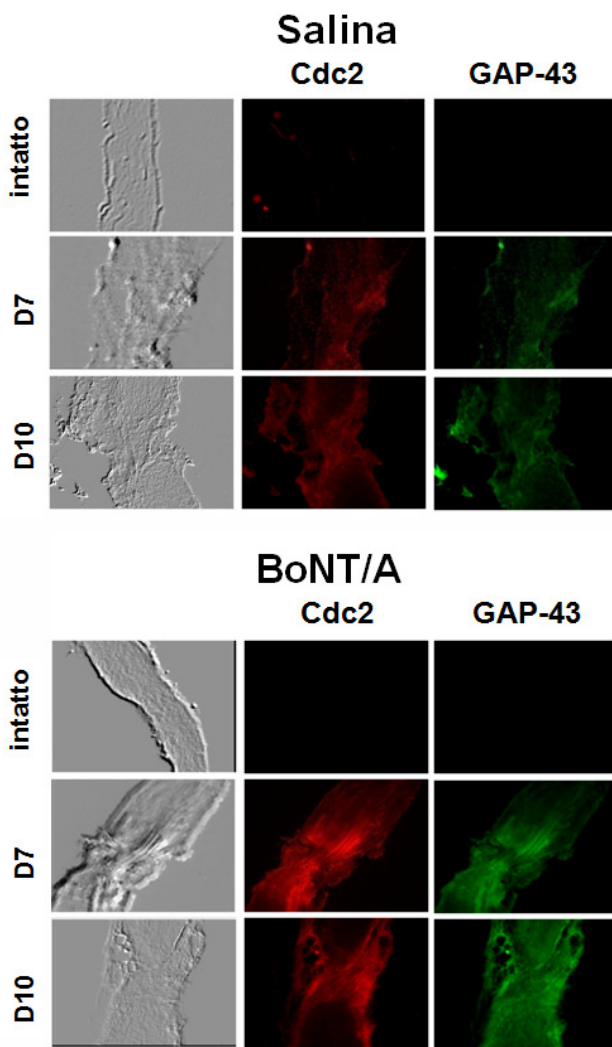
dal CCI, riflettendo un significativo recupero della funzionalità della zampa lesionata. L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha mostrato effetti significativi per il trattamento ( $F_{1,13}=17,419$ ;  $P<0.005$ ), i giorni ( $F_{7,91}=30,140$ ;  $p<0.0001$ ) e una interazione significativa ( $F_{7,91}=4,078$ ;  $p<0.001$ ). Dai confronti post-hoc è emersa una differenza significativa tra i gruppi salina e BoNT/A per tutti i giorni di test.

La lesione è normalmente seguita da cambiamenti nella sintesi di proteine neuronali che sono ritenute necessarie al sostenimento della susseguente rigenerazione assonale. La parte superiore della

Figura 33 mostra l'espressione di Cdc2 e GAP-43 nella parte prossimale alla legatura del nervo sciatico nei topi trattati con salina (gruppo di controllo) o con BoNT/A, 7 o 10 giorni dopo il CCI. I pannelli corrispondenti al trattamento con salina (in alto) dimostrano che il processo rigenerativo associato alla lesione del nervo è di solito accompagnato dall'espressione della proteina Cdc2. Successivamente all'iniezione di BoNT/A, i relativi pannelli dell'IF (in basso) mostrano un'immediata e aumentata espressione di Cdc2, indipendentemente dal giorno dell'iniezione della tossina. Una simile differenza si osserva circa l'espressione della proteina GAP-43 nei nervi CCI dei topi iniettati con BoNT/A rispetto i topi salina.

La parte distale del nervo sciatico lesionato più vicina al corpo cellulare non ha mostrato differenze di IF in confronto ai nervi sciatici di controllo (nervi intatti contralaterali al CCI) (dati non mostrati).





**Figura 33.** Immunofluorescenza dell'espressione proteica di Cdc2 e GAP-43 dopo iniezione di BoNT/A nei nervi sciatici con CCI, in confronto all'iniezione di salina. La BoNT/A o la salina sono state iniettate il giorno 5 post-CCI; i campioni di nervi sciatici sono stati prelevati il giorno 7 o il giorno 10 post-CCI, fissati e processati per IF con anticorpi specifici per le proteine Cdc2 e GAP-43.

### 4.3 - Risultati dell' Esperimento 3

---

La soglia meccanica nocicettiva delle zampe posteriori ipsilaterali e contralaterali è stata misurata nei topi sedentari (*ctrl*) e nei topi *noT* dal giorno 9 pre-CCI al giorno 81 post-CCI. In entrambi i gruppi, la soglia meccanica nocicettiva dopo il CCI diminuiva del 40-50% nella zampa ipsilaterale in confronto a quella contralaterale (Figura 34, pannello superiore). Poiché gli animali ritraevano la zampa ipsilaterale allo stesso modo dopo stimoli di intensità molto bassa (5-6 gr), che invece non evocavano una reazione nella zampa contralaterale, la risposta ipsilaterale è stata considerata allodinia meccanica. L'allodinia si manteneva per almeno un mese e, anche se ridotta, era ancora presente dopo 3 mesi dal CCI. Questi risultati indicano che le 2 settimane di addestramento al treadmill precedenti al CCI nel gruppo dei topi *noT* non ha interferito con l'onset dell'allodinia meccanica ipsilaterale dopo il CCI. Per questo motivo, nell'analisi seguente, il gruppo *noT* è stato considerato come l'appropriato gruppo di controllo.

Il pannello intermedio del Figura 34 mostra che una settimana di locomozione al treadmill dopo il CCI è sufficiente per antagonizzare marcatamente l'allodinia meccanica ipsilaterale: il gruppo di topi *T3-7* mostra un chiaro aumento della soglia di retrazione della zampa ipsilaterale, con un rapido recupero del 30%. Sorprendentemente, i topi *T3-7* mantengono questo effetto anche dopo l'interruzione dell'allenamento al treadmill, ed essi alla fine dell'esperimento raggiungono i valori della forza di retrazione della zampa contralaterale (giorno 81 post-CCI). Differentemente, il pannello in basso della Figura 34 mostra che

l'allenamento al treadmill prolungato oltre la prima settimana dal CCI nel gruppo di topi *T3-56*, abolisce l'effetto benefico della prima settimana di locomozione al treadmill, e compromette fortemente il recupero spontaneo dell'allodinia indotta dal CCI. L'ANOVA per misure ripetute (inclusendo i gruppi *noT*, *T3-7* e *T3-56*) ha mostrato un effetto significativo per il trattamento ( $F_{2,28}=51.604$ ;  $p<0.0001$ ), i giorni ( $F_{18,504}=56.518$ ;  $p<0.0001$ ) e un'interazione significativa ( $F_{36,504}=10.350$ ;  $p<0.0001$ ). Dai confronti post-hoc sono emerse differenze significative a partire dal giorno 5 post-CCI tra il gruppo *T3-7* e il gruppo *noT*, e tra il gruppo *T3-56* e il gruppo *noT*. La differenza si manteneva invece per tutto il decorso temporale dell'esperimento solo per il gruppo *T3-7*, mentre il gruppo *T3-56* solo fino al giorno 10 post-CCI ( $p<0.05$ , Tukey-Kramer). Il gruppo *T3-56* differiva significativamente dal gruppo *noT* a partire dal giorno 30 per tutto il corso sperimentale ( $p<0.05$ , Tukey-Kramer).

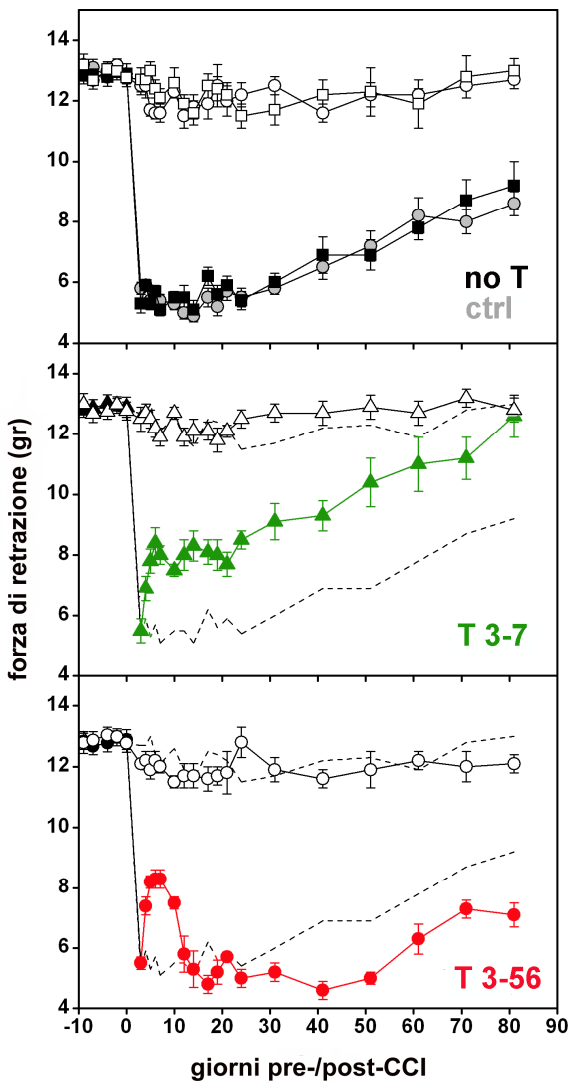
Il normale bilanciamento del peso corporeo del 50%, calcolata prima del CCI, come eguale distribuzione tra le zampe ipsilaterali e contralaterali posteriori, veniva alterato dopo il CCI. Nel gruppo *noT*, almeno il 30% del peso della zampa ipsilaterale veniva spostato sulla zampa contralaterale (Figura 35, pannello superiore). Questo effetto durava almeno 24 giorni, dopo i quali i topi *noT* iniziavano a recuperare la corretta distribuzione del peso corporeo. L'esercizio al treadmill ha indotto una completa inversione dello sbilanciamento del peso corporeo, con l'indice di incapacitanza che progressivamente si è avvicinato ai valori di controllo registrati prima del CCI. Come per l'allodinia meccanica, questo effetto era già evidente dopo la prima sessione di locomozione al treadmill. Ancora, i topi *T3-7* erano in grado di mantenere bilanciato il peso del corpo durante tutto il decorso temporale della neuropatia. Invece, i valori di incapacitanza dei

topi *T3-56* (Figura 35, pannello inferiore), dapprima simili ai valori dei topi *T3-7* durante la prima settimana di esercizio al treadmill post-CCI, decrescevano progressivamente durante la seconda settimana. Inoltre, quando i topi *noT* iniziavano a recuperare la corretta distribuzione del peso, i topi *T3-56* mantenevano ancora il comportamento di postura scorretto. L'ANOVA per misure ripetute ha mostrato effetti significativi per il trattamento ( $F_{2,36}=24.687$ ;  $p<0.0001$ ), i giorni ( $F_{17,612}=9.130$ ;  $p<0.0001$ ) e un'interazione significativa ( $F_{34,612}=8.531$ ;  $p<0.0001$ ). dai confronti post-hoc sono emerse differenze significative tra i gruppi *T3-7* e *T3-56* dal giorno 4 fino al giorno 24 post-CCI, e tra i gruppi *T3-56* e *noT* dal giorno 4 fino al giorno 19 post-CCI ( $p<0.05$ , Tukey-Kramer). Inoltre, i topi *T3-56* differivano dai topi *noT* dal giorno 31 fino al giorno 61 nel senso di un peggioramento del corretto bilanciamento del peso ( $p<0.05$ , Tukey-Kramer).

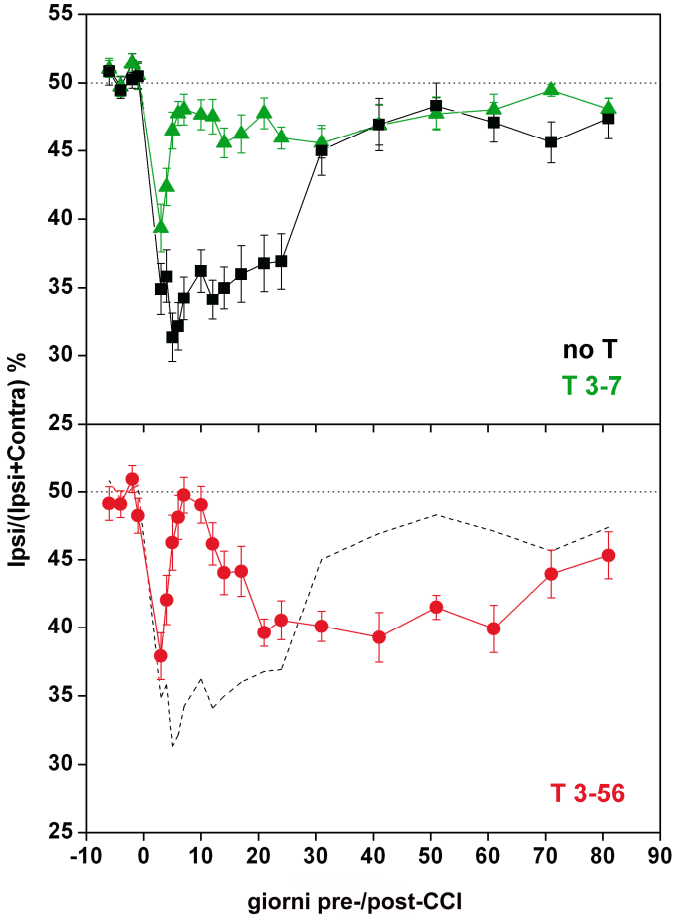
L'analisi delle impronte individuali delle zampe posteriori ha rivelato che, al giorno 11 post-CCI, l'apertura delle dita della zampa contralaterale era ben definita e la lunghezza della zampa era normale, mentre l'apertura delle dita della zampa ipsilaterale non era ben definita e la lunghezza era anormale, sia nei topi *noT*, che nei *T3-7* e *T3-56* (esempi rappresentativi sono mostrati nella Figura 36). A 42 giorni dal CCI, le impronte dei topi *noT* e dei topi *T3-56* apparivano essenzialmente uguali a quelle osservate precedentemente al giorno 11. Invece, nei topi *T3-7* la lunghezza dell'impronta ipsilaterale era decrementata, mentre l'apertura delle dita della zampa appariva ben definita, indicando una normalizzazione prossima del posizionamento della zampa a 42 giorni circa dopo il CCI.

Dalle impronte dei topi appartenenti ai tre gruppi, sono stati calcolati i valori dello sciatic static index (SSI) come funzione dei

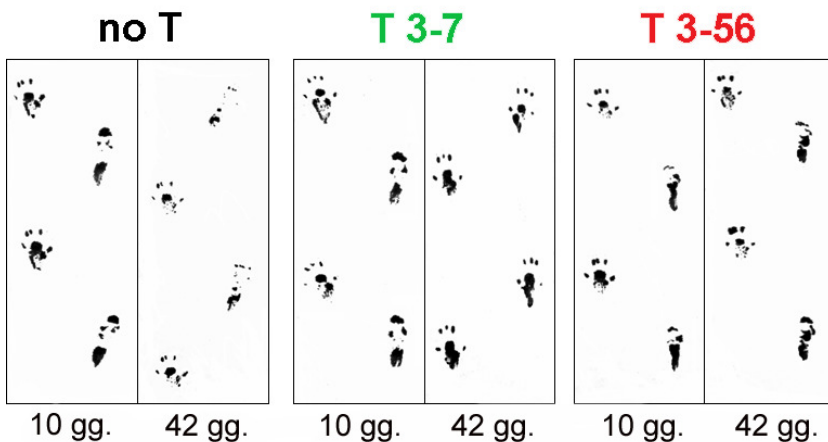
giorni post-CCI (Figura 37). Nel grafico dell'SSI, i valori vicini allo 0 rappresentano la normale funzione del nervo sciatico, mentre quelli prossimi a -100 significano una completa perdita della sua funzione. Al giorno 4, si instaurava un deficit funzionale ipsilaterale, come evidenziato da valori dell'SSI di circa -70 nei topi *noT*. In questi animali, l'SSI rimaneva costante per tutto il primo mese dopo il CCI, e lentamente cresceva durante le successive settimane con un evidente recupero funzionale della zampa ipsilaterale 3 mesi dopo il CCI. Sorprendentemente, una singola sessione giornaliera di esercizio al treadmill era già in grado di diminuire l'SSI dei topi *T3-7* e *T3-56* da -70 a -60 (Figura 37). Va ricordato che valori negativi maggiori dell'SSI indicano una maggiore perdita della funzionalità del nervo sciatico. I valori dell'SSI dei topi *T3-7* decrescevano rapidamente dal giorno 11 post-CCI, riflettendo un significativo miglioramento della funzionalità della zampa lesionata (Figura 37). Invece, i valori dell'SSI dei topi *T3-56*, inizialmente simili a quelli dei topi *T3-7* misurati al giorno 4, dal giorno 11 al giorno 42 divenivano simili ai valori dei topi *noT*. Inoltre, dal giorno 42 al giorno 82 i topi *T3-56* conservavano valori negativamente maggiori dei topi *noT*, anche se non in modo significativo (Figura 37). L'ANOVA per misure ripetute ha mostrato degli effetti significativi per il trattamento ( $F_{2,24}=7.798$ ;  $p=0.0025$ ), i giorni ( $F_{7,168}=14,639$ ;  $p<0.0001$ ) e un'interazione significativa ( $F_{14,168}=2.056$ ;  $p<0.0323$ ). I confronti post-hoc hanno mostrato differenza significative tra il gruppo *T3-7* e gli altri gruppi, dal giorno 25 al giorno 82 post-CCI ( $p<0.05$ , Tukey-Kramer). Al contrario, non sono state trovate differenze significative tra i gruppi *noT* e *T3-56* durante il corso temporale dell'esperimento.



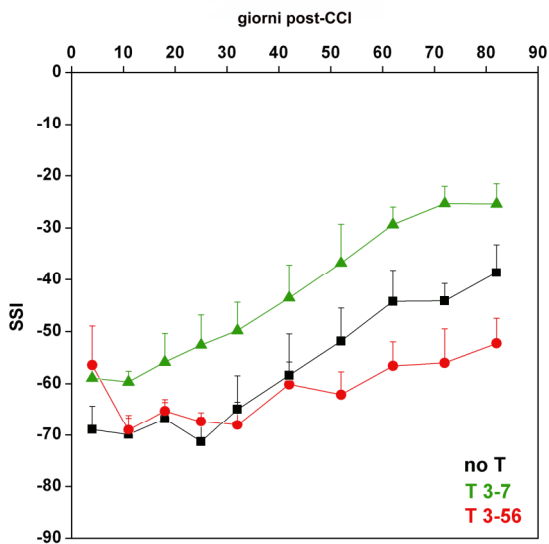
**Figura 34.** Effetti di differenti protocolli di esercizio al treadmill sul dolore neuropatico indotto da CCI. (In ogni pannello, i simboli vuoti indicano i valori della zampa contralaterale, quelli pieni i valori della zampa ipsilaterale).



**Figura 35.** Effetti di differenti protocolli di esercizio al treadmill sulla distribuzione del peso corporeo tra le zampe posteriori dopo CCI. Le linee tratteggiate indicano il corretto bilanciamento del peso (50% distribuito su ciascuna zampa posteriore).



**Figura 36.** Pattern di locomozione di topi soggetti al CCI del nervo sciatico della zampa destra, appartenenti ai differenti gruppi sperimentali (per ciascun gruppo, è mostrato un esempio rappresentativo a 10 giorni e a 42 giorni post-CCI).



**Figura 37.** Effetti di differenti protocolli di esercizio al treadmill sullo sciatic static index (SSI) dopo CCI.



L'analisi dei markers della glia nelle sezioni di midollo spinale a differenti intervalli temporali post-CCI ha rivelato un differente pattern di attivazione in relazione ai protocolli di esercizio al treadmill.

A 7 giorni post-CCI, nel gruppo sperimentale *noT* è stata osservata una forte espressione di microglia attivata (Figura 38A) e di astrociti (Figura 38B), localizzati nel lato ipsilaterale del midollo spinale (per una rassegna dei dati sull'espressione della glia spinale dopo lesione nervosa periferica, confronta Aldskogius e Kolzova, 1998; Hu et al., 2007; Jergova e Chizkova, 2007). Allo stesso punto temporale, negli animali naive, l'espressione delle cellule gliali attivate era molto bassa sia per la microglia che per gli astrociti (dati non mostrati). In confronto ai topi *noT*, nel gruppo di topi *T3-7* è stata individuata un'espressione marcatamente più bassa dell'attivazione di microglia e astrociti, nelle sezioni ipsilaterali sia del corno dorsale (DHI) che di quello ventrale (VHI). La quantificazione dei dati (Figura 40) mostra differenze significative tra i topi *noT* e i topi *T3-7* circa il numero e l'area media delle cellule gliali.

In base ai precedenti dati comportamentali (vedi Figure 34 e 35), è stato scelto il giorno 17 post-CCI come secondo punto temporale per l'IF. A questo punto temporale, infatti, nei topi che continuavano la locomozione al treadmill dopo la prima settimana gli effetti benefici dell'esercizio precoce al treadmill apparivano completamente revertiti. L'analisi dell'attivazione della microglia a 17 giorni post-CCI ha mostrato due principali caratteristiche (Figura 39A). Primo, rispetto alle immagini dell'IF della microglia raccolte dai topi *noT* al giorno 7 (Figura 38A), le immagini dei topi *noT* prese al giorno 17 post-CCI mostrano una ridotta espressione della microglia. Secondo, sia nei topi *T3-7* che nei topi *T3-56* al giorno 17, in confronto con i topi *noT* allo stesso

giorno, l'espressione della microglia attivata è prevalentemente abolita. Questa forte riduzione dell'attivazione della microglia indotta dall'esercizio al treadmill è indipendente dal protocollo di esercizio al treadmill adottato. La quantificazione dei dati (Figura 40) mostra significative differenze tra i due gruppi (*T3-7* e *T3-56*) e il gruppo di controllo *noT* rispetto il numero e l'area media della microglia.

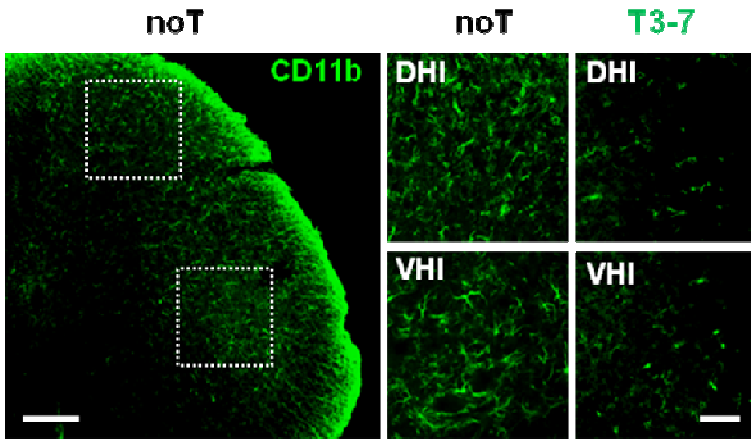
L'analisi dell'espressione degli astrociti attivati al giorno 17 post-CCI (Figura 39B) mostra alcune caratteristiche differenti rispetto la microglia. Nel topi *noT* l'espressione degli astrociti attivati al giorno 17 è simile a quella osservata nei *noT* al giorno 7. Tuttavia allo stesso punto temporale, in confronto ai topi *noT*, l'espressione degli astrociti attivati nei topi *T3-7* è ridotta. Differentemente dai topi *T3-7*, l'espressione degli astrociti attivati nei topi *T3-56* è simile a quella osservata nei topi *noT*. La quantificazione dei dati dimostra che vi è una significativa riduzione nei topi *T3-7* rispetto gli altri due gruppi sia del numero che dell'area media degli astrociti.

Le caratteristiche morfologiche di sia gli astrociti che la microglia sono generalmente conservate attraverso i gruppi sperimentali e i due punti temporali considerati. Le cellule microgliali mostrano una forma ramificata con processi sottili, radialmente proiettanti o polarizzati, spesso presentando ramificazioni ben sviluppate. Gli astrociti mostrano processi snelli e sottili, che vanno incontro a una marcata ipertrofia, come confermato da una maggiore area media delle cellule, in parallelo a un maggior numero di esse, specialmente nei topi *noT* ai giorni 7 e 17, e nei topi *T3-56* al giorno 17. La distribuzione cellulare appare piuttosto omogenea anche se possono essere identificati cluster di astrociti ipertrofici e ramificati.

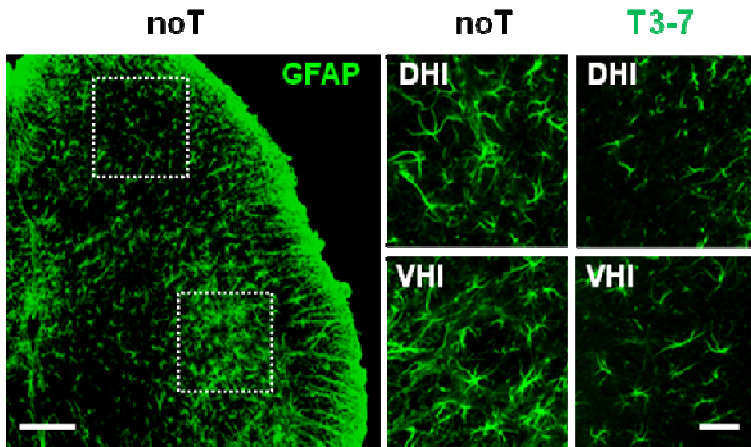
Presi insieme, i risultati delle Figure 38 e 39 indicano che l'esercizio al treadmill è stato efficace nel ridurre l'espressione della microglia attivata al giorno 7 e al giorno 17 post-CCI, mentre nel ridurre l'espressione degli astrociti attivati l'esercizio al treadmill è stato efficace nei topi che hanno corso solamente la prima settimana dopo il CCI.

La Figura 41 mostra l'espressione di Cdc2 e GAP-43 in alcuni esempi rappresentativi di sezioni di nervo sciatico ipsilaterali (lesionati) e contralaterali (intatti), nei topi *noT* e *T3-7*, come ottenuto dall'analisi di IF del nervo al giorno 7 post-CCI. Poiché la parte del nervo sciatico vicina al corpo cellulare, distale alla lesione, non ha mostrato differenze significative in confronto ai nervi di controllo contralaterali intatti (dati non mostrati), nell'IF è stata analizzata solamente la parte del nervo comprendente la legatura. I pannelli della Figura 41 corrispondenti ai topi *noT* dimostrano che processi rigenerativi associati alla lesione nervosa sono di solito accompagnati dall'espressione sia di Cdc2 che di GAP-43. Nei topi *T3-7* al giorno 7 post-CCI, dopo solamente una settimana di locomozione al treadmill, è osservabile un'aumentata espressione sia di Cdc2 che di GAP-43. Al giorno 17, l'espressione di sia Cdc2 che di GAP-43 nei nervi lesionati dei topi *noT* e *T3-56* appare aumentata, tuttavia in entrambi i gruppi di animali il danno morfologico del nervo appare ancora evidente. Invece, nei topi *T3-7* la morfologia del nervo lesionato appare perlopiù recuperata già al giorno 17. Infine, tutti i nervi intatti contralaterali non mostrano espressione specifica di Cdc2 o GAP-43.

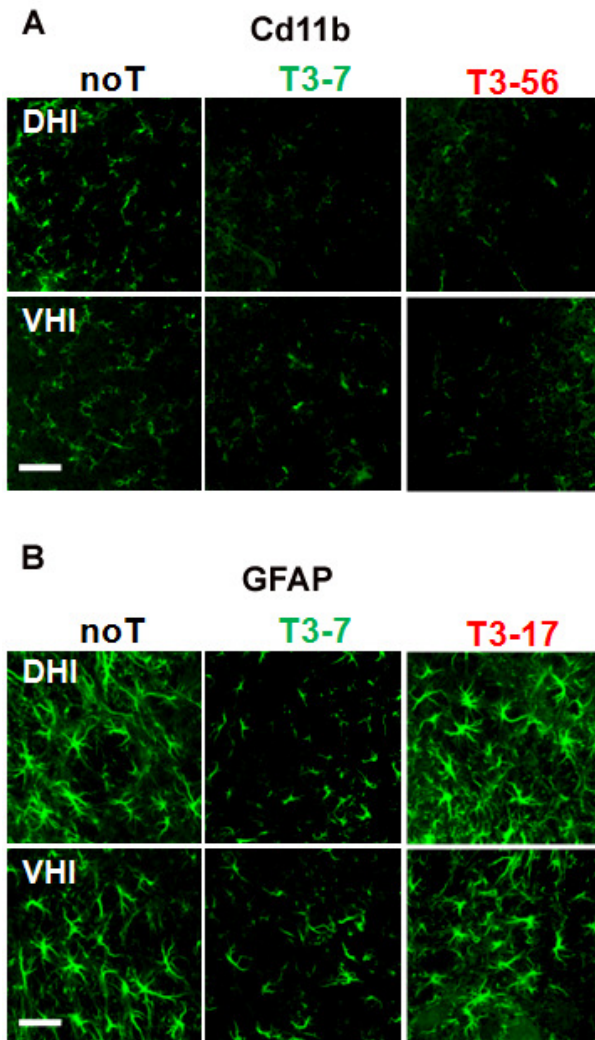
**A**



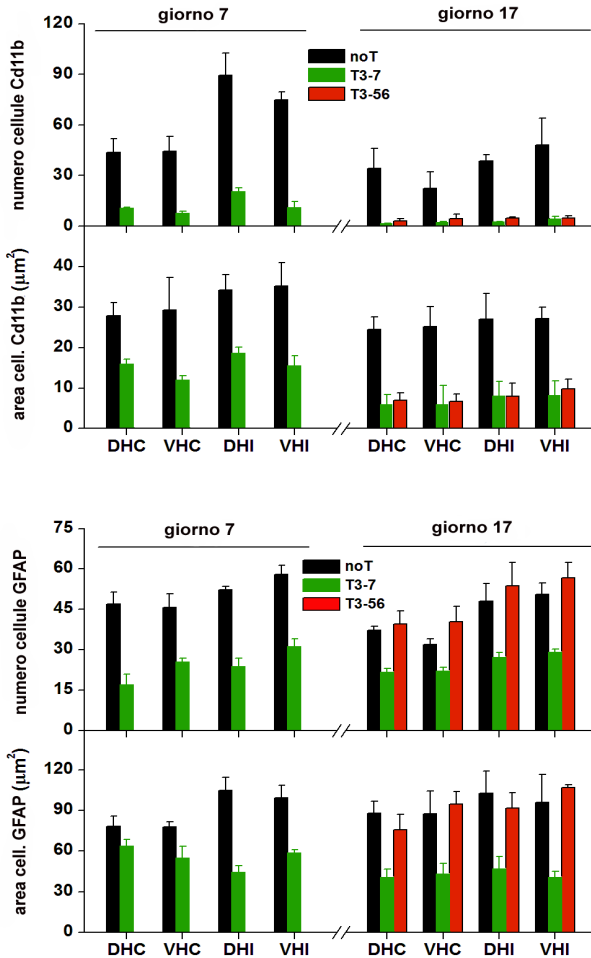
**B**



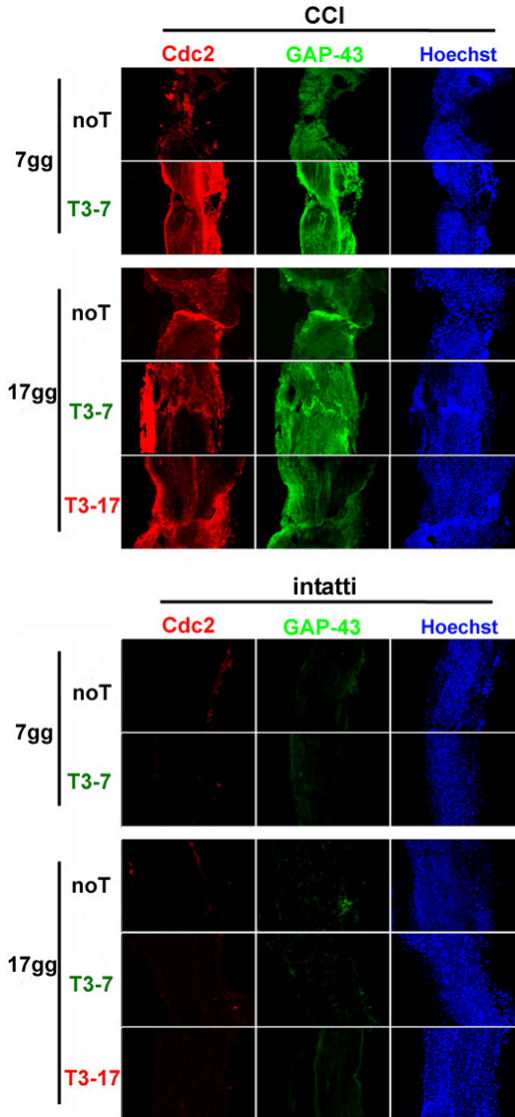
**Figura 38.** Immagini confocali della differente espressione di microglia (Cd11b, pannello A) e astrociti (GFAP, pannello B) nei topi *noT* e *T3-7* a 7 giorni post-CCI. DHI= corno dorsale ipsilaterale; VHI= corno ventrale ipsilaterale.



**Figura 39.** Immagini confocali della differente espressione di microglia (Cd11b, pannello A) e astrociti (GFAP, pannello B) nei topi *noT* e *T3-7* a 17 giorni post-CCI. DHI= corno dorsale ipsilaterale; VHI= corno ventrale ipsilaterale.



**Figura 40.** Numero di cellule e area di microglia (Cd11b) e astrociti (GFAP) calcolati dalle immagini ad alto ingrandimento acquisite per i vari gruppi sperimentali a 7 e a 17 giorni post-CCI. I valori sono calcolati come media di 3 sezioni per topo, considerando 3 topi per ciascuna condizione sperimentale. DHI= corno dorsale ipsilaterale; VHI= corno ventrale ipsilaterale; DHC= corno dorsale contralaterale; VHC= corno ventrale contralaterale.



**Figura 41.** Effetto di differenti protocolli di allenamento al treadmill sull'induzione delle proteine Cdc2 e GAP-43 nei nervi sciatici lesionati, a 7 e 17 giorni dal CCI.





## **CAPITOLO 5**

---

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**



## 5.1 –Esperimento 1: discussione e conclusioni

---

Il risultato principale di questo esperimento è che le BoNTs possono modulare il dolore infiammatorio a livello centrale. In particolare, è stato osservato che la BoNT/A e la BoNT/B esercitano effetti differenti sulle risposte comportamentali indotte dalla protratta stimolazione nocicettiva della formalina, e che queste differenze dipendono dalla modalità di somministrazione e dal serotipo considerato.

Nei topi iniettati sc, è stato osservato un effetto antinocicettivo della BoNT/A principalmente nella fase 2 del test della formalina; al contrario, BoNT/B non influisce significativamente sulla fase 2, ma ha effetto antinocicettivo solo sulla fase 1. Gli effetti analgesici indotti dalla BoNT/A nei topi sono paragonabili a quelli già osservati nei ratti da Cui et al. (2004). Utilizzando concentrazioni di BoNT/A (BOTOX®) in una gamma di 3.5-15 U/Kg, Cui et al. avevano riportato una riduzione sia della risposta di licking indotta dalla formalina, sia del rilascio locale di glutammato durante la fase 2 del test della formalina. Assumendo che 100 unità equivalgono a 4.8 ng di neurotossina (Cui et al., 2004), il range di 3.75-15 pgtox/topo corrisponde approssimativamente a quello di 3.5-15 U/Kg nei ratti.

Anche nei topi iniettati icv, il dolore indotto da formalina è ridotto dalla BoNT/A durante la fase 2 del test. Con maggior sorpresa, BoNT/B abolisce l'inibizione dell'interfase che occorre tra le due fasi di dolore. Tuttavia, né la BoNT/A né la BoNT/B influiscono sul comportamento nocicettivo durante la fase 1.

Questi risultati indicano un differente meccanismo di azione delle BoNTs, dipendente sia dal serotipo che dalla modalità di

somministrazione. Da una parte BoNT/A attenua il dolore durante la fase 2 del test indipendentemente se iniettata perifericamente o centralmente; dall'altra BoNT/B induce iperalgesia nell'interfase del test quando somministrata centralmente, mentre induce una parziale analgesia in entrambe le fasi se invece iniettata perifericamente. Queste particolari risposte sollevano due importanti domande che dovrebbero essere considerate per una discussione: 1) gli effetti periferici e/o centrali dipendono dall'interazione delle BoNTs con differenti sistemi neurotrasmettitoriali? e 2) questi diversi effetti sono dovuti al differente taglio delle proteine SNARE?

Rispondendo alla prima domanda, si può suggerire che gli effetti analgesici indotti dalla BoNT/A sulla fase 2 del test della formalina dipendano dal blocco del rilascio di neurotrasmettitore eccitatorio durante la sensitizzazione periferica e centrale del dolore. Alcuni studi in letteratura confermano questa ipotesi. BoNT/A inibisce il rilascio di sostanza P nei terminali del nervo trigemino del muscolo dello sfintere dell'iride del coniglio (Ishikawa et al., 1999), e in colture neuroni dei DRG (Purkiss et al., 2000; Welch et al., 2000); inoltre, essa inibisce il rilascio di CGRP da colture di gangli del trigemino del ratto (Durham et al., 2004). E' stato riportato che questo serotipo di botulino inibisce il rilascio di glutammato evocato dalla formalina nella zampa del ratto (Cui et al., 2004). Questi dati dimostrano che la BoNT/A può bloccare non solo il rilascio di ACh dai neuroni colinergici, come ci si aspetta secondo il suo effetto canonico sulla giunzione neuromuscolare, ma anche il rilascio di molecole eccitatorie che sono coinvolte nella percezione del dolore, nella vasodilatazione e nell'infiammazione neurogenica. D'altra parte, come spiegazione degli effetti analgesici della BoNT/B nella fase 1 del test della formalina nei topi iniettati sc, sembra più plausibile

un'azione di modulazione del rilascio di neurotrasmettitori inibitori dai terminali sensoriali primari, piuttosto che sul rilascio di neurotrasmettitori eccitatori durante i processi di sensitizzazione del dolore.

Gli effetti sull'interfase del test della formalina nei topi iniettati icv con BoNT/B suggeriscono che questo serotipo può modulare l'attività dei percorsi inibitori, in particolare del sistema GABAergico. Questa ipotesi viene rinforzata se si considera la differenza tra la somministrazione periferica e centrale: BoNT/B è capace di bloccare l'interfase solo dopo iniezione centrale, in accordo con l'assenza della modulazione inibitoria del GABA a livello dei terminali periferici nocicettivi. Quindi, la perdita dell'interfase dopo iniezione centrale di BoNT/B può essere discussa nei termini di una modulazione centrale del sistema GABAergico.

E' stato dimostrato che, pochi minuti dopo l'instaurarsi del danno tissutale indotto dalla formalina, un rilascio di GABA occorre insieme a un'attivazione dei recettori GABAA nel midollo spinale, che contribuisce al periodo di quiescenza tra le due fasi del test (Green e Dickenson, 1997; Kaneko et al., 1997). Il rilascio spinale di GABA, in risposta all'iniezione periferica di formalina, può originare da molte fonti, inclusi gli interneuroni GABAergici inibitori del corno dorsale, i neuroni GABAergici nella medulla ventromediale, e i neuroni che dalla sostanza grigia periacqueduttale proiettano alla colonna spinale. I recettori GABA sono ubiquitammentemente distribuiti e formano un complesso sistema con multipli controlli inibitori discendenti, attraverso vari trasmettitori inclusi monoamine e oppioidi. Franklin and Abbott (1993) hanno riportato che pentobarbital, diazepam e alcool eliminano il declino dell'interfase nella risposta del dolore durante il test della formalina, indicando una modulazione del

dolore dei recettori GABAA. E' stata inoltre riportata iperalgesia durante l'interfase in ratti alimentati con acqua contenente  $\alpha$ -difluoro-metilornitina (Kergozien et al., 1999), la quale interferisce direttamente con la trasmissione GABAergica coinvolta nell'inibizione centrale dei meccanismi antinocicettivi (Ferchmin et al., 1993).

Un recente lavoro di Verderio et al. (2004) ha mostrato che il riciclo delle vescicole nei neuroni glutamatergici ippocampali è bloccato da BoNT/A e BoNT/B, mentre gli stessi processi nei neuroni GABAergici ippocampali vengono bloccati dalla BoNT/B ma non dalla BoNT/A. Lo staining di vari anticorpi contro SNAP-25 ha rivelato che questa proteina è specificamente presente nei neuroni glutamatergici. In contrasto, i neuroni GABAergici mancano di immunoreattività per la SNAP-25. Lo staining con anticorpi contro SNAP-23, omologa della SNAP-25, ha mostrato la sua presenza nei neuroni sia glutamatergici che GABAergici. SNAP-23 non viene tagliata dalla BoNT/A, e ciò spiegherebbe perché la BoNT/A non è capace di bloccare i neuroni GABAergici. Poiché BoNT/B agisce su un'altra proteina del complesso SNARE, VAMP/sinaptobrevina, questo serotipo può bloccare sia i neuroni glutamatergici che quelli GABAergici.

Considerando tutte queste evidenze, si può ipotizzare che l'effetto della BoNT/B sull'interfase del dolore da formalina può essere parzialmente ascritto al blocco funzionale dell'inibizione presinaptica di GABA sulle fibre afferenti primarie del corno dorsale spinale. Se ciò fosse vero, l'ipotesi originerebbe un apparente paradosso. Infatti, se BoNT/B agisse come un antagonista GABA, si dovrebbe osservare un incremento della percezione di dolore non solo durante l'interfase ma anche

durante la seconda fase. Ciò è quanto accade durante il test della formalina nei ratti trattati con l'antagonista dei recettori GABA<sub>A</sub> bicucullina (Green e Dickenson, 1997; Kaneko e Hammond, 1997), ovvero bloccando l'inibizione GABAergica e facilitando gli input eccitatori ai neuroni delle corna dorsali, il comportamento di dolore durante sia l'interfase che la fase 2 del test della formalina viene incrementato.

Una possibile spiegazione per questo effetto può essere ottenuta dal fatto che BoNT/B blocca il riciclo delle vescicole sinaptiche sia nei neuroni GABAergici che glutammatergici (Verderio et al., 2004). L'abolizione dell'interfase nei topi iniettati icv con BoNT/B senza l'aumento del licking nella fase 2 del test, può essere il risultato dell'azione della BoNT/B non solo sulle vie inibitorie ma anche su quelle eccitatorie. Ciò è confermato dalla parziale, ma non significativa, riduzione della risposta di licking durante la fase 2 del test della formalina nei topi iniettati sc con BoNT/B (Grafico 1B). Nei topi iniettati sc, l'effetto della BoNT/B sulle vie spinali inibitorie non dovrebbe essere presente, e potrebbe essere smascherato il blocco delle vie eccitatorie.

In conclusione, questo esperimento dimostra che nel dolore indotto da formalina: 1) BoNT/A esercita, in vivo, un effetto analgesico sulla fase 2, indipendentemente dalla modalità di somministrazione; e 2) BoNT/B esercita un effetto analgesico sulla fase 1, quando somministrata localmente, mentre se somministrata centralmente, essa esercita un forte effetto iperalgesico sull'interfase del test.

Da questi risultati emergono tre punti principali che dovrebbero essere considerati per gli studi futuri e l'utilizzo delle BoNTs. Il primo punto è che le BoNTs possono agire non solo a livello periferico, ma anche a livello centrale; il secondo punto è che i serotipi delle BoNTs differiscono nella loro azione di

modulazione del dolore, indicando che essi non sono interscambiabili basandosi sul semplice rapporto di dosaggio; infine il terzo punto si riferisce al coinvolgimento di altri sistemi neurotrasmettitoriali oltre quello colinergico riguardo all'effetto neuronale delle BoNTs. Tutti questi sono estremamente importanti nella prospettiva del sempre più crescente interesse per le BoNTs nella pratica clinica. Inoltre, l'ultima osservazione è fondamentale per la comprensione dei meccanismi coinvolti nell'azione delle BoNTs: BoNT/A e BoNT/B potrebbero interagire con i sistemi inibitori e/o eccitatori nella modulazione del dolore infiammatorio persistente. Gli studi successivi, nei quali saranno indagati gli effetti della combinazione farmacologica delle BoNTs con agonisti/antagonisti GABAergici e glutamatergici e con markers neurochimici, permetteranno una comprensione migliore dell'interazione delle BoNTs con questi sistemi neurotrasmettitoriali nella modulazione del dolore.



## 5.2 – Esperimento 2: discussione e conclusioni

---

Il presente studio indica che la BoNT/A è un promettente candidato per il trattamento del dolore neuropatico come dato di fatto, a) la BoNT/A riduce significativamente l'ampiezza dei sintomi del dolore neuropatico, nonché l'allodinia meccanica, indotta dalla legatura del nervo sciatico nei topi; b) l'effetto antiallodinico è di lunga durata dopo una singola iniezione di BoNT/A; c) contemporaneamente alla riduzione del dolore compaiono nei topi segni di recupero funzionale come dimostrato dal recupero del normale carico di peso sulle zampe posteriori, e dall'analisi del pattern di locomozione; d) il recupero funzionale è associato ad un' accelerazione dei processi rigenerativi come dimostrato dai cambiamenti dell'espressione di alcune proteine associata alla lesione nervosa ed alla riparazione del nervo, come le proteine Cdc2 e GAP-43. Presi insieme, questi risultati suggeriscono una efficace interferenza della BoNT/A con i fenomeni associati all'insorgenza del dolore neuropatico.

Il dolore neuropatico è un fenomeno complesso, che risulta da un danno al sistema nervoso centrale e/o periferico; ciò implica l'incremento dell'imput afferente primario insieme all'incremento della facilitazione discendente e allo sviluppo di fenomeni di plasticità neuronale. La sensitizzazione periferica e centrale viene accompagnata da un' alterata neurotrasmissione dei percorsi sia eccitatori che inibitori, e da cambiamenti funzionali e strutturali. L'alterazione dell'eccitabilità e di cambiamenti dell'espressione genica hanno ruoli funzionali nel dolore neuropatico (Fukuoka e Noguchi, 2002; Ringkamp e Meyer, 2005).

L'allodinia meccanica associata alla neuropatia indotta dal modello CCI è correlata ad eventi periferici e centrali, durante i quali l'infiltrazione delle cellule non-neuronali, come le cellule di Schwann, i mastociti, i macrofagi e l'astroglia, gioca un ruolo determinante (Marchand et al., 2005; Scholtz e Woolf, 2007). Questi elementi rilasciano fattori (es. TNF $\alpha$ , prostaglandine, NGF etc.) i quali iniziano e mantengono anomalie sensoriali dopo la lesione, agendo sugli assoni stessi o retrogradamente trasportati ai corpi cellulari nei DRG dove essi possono modificare l'espressione genica (Scholtz e Woolf, 2007). Il serotipo A della neurotossina del botulino può possedere l'abilità di interferire con questi multifaccettati processi.

E' estremamente importante sottolineare che solamente una singola somministrazione di BoNT/A è sufficiente a contrapporsi alla risposta allodinicica indotta dalla legatura del nervo sciatico, e che l'effetto analgesico è molto rapido nell'onset e di notevole lunga durata: i topi iniettati con BoNT/A, confrontati con i controlli, hanno mostrato una più elevata soglia per lo stimolo meccanico nell'estesimetro sin dal giorno successivo il trattamento; questo incremento veniva mantenuto per numerosi giorni, mentre il recupero fisiologico, osservabile nei controlli, iniziava ad apparire lentamente dopo 30 giorni. Un'azione di analgesia della BoNT/A è stata osservata anche sul dolore infiammatorio indotto da formalina (Cui et al., 2004; Luvisetto et al., 2006) e sul dolore evocato da iniezione intradermica di capsaicina, sulla temperatura cutanea, sull'iperalgisia e sulle risposte vasomotorie (Gazerani et al., 2007). Inoltre sono stati riportati gli effetti di soppressione dell'applicazione periferica di BoNT/A sull'ipersensibilità termica e meccanica in ratti con transezione parziale del nervo sciatico (Bach-Rojecky et al., 2005).

Le neurotossine del botulino interferiscono con la neurotrasmissione bloccando l'esocitosi attraverso il taglio di una delle proteine del complesso SNARE. E' stato visto che la BoNT/A taglia specificamente la proteina SNAP-25, e la BoNT/B taglia specificamente la proteina VAMP/sinaptobrevina (Schiavo et al., 2000).

Alcuni recenti dati sperimentali, differentemente dagli studi iniziali che si focalizzavano sull'acetilcolina come target primario delle neurotossine del botulino, hanno rivelato che altri neurotrasmettitori sono modulati dalla BoNT/A, in particolare alcuni interferenti con il dolore. Come precedentemente detto, è stata osservata una riduzione del rilascio di glutammato in animali soggetti al dolore da formalina (Cui et al., 2004) come della sostanza P (Ishikawa et al., 2000) e del CGRP (Lucioni et al., 2008) in modelli di lesione acuta ed infiammazione cronica. Gli effetti analgesici della BoNT/A possono essere almeno in parte ricondotti alla neurotrasmissione del glutammato, che è il neurotrasmettitore più coinvolto nello sviluppo del dolore neuropatico (Osikowicz et al., 2008).

Nei topi, gli effetti antiallodinici sono stati inoltre seguiti parallelamente dal recupero della normale postura e locomozione, come rilevato dal test dell'incapacitanza e dall'analisi del pattern di locomozione. Gli animali con la legatura del nervo sciatico poggiavano meno la zampa lesionata sulla superficie durante la locomozione, e questo deficit funzionale è stato antagonizzato significativamente dalla somministrazione di BoNT/A. questi risultati indicano chiaramente una correlazione tra l'effetto antiallodinico indotto dalla BoNT/A e il recupero funzionale della zampa ipsilaterale.

E' noto che il sistema nervoso periferico possiede la capacità di rigenerazione del tessuto: fenomeni di sprouting sono evidenti a

seguito di una lesione assonale periferica (Vargas e Barres, 2007). Quando viene indotta una neuropatia negli animali, si sviluppa un processo composito di degenerazione assonale, associata all'infiltrazione di cellule del sistema immunitario, come macrofagi e cellule gliali. Le cellule di Schwann giocano un importante ruolo nei processi sia degenerativi che rigenerativi (Gupta et al., 2006). L'interazione spaziale e temporale tra cellule di Schwann e macrofagi è determinante per provvedere un microambiente favorevole allo sprouting assonale, al prolungamento ed alla maturazione (De la Hoz, 2003). Inoltre, la lesione nervosa e i conseguenti processi di rigenerazione inducono marcati cambiamenti nella differente espressione di geni e proteine nei neuroni sensoriali.

In accordo con quanto detto, nell'IF dei nervi lesionati degli animali trattati con BoNT/A è stato osservato un livello significativamente più elevato di Cdc2 e GAP-43 rispetto ai nervi dei topi iniettati con salina. Cdc2 è una chinasi prototipica ciclin-dipendente, che regola la fase mitotica del ciclo cellulare (Pines, 1999) e i processi di migrazione cellulare (Manes et al., 2003). E' stata osservata inoltre una forte induzione di Cdc2 nei nervi in rigenerazione (Namgung et al., 2004). Un recente lavoro di Han e colleghi (2007) ha fornito insight sui meccanismi di rigenerazione nervosa, mostrando una nuova funzione di Cdc2 e di altri membri della famiglia Cdk nel sistema nervoso. Essi hanno dimostrato che a seguito di lesione del nervo sciatico, cellule di Schwann isolate mostrano un'elevata espressione di Cdc2 e un'aumentata migrazione, e che l'inibizione di Cdc2 può bloccare questo effetto, mentre l'incrementata espressione di Cdc2 aumenta la migrazione cellulare. L'altra proteina coinvolta nei nostri risultati, la GAP-43 è una proteina up-regolata negli afferenti sensoriali primari a seguito di lesione nervosa periferica,

ed è correlata allo stato di rigenerazione nervosa (Bradbury et al., 2000). Essa è presente nell'area circostante il danno nervoso, ma è fortemente incrementata a seguito di trattamenti che facilitano i processi rigenerativi (Chong et al., 1994; Aigner et al., 1995).

In conclusione è stato dimostrato che una singola iniezione di BoNT/A ma non di BoNT/B è sufficiente non solo a ridurre l'allodinia meccanica, ma anche ad aumentare il recupero funzionale della zampa lesionata, e i processi di rigenerazione nel nervo sciatico dopo il CCI. Questo risultato è davvero importante poiché la BoNT/A, esercitando un effetto analgesico contemporaneamente all'accelerazione dei processi di rigenerazione nervose, apre prospettive promettenti nello sviluppo di un nuovo approccio farmaco terapeutico contro il dolore neuropatico.

### 5.3 – Esperimento 3: discussione e conclusioni

---

Il risultato principale di questo esperimento è che un esercizio precoce e di breve durata al treadmill è efficace nel velocizzare il recupero sensorimotorio funzionale dopo lesione del nervo sciatico. Il recupero è stato funzionalmente raggiunto controllando i sintomi del dolore neuropatico e aumentando la rigenerazione dei nervi periferici. In dettaglio, l'esercizio fisico di breve durata al treadmill negli animali con CCI ha indotto: i) un effetto antiallodinico sulla zampa lesionata; ii) una normalizzazione del bilanciamento del peso corporeo, sincronizzata al recupero dell'allodinia (Nazakato-Imasato e Kurebayashi, 2009); e, anche se non sincronizzato con il recupero dell'allodinia e della distribuzione del peso, iii) un miglioramento dei parametri delle impronte e dei valori dello sciatic static index. Questi effetti, già evidenti dopo una settimana di locomozione al treadmill, venivano mantenuti anche dopo l'interruzione dell'esercizio al treadmill. Invece, partendo dalla seconda settimana di allenamento, l'esercizio al treadmill protratto oltre la prima settimana dopo il CCI ha indotto un peggioramento del recupero funzionale sensorimotorio. Inoltre, nei topi con CCI soggetti all'esercizio di breve durata, è stato osservato un aumento dell'espressione di markers della rigenerazione, come Cdc2 e GAP-43, che era temporalmente correlato all'effetto antiallodinico. In alternativa, nei topi con CCI soggetti a un esercizio prolungato al treadmill è stata osservata una minore espressione dei markers di rigenerazione nei nervi sciatici. Presi insieme, questi risultati suggeriscono l'esistenza di una specifica finestra temporale, all'interno della quale l'esercizio fisico al

treadmill è efficace sia per il sollievo dai sintomi del dolore neuropatico, sia nella stimolazione dei processi di rigenerazione nervosa. Un allenamento al treadmill esteso oltre questa finestra temporale comporta una perdita generale del precedente recupero sensorimotorio funzionale.

Poiché la durata dell'esercizio al treadmill sembra essere fondamentale nella modulazione dell'allodinia meccanica che si percepisce durante la neuropatia indotta da CCI, sembra ragionevole assumere che il sollievo precoce del dolore indotto dall'esercizio possa rappresentare una componente importante per il recupero funzionale. Questa ipotesi dà origine a una domanda interessante: quali sono i processi neurali maggiormente affetti dall'esercizio al treadmill di breve durata? Non è ancora presente una chiara risposta a questa domanda, tuttavia può essere assunto che l'esercizio di breve durata, forzando il corretto posizionamento della zampa lesionata, risulterebbe in una normalizzazione dei movimenti che, a turno, potrebbe stimolare i processi rigenerativi del nervo.

Il recupero dell'allodinia indotta dalla neuropatia è probabilmente un esito positivo della riduzione dell'attivazione delle cellule gliali. È stato ben documentato che la microglia e gli astrociti spinali sono coinvolti, rispettivamente, nell'onset e nel mantenimento dei sintomi del dolore neuropatico (Colburn et al., 1997, 1999; Kim et al., 2002; Hu et al., 2007; Jergova e Chikova, 2007; Zhang e De Koninck, 2006; Zhuang et al., 2005). Nello studio presente, l'analisi dell'IF delle sezioni lombari del midollo spinale hanno chiaramente mostrato una differente estensione dell'attivazione delle cellule gliali, in base ai differenti protocolli di allenamento al treadmill utilizzati. Infatti, da un confronto tra le sezioni IF dei topi *noT* e dei topi *T3-7* al giorno 7 post-CCI, è stata rilevata una riduzione di circa 5 volte dell'attivazione della

microglia spinale nei topi *T3-7*. Questa riduzione era evidente sia nel corno dorsale che nel corno ventrale. Al giorno 17 post-CCI, l'espressione della microglia spinale attivata nei topi *T3-7* era ulteriormente ridotta. Poiché a seguito di varie lesioni nervose periferiche l'attivazione massima della microglia spinale si ha generalmente durante la prima settimana dopo la lesione (Svensson et al., 2007; Zhang e De Koninck, 2006), la forte riduzione dell'attivazione della microglia nei topi *T3-7* osservata al giorno 17 può essere un'ovvia conseguenza della precedente riduzione osservata al giorno 7 post-CCI. In modo simile ai topi *T3-7*, una riduzione della microglia spinale attivata viene osservata anche nei topi *T3-56*, sia al giorno 7 che al giorno 17. Presi insieme, questi risultati indicano che l'allenamento al treadmill, indipendentemente dalla durata, è stato sufficiente a ridurre l'espressione della microglia spinale attivata in seguito alla lesione del nervo sciatico.

Come atteso dalla differente tendenza temporale dell'espressione di microglia e astrociti spinali dopo lesione nervosa (Zhuang et al., 2005), la ridotta espressione della microglia attivata osservata nei topi *T3-7* era seguita da una riduzione di almeno due volte dell'espressione degli astrociti, sia al giorno 7 che al giorno 17 post-CCI. Ciò indica che l'esercizio di breve durata al treadmill ha indotto un'espressione degli astrociti. Sorprendentemente, nei topi *T3-56* la riduzione della microglia spinale attivata al giorno 17 post-CCI non era seguita in parallelo dalla riduzione degli astrociti spinali attivati allo stesso punto temporale. Questo risultato suggerisce l'esistenza di una popolazione di astrociti spinali che possono essere attivati da un esercizio prolungato, indipendentemente dall'attivazione della microglia spinale. Questi astrociti "attivati dall'esercizio" possono essere responsabili della reversione del miglioramento funzionale



iniziale del dolore neuropatico indotto dalla riduzione dell'attivazione della microglia spinale.

Gli effetti dell'esercizio al treadmill sulla rigenerazione nervosa possono essere attribuiti alla sua modulazione del rilascio centrale e/o periferico di neurotrofine. E' noto che le neurotrofine, come il fattore neurotrofico di crescita nervosa (BDNF), vengono up-regolate in diversi modelli di dolore infiammatorio e neuropatico, incluso il CCI del nervo sciatico (Ha et al., 2001; Pezet et al., 2002; Obata e Noguchi, 2006; Zhang et al., 2000). Inoltre, è stato riconosciuto che l'esercizio fisico può funzionare come importante modulatore del rilascio di neurotrofine nei neuroni in rigenerazione (Al-Majed et al., 2000; Molteni et al., 2004; Ying et al., 2005). E' interessante quindi evidenziare che la produzione di BDNF, NT-3 e NT-4 aumenta nei muscoli scheletrici e nella colonna spinale dopo esercizio al treadmill (Gomez-Pinilla et al., 2002), in genere al livello del corno ventrale di segmenti lombari (Skup et al., 2002; Macias et al., 2007), e migliora l'allodinia in ratti con lesione spinale (Hutchinson et al., 2004). Rimane elusivo il meccanismo per cui il protocollo qui utilizzato di allenamento al treadmill possa modulare il livello del rilascio di neurotrofine dopo lesione nervosa periferica, e ciò potrà essere un'importante ipotesi per la ricerca futura.

Qualunque sia il meccanismo neurale coinvolto, questi risultati indicano chiaramente che livelli moderati di esercizio locomotorio non solo influenzano l'attivazione delle cellule gliali spinali, ma sono anche importanti contributori per la sensazione del dolore durante una neuropatia indotta da lesione nervosa, e inoltre influenzano la rigenerazione nervosa periferica.

In questo studio, è stato dimostrato che l'allenamento al treadmill può quindi essere utile per il recupero da una lesione nervosa

periferica. Come dato di fatto, 1 ora di esercizio leggero giornaliero al treadmill ha promosso il recupero funzionale sensorimotorio quando è stato effettuato nella fase precoce di reinnervazione durante la prima settimana dopo la lesione del nervo sciatico, mentre ha avuto effetti deleteri quando prolungato per più di una settimana dopo il CCI. Gli effetti del treadmill sulla rigenerazione del nervo sciatico sono in linea con altre osservazioni presenti in letteratura, e provvedono dirette evidenze che l'esercizio fisico coinvolgendo l'arto lesionato, quando iniziato nell'intervallo tra la lesione e la reinnervazione, aumenta fortemente la rigenerazione assonale (van Meeteren et al., 1997; Molteni et al., 2004; Sabatier et al., 2008).

In conclusione, poiché differenti tipi di sostanze (antidepressivi, antiepilettici, antinfiammatori non-steroidi e oppioidi) utilizzate per il trattamento del dolore neuropatico, sono spesso inadeguate, le nuove terapie mirate, che combinano i trattamenti farmacologici con un appropriato esercizio fisico, dovrebbero essere considerate come un potente trattamento riabilitativo che aumenta gli effetti dei farmaci analgesici e velocizza il recupero funzionale sensorimotorio dopo una lesione nervosa periferica.

## **CAPITOLO 6**

---

### **BIBLIOGRAFIA**



Abad, F., Feria, M., Boada, J., 1989. Chronic amitriptyline decreases autotomy following dorsal rhizotomy in rats. *Neurosci. Lett.* 99, 187–190.

Aguilar-Rebolledo F, Hernandez-Sanchez J, Rayo-Mares D et al. - Toxina botulínica como tratamiento de la espasticidad y distonia en la parálisis cerebral infantil. *Gac Méd Mex* 2001;137:403-411.

Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P (1995). Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell* 83:269-78.

Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T (2000), Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *Eur J Neurosci* 12:4381-4390.

Albe-Fessard, D., Lombard, M.C., 1983. Use of an animal model to evaluate the origin of and protection against deafferentation pain. In: Bonica, J.J., Lindblom, U., Iggo, A. Eds., 1983. *Advances in Pain Research and Therapy*, vol. 5. Raven Press, New York, pp. 691–700.

Aldskogius H, Kozlova RN (1998), Central neuron-glia and glial-glia interaction following axon injury. *Prog Neurobiol* 55:1-26.

Allen G, Galer BS, Schwartz L - Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain* 1999;80:539-544

Ankier SI (1974) New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur J Pharmacol* 27:1–4.

Antonucci F, Rossi C, Gianfranceschi L, Rossetto O, Caleo M. 2008. Long-distance retrograde effects of botulinum neurotoxin A. *J Neurosci* 28(14):3689-96.

Aoki, K.R., 2001. A comparison of the safety margins of botulinum neurotoxin serotypes A, B, and F in mice. *Toxicon* 39, 1815–1820.

Aoki, K.R., 2003. Evidence for antinociceptive activity of botulinum toxin type A in pain management. *Headache* 43 (Suppl. 1), S9–S15.

Aoki KR - Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Neurotoxicology* 2005; 26:785-793.

Apfel SC. 2009. Botulinum toxin for neuropathic pain? *Neurology* 72(17):1456-7.

Argoff, C.E., 2002. A focused review on the use of botulinum toxins for neuropathic pain. *Clin. J. Pain* 18, S177–S181.

Astensio-Pinilla E., Udina E., Jaramillo J., Navarro X., 2009. Electrical stimulation combined with exercise increase axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 219, 258-265.

- Bach-Rojecky L, Relja M, Lackovic Z (2005). Botulinum toxin type A in experimental neuropathic pain. *J Neural Transm* 112:215-219.
- Baptista AF, de Souza Gomes JR, Oliveira JT, Santos SMG, Vannier-Santos MA, Martinez AMB (2007). A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse – Adaptation of the sciatic static index. *J Neurosci Meth* 161:259-264.
- Baltazar G, Tomé A, Carvalho AP, Duarte EP. 2000. Differential contribution of syntaxin 1 and SNAP-25 to secretion in noradrenergic and adrenergic chromaffin cells. *Eur J Cell Biol* 79(12):883-91.
- Baron R (2006). Mechanisms of disease: neuropathic pain-a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2:95-106.
- Bennett, G.J., 1994a. Animal models of neuropathic pain. Proceedings of the 7th World Congress on Pain. In: Gebhart, G.F., Hammond, D.L., Jensen, D.S. ĀEds..., 1994a. Progress in Pain Research and Management, vol. 2. IASP Press, Seattle, pp. 495–510.
- Bennett, G.J., 1994b. Neuropathic pain. In: Wall, P.D., Melzack, R. ĀEds..., Textbook of Pain. 3rd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 201–224.
- Bennett, G.J., Xie, Y.-K., 1988. A peripheral mononeuropathic in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87–107.
- Behrman AL, Harkema SJ (2007), Physical rehabilitation as an agent for recovery after spinal cord injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 18:183-202.
- Berman, D., Rodin, B.E., 1982. The influence of housing condition on autotomy following dorsal rhizotomy in rats. *Pain* 13, 307–311.
- Blackburn-Munro G, 2004. Pain-like behaviours in animals – how humans are they? *Trends Pharmacol Sci* 25, 299-305.
- Bossut, D.F., Shea, V.K., Perl, E.R., 1996. Sympathectomy induces adrenergic excitability of cutaneous C-fiber nociceptors. *J Neurophysiol.* 75, 514–517.
- Bradbury EJ, McMahon SB, Ramer MS (2000) Keeping in touch: sensory neurone regeneration in the CNS. *Trends Pharmacol Sci* 21:389-94.
- Brinkhus, H.B., Zimmermann, M., 1983. Characteristics of spinal dorsal horn neurons after partial chronic deafferentation by dorsal root transection. *Pain* 15, 221–236.
- Burton, A.W., Lee, D.H., Saab, C., Chung, J.M., 1999. Preemptive intrathecal ketamine injection produces a long-lasting decrease in neuropathic pain behaviors in a rat model. *Reg. Anesth. Pain Med.* 24, 208–213.
- Byun YH, Lee MH, Kim SS, Kim H, Chang HK, Lee TH, Jang MH, Shin MC, Shin MS, Kim CJ (2005), Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-

derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. *J Sports Med Phys Fitness* 45:222-228.

Cadden SW, Lisney SJ, and Matthews B (1983) Thresholds to electrical stimulation of nerves in cat canine tooth-pulp with A<sub>α</sub>-, A delta- and C-fibre conduction velocities. *Brain Res* 261:31-41.

Campbell JN, LaMotte RH, 1983. Latency to detection of first pain. *Brain Research* 266:203-8.

Campbell JN, Meyer RA, 2006. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 52, 77-92.

Cardoso F - Toxina botulínica tipo B no manejo de distonia nãoresponsiva à toxina botulínica tipo A. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61: 607-610.

Carlton, S.M., Lekan, H.A., Kim, S.H., Chung, J.M., 1994. Behavioral manifestations of an experimental model for peripheral neuropathy produced by spinal nerve ligation in the primate. *Pain* 56, 155-166.

Casale R, La Manna A, Salvini S, Maini M, Ceccherelli F, Frazzitta C, 2003. La riabilitazione delle neuropatie periferiche. Indicazioni per un percorso diagnostico-riabilitativo. *G Ital Med Lav Erg* 25:4.456-464.

Caterina MJ, Gold MS, Meyer RA, 2005. Molecular biology of nociceptors. In: Hunt S. e Koltzenburg M. (eds), *The Neurobiology of pain*. Oxford university press 2005, pagg. 1-33.

Chong MS, Reynolds ML, Irwin N, Coggeshall RE, Emson PC, Benowitz LI, Woolf CJ (1994) GAP-43 expression in primary sensory neurons following central axotomy. *J Neurosci.* 14:4375-84.

Christensen, D., Gautron, M., Guilbaud, G., Kayser, V., 2001. Effect of gabapentin and lamotrigine on mechanical allodynia-like behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain* 93, 147-153.

Chul Han, H., Hyun Lee, D., Mo Chung, J., 2000. Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain* 84, 253-261

Cobianchi S, Luvisetto S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F (2009a), Treadmill exercise counteracts neuropathic pain and stimulates functional recovery after nerve injury. Abstract of the 13th Biennial Meeting of the European Behavioural Pharmacology Society (Rome, Italy), *Behav Pharmacol* 20 (Suppl 1):111.

Cobianchi S, Luvisetto S, Marinelli S, Florenzano F, Pavone F (2009b), Comparison between short- and long-lasting treadmill exercise: effects on mechanical allodynia and functional recovery after sciatic nerve injury. Abstract of Pain in Europe VI (Lisbon, Portugal), *Eur J Pain* 13 (Suppl 1):S262

- Coderre, T.J., Grimes, R.W., Melzack, R., 1986. Deafferentation and chronic pain in animals: an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain* 26, 61–84.
- Coderre TJ and Wall PD (1987) Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. *Pain* 28:379–393.
- Coderre, T.J., Vaccarino, A.L., Melzack, R., 1990. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res.* 535, 155–158.
- Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF (1997) Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviours following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunology* 79:163-175.
- Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA (1999), The effect of site and type of nerve injury on spinal glia activation and neuropathic pain behaviour. *Exp Neurology* 157:289-304.
- Colhado OCG, Boeing M, Ortega LB, 2009. Botulinum toxin in pain treatment. *Rev Bras Anestesiol* 59:3:366-381.
- Comella CL - Interim results of an observation study of neutralizing antibody formation with the current preparation of botulinum toxin type A treatment for cervical dystonia. *Neurology* 2004;62:6141.
- Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sîk A, De Koninck P, De Koninck Y. 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 21;424(6951):938-42.
- Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438(7070):1017-21.
- Coyle DE (1998), Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior. *Glia* 23:75-83.
- Cragg, B.G., 1970. What is the signal for chromatolysis? *Brain Res.* 23, 1–21.
- Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR (2004). Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 107:125-133.
- Culp, W.J., Ochoa, J. 1982. *ŽEds...*, *Abnormal Nerves and Muscles as Impulse Generators*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Cummins, T.R., Dib-Hajj, S.D., Black, J.A., Waxman, S.G., 2000. Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. In: Sandku'bler, J., Bromm, B., Gebhart, G.F. *ŽEds...*, 2000. *Progress in Brain Research*, vol. 129. Elsevier, Amsterdam, pp. 3–19.
- Davletov B, Bajohrs M, Binz T (2005). Beyond BOTOX: advantages and limitations of individual botulinum neurotoxins. *Trends Neurosci* 28:446-452.



De la Hoz CL, Oliveira AL, Queiroz Lde S, Langone F (2003) Wallerian degeneration in C57BL/6J and A/J mice: differences in time course of neurofilament and myelin breakdown, macrophage recruitment and iNOS expression. *J Anat* 203:567-78.

Devor, M., 1994. The pathophysiology of damaged peripheral nerves. In: Wall, P.D., Melzack, R. ŽEds., *Textbook of Pain*. 3rd edn. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 79–101.

Dickenson, A.H., Sullivan, A.F., 1987. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurons. *Neurosci. Lett.* 83, 207–211.

Dickhaus, H., Zimmermann, M., Zotterman, Y., 1976. The development in regenerating cutaneous nerves of C-fibre receptors responding to noxious heating of the skin. In: Zotterman, Y. ŽEd., *Sensory Functions of the Skin in Primates*. Pergamon, Oxford, pp. 415–425.

Dietz V, Harkema SJ (2004), Locomotor activity in spinal cord-injured persons. *J Appl Physiol* 96:1954-1960.

Difazio, M., Jabbari, B., 2002. A focused review of the use of botulinum toxins for low back pain. *Clin. J. Pain* 18, S155–S162.

Dijkstra JR, Meek MF, Robinson PH, Gramsbergen A (2000), Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Meth* 96:89-96.

Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER (2006) *Science* 312:592–596.

Dressler D, Saberi FA, Barbosa ER - Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63:180-185.

Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 4, 161–174.

Durham, P.L., Cady, R., Cady, R., 2004. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implication for migraine therapy. *Headache* 44, 35–42.

Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM (2003). Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol.* 60:1524-1534.

- Eaton, M.J., Martinez, M., Karmally, S., Lopez, T., Sagen, J., 2000. Initial characterization of the transplant of immortalized chromaffin cells for the attenuation of chronic neuropathic pain. *Cell Transplant.* 9, 637–656.
- Edgerton VR, Tillakaratne NJ, Bigbee AJ, de Leon RD, Roy RR (2004), Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. *Annu Rev Neurosci* 27:145-167.
- Empl, M., Renaud, S., Erne, B., Fuhr, P., Straube, A., Schaeren-Wiemers, N., Steck, A.J., 2001. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 56, 1371–1377
- England, J.D., Happel, L.T., Kline, D.G., Gamboni, F., Thouron, C.L., Liu, Z.P., Levinson, S.R., 1996. Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurology* 47, 272–276.
- Falinower S, Willer JC, Junien JL, and Le Bars D (1994). A C-fibre reflex modulated by heterotopic noxious somatic stimuli in the rat. *J Neurophysiol* 72:194–213.
- Favre-Guilhard C, Auguet M, Chabrier PE, 2009. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol* 617(1-3):48-53.
- Feria, M., Abad, F., Sanchez, A., Abreu, P., 1993. Magnesium sulphate injected subcutaneously suppresses autotomy in peripherally deafferented rats. *Pain* 53, 287–293.
- Ferchmin, P.A., DiScenna, P., Borroni, A.M., Morales Velez, M., Rivera, E.M., Teyler, T.J., 1993.  $\alpha$ -Difluoromethylornithine decrease inhibitory transmission in hippocampal slices independently of its inhibitory effect of ornithine decarboxylase. *Brain Res.* 601, 95–102.
- Fouad K, Pearson K (2004), Restoring walking after spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 73:107-126.
- Fox, A., Kesingland, A., Gentry, C., McNair, K., Patel, S., Urban, L., James, I., 2001. The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain* 92, 91–100.
- Franklin, K.B., Abbott, F.V., 1993. Pentobarbital, diazepam, and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABAA receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46, 661–666.
- Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego, CA.
- Freund, B., Schwartz, M., 2003. Temporal relationship of muscle weakness and pain reduction in subjects treated with botulinum toxin A. *J. Pain* 4, 159–165.
- Fukuoka T, Noguchi K. (2002) Contribution of the spared primary afferent neurons to the pathomechanisms of neuropathic pain. *Mol Neurobiol.* 26:57-67.

- Garrison CJ, Dougherty PM, Kajander KC, Carlton SM (1991), Staining of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in lumbar spinal cord increases following a sciatic nerve constriction injury. *Brain Res* 565:1-7.
- Gazerani P, Staahl C, Drewes A M, Arendt-Nielsen L (2006) The effects of Botulinum Toxin type A on capsaicin-evoked pain, flare, and secondary hyperalgesia in an experimental human model of trigeminal sensitization *Pain* 122:315–325
- Ginzburg, R., Seltzer, Z., 1990. Subarachnoid spinal cord transplantation of adrenal medulla suppresses chronic neuropathic pain behavior in rats. *Brain Res.* 523, 147–150.
- Gobel, H., Heinze, A., Heinze-Kuhn, K., Austermann, K., 2001. Botulinum toxin A in the treatment of headache syndromes and pericranial pain syndromes. *Pain* 91, 195–199.
- Gold MS, 1999. Tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> currents and inflammatory hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 7645-9.
- Gold MS, 2001. Membrane properties: ion channels. *Methods in Pain Research* (ed. L Cruger). New York, CRC press:169-186.
- Gomez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR (2002), Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol* 88:2187-2195.
- Gordon A, Connelly A, Neville B, Vargha-Khadem F, Jessop N, Murphy T, Ganesan V. 2007. Modified constraint-induced movement therapy after childhood stroke. *Dev Med Child Neurol* 49(1):23-7.
- Graboski CL, Gray DS, Burnham RS - Botulinum toxin A versus bupivacaine trigger point injections for the treatment of myofascial pain syndrome: A randomised double blind crossover study. *Pain* 2005;118:170-175.
- Green, G.M., Dickenson, A., 1997. GABA-receptor control of the amplitude and duration of neuronal responses to formalin in the rat spinal cord. *Eur. J. Pain* 1, 95–104.
- Gupta R, Rummel LS, Palispis W, Truong L, Chao T, Rowshan K, Mozaffar T, Steward O (2006). Local down-regulation of myelin-associated glycoprotein permits axonal sprouting with chronic nerve compression injury. *Exp Neurol* 200:418-29.
- Guyer, B.M., 1999. Mechanism of botulinum toxin in the relief of chronic pain. *Curr. Rev. Pain* 3, 427–431.
- Ha SO, Kim JK, Hong HS, Kim DS, Cho HJ (2001), Expression of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglia, spinal cord and gracile nuclei in experimental models of neuropathic pain. *Neuroscience* 107:301-309.
- Han IS, Seo TB, Kim KH, Yoon JH, Yoon SJ, Namgung U (2007), Cdc2-mediated Schwann cell migration during peripheral nerve regeneration. *J Cell Sci* 120:246-255.

- Hardy JD, Stoll AM, Cunningham D, Benson WM, and Greene L (1957) Responses of the rat to thermal radiation. *Am J Physiol* 189:1–5.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, and Joris J (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88.
- Harkema SJ (2008), Plasticity of interneuronal networks of the functionally isolated human spinal cord. *Brain Res Rev* 57 :255-264.
- Hartung, M., Leah, J., Zimmermann, M., 1989. The excitation of cutaneous nerve endings in a neuroma by capsaicin. *Brain Res.* 499, 363–366.
- Hashizume H, De Leo JA, Colburn RW, Weinstein JN (2000), Spinal glial activation and cytokine expression after lumbar root injury in the rat. *Spine* 25:1206-1217.
- Helyes Z, Sándor K, Borbély E, Tékus V, Pintér E, Elekes K, Tóth DM, Szolcsányi J, McDougall JJ (2009), Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in protease-activated receptor-2-induced joint inflammation and nociception. *Eur J Pain*, doi:10.1016/j.ejpain.2009.07.005.
- Heng C, de Leon RD (2009) Treadmill training enhances the recovery of normal stepping patterns in spinal cord contused rats. *Exp Neurol* 216:139-147.
- Henry, J.L., Yashpal, K., Pitcher, G.M., Coderre, T.J., 1999. Physiological evidence that the ‘interphase’ in the formalin test is due to active inhibition. *Pain* 82, 57–63.
- Herdegen, T., Leah, J.D., 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREBrATF proteins. *Brain Res. Rev.* 28, 370–490.
- Howe, J.F., Loeser, J.D., Calvin, W.H., 1977. Mechanosensitivity of dorsal root ganglia and chronically injured axons: a physiological basis for the radicular pain of nerve root compression. *Pain* 3, 25–41.
- Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM (2007), Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* 21:599-616.
- Hua, Y., Scheller, R.H., 2001. Three SNARE complexes cooperate to mediate membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 8065–8070.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., Poulain, B., 2000. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 82, 427–446.
- Hutchinson KJ, Gomez-Pinilla F, Crowe MJ, Ying Z, Basso DM (2004), Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 127:1403-1414.

- Ignatowski, T.A., Covey, W.C., Knight, P.R., Severin, C.M., Nickola, T.J., Spengler, R.N., 1999. Brain-derived TNF $\alpha$  mediates neuropathic pain. *Brain Res.* 841, 70–77.
- Inbal, R., Devor, M., Tuchendler, O., Lieblch, I., 1980. Autotomy following nerve injury: genetic factors in the development of chronic pain. *Pain* 9, 327–337.
- Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ (1998), Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in mouse. *Microsurgery* 18:119-24.
- Ishikawa, H., Mitsui, Y., Yoshitomi, T., Mashimo, K., Aoki, S., Mukuno, K., Shimizu, K., 1999. Presynaptic effects of botulinum toxin type A on the neuronally evoked response in albino and pigmented rabbit iris sphincter and dilator muscle. *Jpn. J. Ophthalmol.* 44, 106–109.
- Jahn, R., Hanson, P.I., Otto, H., Ahnert-Hilger, G., 1995. Botulinum and tetanus neurotoxins: emerging tools for the study of membrane fusion. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 60, 329–335.
- Janig, W., 1988. Pathophysiology of nerve following mechanical injury. In: Dubner, R., Gebhart, G.F., Bond, M.R. *Eds.*, Proc. Vth World Congr. Pain. Elsevier, Amsterdam, pp. 89–108.
- Jankovic, J., Brin, M.F., 1997. Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications. *Muscle Nerve Suppl.* 6, S129–S145.
- Jensen TS, Gottrup H, Sindrup SH, Bach FW (2001). The clinical picture of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:1-11.
- Jergova S, Cizkova D (2007) Microglial activation in different models of peripheral nerve injury in rat. *J Mol Hist* 38:245-251.
- Johnson EA (1999). Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. *Annu Rev Microbiol* 53:551-575.
- Jost, W.H., Kohl, A., 2001. Botulinum toxin: evidence-based medicine criteria in rare indications. *J. Neurol.* 248 (Suppl. 1), 39–44.
- Jourdan D, Ardid D, Chapuy E, Le Bars D, and Eschaliere A (1998) Effect of analgesics on audible and ultrasonic pain-induced vocalization in the rat. *Life Sci* 63:1761–1768.
- Kaneko, M., Hammond, D.L., 1997. Role of spinal  $\gamma$ -aminobutyric acidA receptors in formalin-induced nociception in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282, 928–938.
- Kauppila, T., 1998. Correlation between autotomy-behavior and current theories of neuropathic pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 111–129.

- Kergozien, S., Delcros, J.-G., Desury, D., Moulinoux, J.-P., 1999. Polyamine deprivation alters formalin-induced hyperalgesia and decreases morphine efficacy. *Life Sci.* 65, 2175–2183.
- Kim, S.H., Chung, J.M., 1992. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50, 355–363.
- Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K, 2009. Botulinum toxin type A (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction. *Neuroscience* 159(4):1422-9.
- Klein AW - The therapeutic potential of botulinum toxin. *Dermatol Surg* 2004;30:452-455.
- Kress, M., Izydorczyk, I., Kuhn, A., 2001. N- and L- but not PrQ-type calcium channels contribute to neuropeptide release from rat skin in vitro. *NeuroReport* 12, 867–870.
- Lang, A.M., 2003. Botulinum toxin type A therapy in chronic pain disorders. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 84, S69–S73 (quiz S74-5).
- Lang AM - History and uses of BOTOX (botulinum toxin type A). *Lippincott's Case Manag* 2004;9:109-112.
- Lange, D.J., Brin, M.F., Warner, C.L., Fahn, S., Lovelace, R.E., 1987. Distant effects of local injection of botulinum toxin. *Muscle Nerve* 10, 552–555.
- Leah, J., Koschorke, G.-M., Welk, E., Zimmermann, M., 1988. The expression of sensory receptors on regenerating and regenerated cutaneous C fibres. In: Hamann, W., Iggo, A. Eds., *Transduction and Cellular Mechanisms in Sensory Receptors. Progress in Brain Research*, vol. 74. Elsevier, Amsterdam, pp. 341–348.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW, 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597–652.
- Leblond H, L'Esperance M, Orsal D, Rossignol S (2003), Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse. *J Neurosci* 23:11411-11419.
- Lever I, Cunningham J, Grist J, Yip PK, Malcangio M, 2003. Release of BDNF and GABA in the dorsal horn of neuropathic rats. *European Journal of Neuroscience* 18:1169-74.
- Lew, M.F., 2002. Review of the FDA-approved uses of botulinum toxins, including data suggesting efficacy in pain reduction. *Clin. J. Pain* 18, S142–S146.
- Li J, Ding YH, Rafols JA, Lai Q, McAllister JP, Ding Y, 2005. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neuroscience Letters* 386:160–164.

- Lim EC, Seet RC, 2007. Botulinum toxin. Quo vadis? *Med Hypotheses* 69(4):718-23.
- Liu HT, Tsai SK, Kao MC, Hu JS (2006). Botulinum toxin A relieved neuropathic pain in a case of post-herpetic neuralgia. *Pain Med* 7:89-91.
- Loder, E., Biondi, D., 2002. Use of botulinum toxins for chronic headaches: a focused review. *Clin. J. Pain* 18, S169–S176.
- Loeser JD, Melzack R (1999). Pain: an overview. *Lancet* 353:1607-1609.
- Lombard, M.-C., Nashold Jr., B.S., Albe-Fessard, D., Salman, N., Sakr, C., 1979. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: a possible animal model of chronic pain. *Pain* 6, 163–174.
- Lucioni A, Bales GT, Lotan TL, McGehee DS, Cook SP, Rapp DE (2008) Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int* 101:366-70.
- Luisetto S, Rossetto O, Montecucco C, Pavone F (2003). Toxicity of botulinum neurotoxins in central nervous system of mice. *Toxicon* 41:475-481.
- Luisetto, S., Marinelli, S., Rossetto, O., Montecucco, C., Pavone, F., 2004. Central injection of botulinum neurotoxins: behavioural effects in mice. *Behav. Pharmacol.* 15, 233–240.
- Luisetto S, Marinelli S, Lucchetti F, Marchi F, Cobianchi S, Rossetto O, Montecucco C (2006). Botulinum neurotoxins and formalin-induced pain: central vs. peripheral effects in mice. *Brain Res* 1082:124-131.
- Luisetto S, Marinelli S, Cobianchi S, Pavone F (2007), Anti-allodynic efficacy of botulinum neurotoxin A in a model of neuropathic pain. *Neuroscience* 145:1-4.
- Macias M, Dwornik A, Ziemińska E, Fehr S, Schachner M, Czarkowska-Bauch J, Skup M (2007), Locomotor exercise alters expression of pro-brain-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and its receptor TrkB in the spinal cord of adult rats. *Eur J Neurosci* 25 :2425-2444.
- Malarkey E, Pappas V, 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochemistry International* 52:142–154.
- Malcangio M, Lessmann V, 2003. A common thread for pain and memory synapses? Brain-derived neurotrophic factor and trkB receptors. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 24(3):116-121.
- Manes T, Zheng DQ, Tognin S, Woodard AS, Marchisio PC, Languino LR (2003) Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J Cell Biol* 161:817-26

- Mannion RJ, Woolf CJ, 2000. Pain mechanisms and management: a central perspective. *Clin J Pain*. Sep;16(3 Suppl):S144-56. Review.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6:521-32.
- Marqueste T, Alliez JR, Alluin O, Jammes Y, Decherchi P (2004). Neuromuscular rehabilitation by treadmill running or electrical stimulation after peripheral nerve injury and repair. *J Appl Physiol* 96:1988-1995.
- Matthies, B.K., Franklin, K.B., 1992. Formalin pain is expressed in decerebrate rats but not attenuated by morphine. *Pain* 51, 199–206.
- Mehrholz J, Kungler J, Pohl M (2008), Locomotor training for walking after spinal cord injury. *Spine* 33:768-777.
- Mejia NI, Vuong KD, Jankovic J - Long-term botulinum toxin efficacy, safety and immunogenicity. *Mov Disord* 2005;20:592-597.
- Mendell LM, 1966. Physiological properties of unmyelinated fiber projection to the spinal cord. *Exper Neurol* 16,316-32.
- Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. 2007. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their antinociceptive potential. *J Cell Sci* 120(Pt 16):2864-74.
- Meyer RA, Campbell JN, 1981. Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213,1527-29.
- Milligan ED, Zapata V, Chacur M, Schoeniger D, Biedenkapp J, O'Connor KA, Verge GM, Chapman G, Green P, Foster AC, Naevé GS, Maier SF, Watkins LR. 2004. Evidence that exogenous and endogenous fractalkine can induce spinal nociceptive facilitation in rats. *Eur J Neurosci* 20(9):2294-302.
- Milligan ED, Watkins LR (2009), Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 10:23-36.
- Mogil JS, 2009. Animal models of pain: progress and challenges. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 283-294.
- Molander, C., Hongpaisan, J., Grant, G., 1992. Changing pattern of c-Fos expression in spinal cord neurons after electrical stimulation of the chronically injured sciatic nerve in the rat. *Neuroscience* 50, 223–236.
- Molteni R, Zheng J-Q, Ying Z, Gomez-Pinilla F, Twiss JL (2004), Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. *PNAS* 101:8473-8478.
- Montecucco C, Molgo J (2005). Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol* 5:274-279.



- Moseley AM, Stark A, Cameron ID, Pollock A. 2005. Treadmill training and body weight support for walking after stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 4:CD002840. Review.
- Munchau, A., Bhatia, K.P., 2000. Uses of botulinum toxin injection in medicine today. *BMJ* 320, 161–165.
- Murakami T, Okada M, Kawata Y, Zhu G, Kamata A, Kaneko S. 2001. Determination of effects of antiepileptic drugs on SNAREs-mediated hippocampal monoamine release using in vivo microdialysis. *Br J Pharmacol* 134(3):507-20.
- Nahin RL, Ren K, De Leon M, Ruda M (1994), Primary sensory neurons exhibit altered gene expression in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 58:95-108.
- Nakazato-Imasato E, Kurebayashi Y (2009), Pharmacological characteristics of the hind paw weight bearing difference induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Life Sci* 84:622-626.
- Namgung U, Choi BH, Park S, Lee JU, Seo HS, Suh BC, Kim KT (2004) . Activation of cyclin-dependent kinase 5 is involved in axonal regeneration. *Mol Cell Neurosci* 25:422-32
- Obata K, Noguchi K (2006), BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res* 55:1-10.
- Okuda K, Nakahama H, Miyakawa H, and Shima K (1984) Arthritis induced in cat by sodium urate: a possible animal model for tonic pain. *Pain* 18:287–297.
- Osikowicz M, Mika J, Makuch W, Przewlocka B. (2008) Glutamate receptor ligands attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate morphine effects in a mouse model of neuropathic pain. *Pain* 139:117-126.
- Ossipov MH, Porreca F (2005). Challenges in the development of novel treatment strategies for neuropathic pain. *NeuroRx* 2:650-661.
- Otsuki T, Nakahama I, Niizuma H, and Suzuki J (1986) Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Res* 365:235–240.
- Paalzow L (1969) An electrical method for estimation of analgesic activity in mice. II. Application of the method in investigations of some analgesic drugs. *Acta Pharm Suec* 6:207–226.
- Park HJ, Lee Y, Lee J, Park C, Moon DE (2006). The effects of botulinum toxin A on mechanical and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Can J Anaesth* 53:470–477.
- Pearce, L.B., First, E.R., MacCallum, R.D., Gupta, A., 1997. Pharmacologic characterization of botulinum toxin for basic science and medicine. *Toxicon* 35, 1373–1412.

- Pezet S, Cunningham J, Patel J, Grist J, Gavazzi I, Lever IJ, Malcangio M (2002a). BDNF Modulates Sensory Neuron Synaptic Activity by a Facilitation of GABA Transmission in the Dorsal Horn. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21, 51–62.
- Pezet S, Malcangio M, McMahon SB (2002b). BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways? *Brain Research Reviews* 40:240–249.
- Pines J (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1:E73-79
- Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. 1999. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J Neurosci Methods* 87(2):185-93.
- Porro, C.A., Cavazzuti, M., 1993. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog. Neurobiol.* 41, 565–607.
- Porta M - A comparative trial of botulinum toxin type A and methylprednisolone for the treatment of myofascial pain syndrome and pain for chronic muscle spasm. *Pain* 2000; 85:101-105.
- Puke, M.J.C., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1993. The differential effects of morphine and the alpha2-adrenoceptor agonists clonidine and dexmedetomidine on the prevention and treatment of experimental neuropathic pain. *Anesth. Analg.* 77, 104–109.
- Purkiss, J.R., Welch, M.J., Doward, S., Foster, K.A., 2000. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1403–1406.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D et al. - *Neuroscience*. 3 Ed. Massachusetts, Sinauer 2004;110-116.
- Raja SM, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, 1999. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: *Textbook of pain* (eds: PD Wall and P Melzack), pp. 11-57. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Randall LO, Selitto JJ (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 111:409–419.
- Ranoux D, Attal N, Morain F, Bouhassira D, 2008. Botulinum toxin type A induces direct analgesic effects in chronic neuropathic pain. *Ann Neurol* 64(3):274-83.
- Rice ASC, Hill RG (2006). New treatments for neuropathic pain. *Annu Rev Medicine* 57:535-551.
- Ringkamp M, Meyer RA (2005) Injured versus uninjured afferents: who is to blame for neuropathic pain? *Anesthesiology* 103:221–223.

- Rivera, L., Gallar, J., Pozo, M.A., Belmonte, C., 2000. Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. *J. Physiol.* 527, 305–313.
- Rossetto, O., Schiavo, G., Polverino de Laureto, P., Fabbiani, S., Montecucco, C., 1992. Surface topography of histidine residues of tetanus toxin probed by immobilized-metal-ion affinity chromatography. *Biochem. J.* 285 (Pt. 1), 9–12.
- Rossignol S, Brustein E, Bouyer L, Barthelemy D, Langlet C, Leblond H (2004), Adaptive changes of locomotion after central and peripheral lesions. *Can J Physiol Pharmacol* 82:617-627.
- Sabatier MJ, Redmon N, Schwartz G, English AW (2008), Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. *Exp Neurol* 211:489-493.
- Sato, J., Morimae, H., Takanari, K., Seino, Y., Okada, T., Suzuki, M., Mizumura, K., 2000. Effects of lowering ambient temperature on pain-related behaviors in a rat model of neuropathic pain. *Exp. Brain Res.* 133, 442–449.
- Schantz, E.J., Johnson, E.A., 1992. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol. Rev.* 56, 80–99.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Montecucco, C., 1994. Clostridial neurotoxins as tools to investigate the molecular events of neurotransmitter release. *Semin. Cell Biol.* 5, 221–229.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C (2000) Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological Reviews* 80:717-767
- Schim JD, Stang P, 2004. Overview of pain management. *Oain Pract* 4, Suppl 1:S4-18.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H, 1995. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in the human skin. *Journal of Neuroscience* 15, 333-341.
- Scholz J, Woolf CJ (2007), The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- Seltzer, Z., Rapoport, Z.H., Zagzag, D., 1985. A chronically implanted delivery system of drugs to a nerve-end neuroma: effects on a behavioural chronic pain model. *J. Neurosci. Methods* 13, 223–229.
- Seltzer, Z., Tal, M., Sharav, Y., 1989. Autotomy behavior in rats following peripheral deafferentation is suppressed by daily injections of amitriptyline, diazepam and saline. *Pain* 37, 245–250.
- Seltzer, Z., Dubner, R., Shir, Y., 1990. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43, 205–218.

- Seltzer, Z., Beilin, B.Z., Ginzburg, R., Paran, Y., Shimko, T., 1991. The role of injury discharge in the induction of neuropathic pain behavior in rats. *Pain* 46, 327–336.
- Seltzer, Z., Wu, T., Max, M.B., Diehl, S.R., 2001. Mapping a gene for neuropathic pain-related behavior following peripheral neurectomy in the mouse. *Pain* 93, 101–106
- Seo TB, Han IS, Yoon JH, Hong KE, Yoon SJ, Namgung U (2006), Involvement of Cdc2 in axonal regeneration enhanced by exercise training in rats. *Med Sci Sports Exerc* 38:1267-1276.
- Seo TB, Oh MJ, You BG, Kwon KB, Chang IA, Yoon JH, Lee CY, Namgung U (2009), ERK1/2-mediated Schwann cell proliferation in the regenerating sciatic nerves by treadmill training. *J Neurotrauma*. doi:10.1089/neu.2008-0711.
- Setler PE - Therapeutic use of botulinum toxins: background and history. *Clin J Pain* 2002;18(6 suppl):s119-124.
- Sheeran G - Botulinum toxin for the treatment of musculoskeletal pain and spasm. *Curr Pain Headache Rep* 2002;6:460-469.
- Sherrington CS (1906). *The Integrative Action of the Nervous System*, C. Scribner's Sons, New York.
- Shir, Y., Sheth, R., Campbell, J.N., Raja, S.N., Seltzer, Z., 2001a. Soy-containing diet suppresses chronic neuropathic sensory disorders in rats. *Anesth. Analg.* 92, 1029–1034.
- Shir, Y., Zeltser, R., Vatine, J.J., Carmi, G., Belfer, I., Zangen, A., Overstreet, D., Raber, P., Seltzer, Z., 2001b. Correlation of intact sensibility and neuropathic pain-related behaviors in eight inbred and outbred rat strains and selection lines. *Pain* 90, 75–82.
- Silberstein, S.D., Aoki, K.R., 2003. Botulinum toxin type A: myths, facts, and current research. *Headache* 43 (Suppl. 1), S1.
- Simpson LL (2004). Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:167-193.
- Sindrup SH, Jensen TS (1999). Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 83:389-400.
- Skup M, Dwornik A, Macias M, Sulejczak D, Wiater M, Czarkowska-Bauch J (2002), Long-Term locomotor training up-regulates TrkBFL receptor-like proteins, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord. *Exp Neurology* 176:289-307.
- Sommer, C., Schmidt, C., George, A., 1998. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp. Neurol.* 151, 138–142.
- Sorkin, L.S., Doom, C.M., 2000. Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 5, 96–100.

- Stewart WF, Ricci JA, Chee E, Morganstein D & Lipton R, 2003. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce. *J Am Med Assoc* 290, 2443-2454.
- Storch EK, Kruszynski DM (2008), From rehabilitation to optimal function: role of clinical exercise therapy. *Curr Opin Crit Care* 14:451-455.
- Sudhof, T.C., 2000. The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28:317–320.
- Sufka KJ, Watson GS, Nothdurft RE, Mogil JS (1998). Scoring the mouse formalin test: validation study. *Eur J Pain* 2:351–358.
- Suzuki, R., Matthews, E.A., Dickenson, A.H., 2001. Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. *Pain* 91, 101–109.
- Sycha T, Samal D, Chizh B et al. – A lack of antinociceptive or antiinflammatory effect of botulinum toxin A in an inflammatory human pain model. *Anesth Analg* 2006;102:509-516.
- Svensson CI, Yaksh TL, Sorkin LS (2007), The role of p38 in microglial regulation of spinal pain processing. In: *Immune and Glia Regulation of Pain* (De Leo JA, Sorkin LS, Watkins LR, Eds), IASP Press, Seattle, pp 297-317.
- Thomas, D.A., Ren, K., Besse, D., Ruda, M.A., Dubner, R., 1996. Application of nitric oxide synthase inhibitor, Nv-nitro-L-arginine methyl ester, on injured nerve attenuates neuropathy-induced thermal hyperalgesia in rats. *Neurosci. Lett.* 210, 1–3.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, and Hole K (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51:5–17.
- Tonussi CR, Ferreira SH (1992). Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. *Pain* 48:421–427.
- Trimble MH, Kukulka GH, Behrman AL (1998), The effect of treadmill gait training on low-frequency depression of the soleus H-reflex: comparison of a spinal cord injured man to normal subjects. *Neurosci Lett* 246:186-188.
- Tsuda M, Inoue K, Salter MW (2005), Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 28:101-107.
- Unno Ek, Sakato RK, Issy AM - Estudo comparativo entre toxina botulínica e bupivacaína para infiltração de pontos-gatilho em síndrome dolorosa miofascial crônica. *Rev Bras Anesthesiol* 2005; 55:250-255.
- Van Meeteren NL, Brakkee JH, Hamers FP, Helders PJ, Gispen WH (1997), Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil* 78:70-77.

- Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM (2001), Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Meth* 108:1-9.
- Vargas ME and Barres BA (2007) Why is wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci* 30:153-79.
- Vatine, J.J., Devor, M., Belfer, I., Raber, P., Zeltser, R., Dolina, S., Seltzer, Z., 2000. Preoperative open field behavior predicts levels of neuropathic pain-related behavior in mice. *Neurosci. Lett.* 279, 141–144.
- Verderio, C., Pozzi, D., Pravettoni, E., Inverardi, F., Schenk, U., Coco, S., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., Rossetto, O., Frassoni, C., Matteoli, M., 2004. SNAP-25 modulation of calcium dynamics underlies differences in GABAergic and glutamatergic responsiveness to depolarization. *Neuron* 41, 599–610.
- Vierck CJ, Hansson PT & Yeziarsky RP, 2008. Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? *Pain* 135, 7-10.
- Vogelaar CF, Vrinten DH, Hoekman MF, Brakkee JH, Burbach JP, Hamers FP (2004), Sciatic nerve regeneration in mice and rats: recovery of sensory innervation is followed by a slowly retreating neuropathic pain-like syndrome. *Brain Res* 1027:67-72.
- Voller, B., Sycha, T., Gustorff, B., Schmetterer, L., Lehr, S., Eichler, H.G., Auff, E., Schnider, P., 2003. A randomized, double-blind, placebo controlled study on analgesic effects of botulinum toxin A. *Neurology* 61, 940–944.
- Wall, P.D., Devor, M., Inbal, R., Scadding, J.W., Schonfeld, D., Seltzer, Z., Tomkiewicz, M.M., 1979. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain* 7, 103–111.
- Welch, M.J., Purkiss, J.R., Foster, K.A., 2000. Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon* 38, 245–258.
- Welk, E., Leah, J.D., Zimmermann, M., 1990. Characteristics of A- and C-fibers ending in a sensory nerve neuroma in the rat. *J. Neurophysiol.* 63, 759–766
- Wenzel RG - Pharmacology of botulinum neurotoxin serotype A. *Am J Heath-Syst Pharm* 2004;61(suppl 6):s5-10.
- Wheeler-Aceto H, Cowan A (1991). Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)* 104:35–44.
- Wiesenfeld, Z., Hallin, R.G., 1980. Stress-related pain behaviour in rats with peripheral nerve injuries. *Pain* 8, 279–284.
- Winkelstein, B.A., Rutkowski, M.D., Sweitzer, S.M., Pahl, J.L. & DeLeo, J.A. 2001. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and

selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J. Comp. Neurol.* 439, 127–139.

Wohlfarth K, Kampe K, Bigalke H - Pharmacokinetic properties of different formulations of botulinum neurotoxin type A. *Mov Disord* 2004;19:s65-67.

Woodcock J, Witter J & Dionne RA, 2007. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 703-710.

Woolf, C.J., Shortland, P., Coggeshall, R.E., 1992. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355, 75–78.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-64.

Xu, X.-J., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1991. The threshold for the depressive effect of intrathecal morphine on the spinal nociceptive flexor reflex is increased during autotomy after sciatic nerve section in rats. *Pain* 46, 223–229.

Yablon S - Toxin neutralizing antibody formation with botulinum toxin type A (BoNTA) treatment in neuromuscular disorders. *Neurology* 2005;64:1153.

Ying Z, Roy RR, Edgerton VR, Gomez-Pinilla F (2005), Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol* 193: 411-419.

Yu, W., Haoa, J.X., Xu, X.J., Saydoff, J., Sherman, S., Eriksson, A., Haegerstrand, A., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1998. Immunisolating encapsulation of intrathecally implanted bovine chromaffin cells prolongs their survival and produces anti-allodynic effect in spinally injured rats. *Eur. J. Pain* 2, 143–151.

Yuan RY, Sheu JJ, Yu JM, Chen WT, Tseng IJ, Chang HH, Hu CJ, 2009. Botulinum toxin for diabetic neuropathic pain: a randomized double-blind crossover trial. *Neurology* 72(17):1473-8.

Zhang J, De Koninck Y (2006), Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. *J Neurochem* 97:772-783.

Zhang J-Y, Luo X-G, Xian CJ, Liu Z-H, Zhou X-F (2000), Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci* 12: 4171-4180.

Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR (2005), ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. *Pain* 114:149-159.

Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.

Zimmermann, M., 1985. Functional characteristics of sensory fibres in regenerating cutaneous nerves. In: Delwaide, P.J., Gorio, A. (Eds.), *Clinical Neurophysiology in Peripheral Neuropathies*. Elsevier, Amsterdam, pp. 41–56.

Zimmermann M (1986) Behavioural investigations of pain in animals, in *Assessing Pain in Farm Animals* (Duncan IJH and Molony Y eds) pp 16–29, Office for Official Publications of the European Communities, Bruxelles.

Zimmermann, M., Koschorke, G.M., 1987. Chemosensitivity of nerve sprouts in experimental neuroma of cutaneous nerves of the cat. In: Schmidt, R.F., Schaible, H.-G., Vahle-Hinz, C. (Eds.), *Fine Afferent Nerve Fibers and Pain*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, pp. 105–113.

Zimmermann, M., Herdegen, T., 1996. Plasticity of the nervous system at the systemic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. In: Carli, G., Zimmermann, M. (Eds.), *Towards the Neurobiology of Chronic Pain*. Progress in Brain Research, vol. 110. Elsevier, Amsterdam, pp. 233–259.

Zimmermann M (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:23-37.