

Università degli Studi di Milano  
Corso di Dottorato di Ricerca in  
“Scienze Endocrinologiche e Metaboliche”  
ciclo XXVI

Facoltà di Scienze del Farmaco  
Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari



**DIABETE E DOLORE: EFFETTO  
TERAPEUTICO DEI METABOLITI DEL  
TESTOSTERONE**

Settori scientifico-disciplinari: BIO/09-BIO/13-MED/13

Tutor: Chiar.mo Prof. Roberto C. MELCANGI

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Angelo POLETTI

Tesi di dottorato presentata da:

Dott. Donato CALABRESE

Matricola R09092

Anno Accademico 2012 - 2013



# INDICE

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABBREVIAZIONI.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1. DIABETE MELLITO.....</b>	<b>12</b>
1.1.1. COMPLICANZE DEL DIABETE.....	14
<b>1.2. NEUROPATIA DIABETICA .....</b>	<b>17</b>
1.2.1. MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELL'INSORGENZA DELLA NEUROPATIA DIABETICA .....	21
<b>1.3. DOLORE NEUROPATICO .....</b>	<b>28</b>
1.3.1. IL DOLORE.....	28
1.3.2. VIE NERVOSE DEL DOLORE.....	29
1.3.3. PATOGENESI DEL DOLORE NEUROPATICO.....	39
1.3.4 MECCANISMI ALLA BASE DELL'INSORGENZA DEL DOLORE NEUROPATICO .....	43
<b>1.4 NEUROPATIA DIABETICA DOLOROSA.....</b>	<b>48</b>
1.4.1 NEUROINFIAMMAZIONE.....	51
<b>1.5 STEROIDI NEUROATTIVI .....</b>	<b>55</b>
1.5.1 DEFINIZIONE DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI.....	55
1.5.2 BIOSINTESI DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI.....	57
1.5.3 STEROIDI NEUROATTIVI E SISTEMA NERVOSO CENTRALE.....	60
1.5.4 STEROIDI NEUROATTIVI E MODULAZIONE DEL DOLORE.....	62
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>66</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1 ANIMALI .....</b>	<b>68</b>
• Induzione del diabete .....	68

<b>3.2 ANALISI QUANTITATIVA DEGLI STEROIDI .....</b>	<b>69</b>
<b>3.3 TEST COMPORTAMENTALI .....</b>	<b>70</b>
• Iperalgesia meccanica: Randall-Selitto.....	70
• Allodinia meccanica: Von Frey .....	71
<b>3.4 ANALISI PROTEICA .....</b>	<b>72</b>
• Omogeneizzazione dei tessuti .....	72
• Estrazione della frazione postsinaptica (TIF, Frazione Insolubile al Triton) .....	72
• Western Blot .....	73
• Analisi dei dati .....	74
<b>3.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA .....</b>	<b>75</b>
<b>3.6 ANALISI DEL RILASCIO DI GLUTAMMATO.....</b>	<b>75</b>
• Purificazione dei sinaptosomi.....	75
• Stimolazione dei sinaptosomi.....	76
• Determinazione del rilascio di glutammato.....	76
<b>3.7 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA .....</b>	<b>77</b>
• Preparazione dei campioni .....	77
• Analisi morfometrica .....	78
<b>3.8 COLTURE CELLULARI.....</b>	<b>78</b>
<b>3.9 ANALISI STATISTICA .....</b>	<b>79</b>
<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1. ANALISI DEI LIVELLI DI DHT E 3<math>\alpha</math> -DIOLO NEL MIDOLLO SPINALE</b>	<b>81</b>
<b>4.2. VALUTAZIONE DELLA SENSAZIONE DOLORIFICA NEGLI ANIMALI</b>	
<b>DIABETICI .....</b>	<b>83</b>
<b>4.3. LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE PROTEINE PRE- E POST-</b>	
<b>SINAPTICHE E RILASCIO DI GLUTAMMATO NEI RATTI DIABETICI.....</b>	<b>85</b>
<b>4.4. FOSFORILAZIONE DEL RECETTORE NMDA .....</b>	<b>90</b>

<b>4.5. ESPRESSIONE DELLA SOSTANZA P, ATTIVAZIONE GLIALE E TSPO</b>	<b>93</b>
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	<b>100</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>106</b>

# RIASSUNTO

Il dolore rappresenta l'insieme delle sensazioni somatiche associate ad un danno tissutale in atto o potenziale o espresse in relazione a tale danno (IASP, 1986). Si tratta di un meccanismo di difesa dell'organismo che è mediato da un sistema che si estende dalla periferia, tramite le terminazioni di neuroni sensoriali (nocicettori), fino alla corteccia cerebrale, passando attraverso le corna dorsali del midollo spinale.

Quando il danno si verifica a livello del sistema nervoso, senza il coinvolgimento dei nocicettori, si parla di dolore neuropatico: questo ha origine da un'anomalia anatomica o funzionale del meccanismo di segnalazione del dolore (Chong and Bajwa, 2001). La disfunzione dell'attività neurologica che ne deriva provoca sensazioni dolorose che compromettono la qualità di vita di coloro che ne soffrono in molti aspetti come il sonno, l'umore, l'abilità al lavoro e le relazioni interpersonali (Galer et al., 2000).

Una delle principali cause del dolore neuropatico è la neuropatia diabetica (*Diabetic Neuropathy*, ND), una complicanza a lungo termine del diabete mellito: si parla, infatti, di neuropatia diabetica dolorosa (*Painful Diabetic Neuropathy*, PDN). Si stima che il 10% dei pazienti diabetici sviluppino dolore neuropatico e che nel 2030 almeno 48 milioni di persone avranno di queste problematiche (Callaghan et al., 2012).

Purtroppo il meccanismo con cui si manifesta il dolore neuropatico è alquanto sconosciuto: l'ipotesi più accreditata è che nella PDN si verifichino una ipereccitabilità e una iperattività spontanea delle fibre afferenti primarie dei neuroni delle corna dorsali del midollo spinale che porta a deficit sensitivi, come iperalgesia (eccessiva risposta ad uno stimolo che è normalmente doloroso) e allodinia (quando uno stimolo non doloroso suscita una sensazione dolorifica) (Todd, 2010).

Proprio per le scarse conoscenze sulla sua origine, il dolore neuropatico viene trattato con farmaci che alleviano soltanto la sensazione dolorifica (come analgesici, antiinfiammatori non steroidei, antidepressivi triciclici ed oppiacei), ma che purtroppo non risolvono il problema all'origine (Gore et al., 2007; Callaghan et al., 2012).

Osservazioni cliniche suggeriscono che gli ormoni sessuali possono avere un ruolo nella patogenesi e nel decorso clinico della PDN e che quindi potrebbero, potenzialmente, essere

utilizzati nella pratica terapeutica: le donne percepiscono più dolore degli uomini, hanno un maggior rischio di sviluppare il dolore cronico (Fillingim and Gear, 2004) ed hanno meno controllo inibitorio del dolore durante le fasi mestruali e luteali (Julien et al., 2005).

La rilevanza degli ormoni sessuali è stata dimostrata anche in modelli animali: ratti maschi castrati presentano una significativa riduzione della soglia del dolore, la quale torna a livelli normali dopo somministrazione di testosterone (Jaiprakash and Vilas, 1995). Si è inoltre notato che la somministrazione sottocutanea del testosterone e dei suoi derivati 5 $\alpha$ -ridotti, il diidrotestosterone (DHT) e il 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolo (3 $\alpha$ -diolo), protegge dall'iperalgia termica valutata mediante il tail-flick e il paw-lick test nei ratti gonadectomizzati rispetto ai loro controlli non sottoposti a gonadectomia (Edinger and Frye, 2005).

L'insieme di queste evidenze suggerisce che il testosterone e i suoi metaboliti 5 $\alpha$ -ridotti potrebbero spiegare una azione neuroprotettiva nei confronti della PDN.

Sulla base di queste osservazioni, lo scopo di questa tesi è stato quello di studiare i meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza della PDN e di valutare i possibili effetti analgesici del DHT e del 3 $\alpha$ -diolo in un modello animale di diabete mellito.

La patologia è stata indotta tramite un'iniezione intraperitoneale di streptozotocina (STZ) in ratti maschi adulti di ceppo Sprague-Dawley. Gli animali sono stati trattati a giorni alterni, per 30 giorni, con DHT, 3 $\alpha$ -diolo o con il solo veicolo di scioglimento (olio di sesamo) e gli effetti del trattamento sono stati valutati sia mediante studi comportamentali sia analizzando diversi parametri neurotrasmettitoriali e neuroinfiammatori coinvolti nella generazione, amplificazione e mantenimento della sensazione dolorifica.

I risultati ottenuti dopo 30 giorni dall'induzione della patologia diabetica mostrano come il DHT e il 3 $\alpha$ -diolo migliorino il decorso della patologia, il primo agendo soprattutto sull'iperalgia meccanica e sui parametri correlati alla trasmissione dell'impulso nervoso, il secondo agendo sull'allodinia tattile e sulla neuroinfiammazione.

Il DHT sembra esercitare un effetto analgesico aumentando la soglia dolorifica misurata con il test di Randall Selitto (test che valuta prevalentemente l'iperalgia meccanica) e contrastando quei meccanismi alla base dell'iperexcitabilità neuronale responsabile della generazione, propagazione e amplificazione della sensazione dolorifica che si osserva negli animali diabetici: in particolare, l'aumento dell'espressione delle proteine pre-sinaptiche Sinapsina-1 e Sintaxina-1, l'aumento della fosforilazione attivante a carico della subunità

GluN2B del recettore NMDA, l'aumento del rilascio di glutammato dalle afferenze sensoriali primarie. Inoltre il DHT è anche in grado di ridurre l'astrogliosi che caratterizza la PDN e di diminuire l'espressione della citochina anti-infiammatoria interleuchina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), esplicando così una blanda azione anti-infiammatoria.

Il trattamento con 3 $\alpha$ -diolo, invece, sembra diminuire l'allodinia tattile, misurata con il test di Von Frey, e la risposta neuroinfiammatoria: si osserva una riduzione dell'espressione della Sostanza P (SP) nei corpi cellulari delle afferenze sensoriali primarie, che correla con lo spegnimento della reattività astrogliale e con la diminuzione di espressione di molecole coinvolte in processi infiammatori, quali il *tool-like receptor-4* (TLR4), il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), l' interleuchina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), il fattore di crescita trasformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) e il traslocatore proteico da 18 kDa (TSPO).

Complessivamente questi risultati suggeriscono che il DHT e il 3 $\alpha$ -diolo utilizzano diversi meccanismi d'azione per esercitare il loro effetto analgesico nella PDN. Infatti come ampiamente dimostrato dalla letteratura il DHT interagisce con il recettore AR, mentre il 3 $\alpha$ -diolo con il recettore degli estrogeni (ER-  $\beta$  ) o con il recettore GABA-A (Roselli et al., 1987; Frye et al., 1996; Gee et al., 1998). A supporto di questa ipotesi nel nostro laboratorio sono stati condotti alcuni studi utilizzando un modello sperimentale in vitro di colture cellulari primarie di DRG che hanno permesso di osservare un effetto inibitorio specifico sull'espressione della SP mediato dal recettore GABA-A.

In conclusione, il lavoro svolto in questa tesi, ha permesso di comprendere meglio la patogenesi e la dinamica molecolare alla base dell'insorgenza della PDN e di dimostrare che i metaboliti 5 $\alpha$ -ridotti del testosterone sono efficaci, seppur con meccanismi diversi, nell'alleviare la sensazione dolorifica nelle sue varie componenti e che quindi potrebbero essere dei nuovi candidati nella terapia farmacologica della PDN.



# ABBREVIAZIONI

17 $\beta$ -E2:	17 $\beta$ -estradiolo
3 $\alpha$ -diolo:	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ - diolo
3 $\alpha$ -HSD:	3 $\alpha$ - idrossisteroide deidrogenasi
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP:	tetraidroprogesterone o allopregnanolone
3 $\beta$ -HSD:	3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi
5 $\alpha$ -R:	5 $\alpha$ -reduttasi
A-R:	aldoso reduttasi
ACTH:	ormone adrenocorticotropo
AD:	alzheimer
AE:	amminoacidi eccitatori
AGEs:	prodotti avanzati della glicazione
AMPA:	acido $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol propionico
AR:	recettore degli androgeni
ARIs:	inibitori dell' A-R
ARO:	aromatasi P450
AVM:	malformazione atro venosa
DAG :	1,2-diacilglicerolo
DAN:	neuropatia diabetica autonoma
DCCT :	Diabetes Control and Complication Trial
DHEA:	deidroepiandrosterone
DHEAS	deidroepiandrosterone solfato
DHP.	diidroprogesterone
DHT:	diidrotestosterone
DM:	diabete mellito
DNA:	acido desossiribonucleico
DRG:	gangli delle radici dorsali
DSPN:	polineuropatia sensomotoria distale simmetrica
EAE:	encefalomielite autoimmune sperimentale

EMG:	elettromiografia
ER:	recettore degli estrogeni
G-p:	proteina G
GABA-A:	recettore di tipo A dell'acido gamma-aminobutirrico
GABA:	acido gamma-aminobutirrico
GluN1:	subunità NR1 del recettore NMDA
GluN2A:	subunità NR2A del recettore NMDA
GluN2B:	subunità NR2B del recettore NMDA
GLUT-4:	trasportatore di glucosio di tipo 4
GPR30:	recettore 30 accoppiato alle proteine G
HLA:	human leukocyte antigen
IDDM:	diabete insulino-dipendente
IGF-1:	fattore di crescita insulino simile di tipo 1
IgG:	immunoglobulina G
IL-1:	interleuchina 1
IL-1 $\beta$ :	interleuchina-1 beta
IL-6:	interleuchina 6
IL-8:	interleuchina 8
IL-10:	interleuchina 10
IRS-1:	substrato-1 del recettore dell'insulina
LDL:	lipoproteine a bassa densità
MHC:	complesso maggiore di istocompatibilità
MPTP:	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NAD:	nicotinammide adenina di nucleotide
NADPH:	nicotinammide adenina dinucleotide fosfato
NCV:	velocità di conduzione nervosa
ND:	neuropatia diabetica
NF-kB :	fattore nucleare kB
NIDDM:	diabete non insulino-dipendente
NK1R:	recettore della neurochinina 1
NMDA:	N-Metil-D-Aspartato
NO:	monossido di azoto

P2X:	recettore purinergico dell'ATP
P450scc:	citocromo P450 che taglia la catena laterale del colesterolo
PAI-1:	inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno
PD_	Parkinson
PD-1:	proteina della morte programmata 1
PDN:	neuropatia diabetica dolorosa
pGluN1:	subunità NR1 fosforilata del recettore NMDA
pGluN2B:	subunità NR2B fosforilata del recettore NMDA
PKC:	proteina chinasi C
PR:	recettore del progesterone
PREG:	pregnenolone
PREGS:	pregnenolone solfato
PROG:	progesterone
PSD-95:	proteina della densità post-sinaptica 95
RAGES:	recettori per i prodotti avanzati della glicazione
RNS:	radicali liberi dell'azoto
ROS:	radicali liberi dell'ossigeno
SDH:	sorbitolo deidrogenasi
SNC:	sistema nervoso centrale
SNP:	sistema nervoso periferico
SP:	sostanza P
StAR:	proteina regolatrice della steroidogenesi acuta
STZ:	streptozotocina
TGFβ-1	fattore di crescita trasformante beta 1
TIF:	soglia di ritrazione della zampa
TLR-4:	tool-like receptor-4
TNFα:	fattore di necrosi tumorale α
tPA:	attivatore tissutale del plasminogeno
TSPO:	traslocatore proteico da 18 kDa,
UDP-GlcNAc:	uridina-difosfato-N-acetil-glucosamina
UKPDS:	UK Prospective Diabetes Study
VEGF:	fattore di crescita dell'endotelio vascolare

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1. DIABETE MELLITO

Il termine “diabete mellito” (DM) identifica un gruppo di disordini metabolici caratterizzati da elevati livelli di glucosio nel sangue (iperglicemia). In generale il DM è causato da una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali, che portano ad un’insufficiente secrezione e/o ad una diminuita azione insulinica.

Tale patologia è una delle più diffuse malattie endocrine ed il suo tasso di morbosità è in continuo aumento. Si calcola che circa il 5% della popolazione mondiale sia affetta da DM ed ancor più allarmanti sono i dati relativi al suo progressivo aumento di incidenza: nel 1985 i malati in tutto il mondo erano 30 milioni, nel 1995 135 milioni, nel 2001 circa 177 milioni. Nel 2030 si calcola che saranno 370 milioni (+ 110%) (Ministero della salute).

La stragrande maggioranza dei casi di diabete è raggruppabile in 4 classi: *i*) DM di tipo 1, *ii*) DM di tipo 2; *iii*) diabete gestazionale e *iv*) altri tipi specifici di diabete, che comprendono difetti genetici nella sintesi o azione dell’insulina, malattie del pancreas esocrino, farmaci o sostanze chimiche ad azione iperglicemizzante, endocrinopatie che producono ormoni iperglicemizzanti e forme associate a sindromi genetiche.

Il diabete di tipo 1 compare nell’individuo giovane con età compresa tra i 10-14 anni, costituisce circa il 10% dei casi di diabete ed è caratterizzato dalla mancanza assoluta di insulina e da iperglicagonemia che può essere relativa (livelli normali, però in assenza dell’ormone antagonista, cioè l’insulina) o assoluta (livelli al di sopra del normale perché manca il feedback inibitorio intrainulare esercitato dalla insulina). È la più grave delle forme di diabete perché porta rapidamente e precocemente alla mancanza assoluta d’insulina. Una volta veniva chiamato diabete insulino-dipendente (IDDM), in contrapposizione al diabete di tipo 2 non insulino-dipendente (NIDDM), per evidenziare la necessità di somministrare insulina per mantenere in vita il paziente. Questa dicitura è stata abbandonata perché anche nelle fasi ipoinsulinemiche del DM di tipo 2 può essere necessario la somministrazione dell’ormone.

Il diabete di tipo 1 è una patologia su base autoimmune che si sviluppa per azione sinergica di una predisposizione genetica legata al complesso maggiore di istocompatibilità (*major histocompatibility complex*, MHC) e di fattori ambientali che portano alla distruzione delle

cellule  $\beta$  pancreatiche. Il processo patologico inizia subito dopo la nascita e richiede un certo numero di anni per produrre un diabete clinicamente manifesto che necessita la distruzione di circa l'80% della massa delle cellule  $\beta$ . Il processo autoimmune insorge in individui che hanno una predisposizione genetica associata a molecole ad aptotipi HLA (*human leukocyte antigen*) di classe II, la cui funzione è quella di presentare l'antigene ai linfociti T helper. In particolare il rischio di sviluppare diabete di tipo 1 in individui che esprimono l'aplotipo DR3 è 5 volte superiore rispetto alla popolazione generale, gli individui che esprimono DR4 hanno un rischio maggiore di circa 7 volte, mentre il rischio è maggiore di più di 14 volte se sono espressi entrambi. L'origine autoimmune del DM di tipo 1 è confermata dal fatto che l'immunoterapia causa la remissione della patologia e che il trapianto di pancreas da un soggetto non diabetico al gemello omozigote diabetico produce insulite senza rigetto dell'organo e successiva ripresa della patologia. Oltre alla predisposizione genetica anche i fattori ambientali sono importanti nel determinare l'insorgenza della patologia. Tra questi vi sono alcuni tipi di virus (il coxackievirus, il virus della rosolia), alcuni composti chimici (ad es. streptozocina, allossana) e il contatto precoce con le proteine del latte vaccino.

Il diabete di tipo 2 costituisce più del 90% dei casi di diabete e rappresenta un gruppo eterogeneo di patologie ad eziologia complessa, in cui fattori genetici e ambientali (come l'eccessiva nutrizione e la sedentarietà) concorrono nel determinare la malattia. Questa forma di diabete insorge nell'individuo adulto ed è caratterizzata sia dalla comparsa di una resistenza relativa dei tessuti periferici all'azione insulinica come il muscolo scheletrico, il fegato e il tessuto adiposo, con conseguente instaurazione di un circolo vizioso che porta alla compromissione della secrezione di insulina (insulino-deficienza relativa), sia da una ridotta secrezione insulinica. La riduzione della secrezione insulinica causa inoltre iperglucagonemia relativa e quindi un'eccessiva produzione epatica di glucosio favorirà ulteriormente l'aumento dei livelli glicemici a digiuno (diabete conclamato). La fase finale della malattia può essere una quasi totale incapacità della beta cellula di secernere insulina. La patogenesi del diabete di tipo 2 è lenta e possono passare molti anni prima che si manifesti un'alterata tolleranza al glucosio e successivamente una situazione di iperglicemia.

Il diabete gestazionale affligge circa il 4% delle donne gravide. E' una forma lieve di diabete che regredisce spontaneamente dopo il parto. E' però considerata la prima

manifestazione clinica di intolleranza al glucosio, che con gli anni può sfociare in una forma di DM conclamato (il 30-60% dei casi sviluppa DM tipo 2).

La principale causa di tale malattia è l'incapacità del paziente di far fronte all'aumentata richiesta insulinica, determinata dalla situazione fisiologica di insulino-resistenza che si crea nella madre durante il periodo gestazionale. Tale situazione è legata alla presenza di alcuni ormoni che antagonizzano l'insulina (prolattina, estradiolo, lattotropo placentare). Pur non essendo una forma grave di diabete, è molto importante la sua diagnosi precoce, poiché la situazione d'iperglicemia incontrollata che s'instaura nell'embrione stimola la produzione di insulina. Agendo l'insulina come fattore di crescita, l'iperinsulinemia che ne risulta può generare effetti dannosi a livello fetale, come macrosomia, aborto e morte neonatale.

I segni e i sintomi comuni a tutte le forme di diabete sono legati allo stato iperglicemico e comprendono glicosuria (perdita di glucosio con le urine per superamento della soglia renale), poliuria (emissioni di grande quantità di urina poiché il glucosio è una molecola osmoticamente attiva e quindi la sua presenza nelle urine determina perdita di acqua), polidipsia (tendenza ad ingerire grandi quantità di liquidi poiché la perdita di liquidi nell'organismo attiva il centro della sete), negativizzazione del bilancio azotato e aumento dei corpi chetonici circolanti (acidosi metabolica) dovuto alla metabolizzazione di proteine e lipidi a fini energetici a causa della diminuzione di insulina e dell'aumento di glucagone.

### **1.1.1. COMPLICANZE DEL DIABETE**

Come conseguenza della situazione iperglicemica che caratterizza la patologia diabetica si generano alterazioni metaboliche denominate "complicanze del diabete". Queste possono essere acute (alterazioni del metabolismo causate dall'iperglicemia stessa) o a lungo termine (alterazioni strutturali e/o funzionali di organi e tessuti causate dalle modificazioni metaboliche determinate dalla situazione di iperglicemia).

Le complicanze acute più temibili sono lo stato di ipoglicemia (coma ipoglicemico), di chetoacidosi (coma chetoacidotico) e di iperosmolarità non chetotica (coma iperosmolare).

1. **Ipoglicemia:** le reazioni ipoglicemiche sono la complicanza più comune che si verifica nei pazienti diabetici trattati con insulina. Può essere causata dall'eccessiva o sbagliata assunzione di insulina o farmaci ipoglicemizzanti (ipoglicemia

iatrogena); da un esercizio fisico inconsueto senza un adeguato apporto calorico; dall'assunzione di poco cibo (soprattutto di carboidrati che contengono glucosio). Nei pazienti con diabete insulino-dipendente il cervello può abituarsi a bassi livelli di glucosio, con una attenuazione dei sintomi esterni nonostante il problema neuroglicopenico presente (stato mentale alterato, instabilità, irritabilità, aggressività, mal di testa, ecc...). Si parla in questo caso di ipoglicemia inconsapevole (Greenspan et al., 2009).

2. Chetoacidosi diabetica: è la complicanza più frequente nel diabete di tipo 1 ed è il risultato della situazione metabolica che si genera a causa dell'insulino-deficienza e del conseguente eccesso di glucagone. Si tratta di una emergenza medica potenzialmente letale, con una percentuale di mortalità inferiore al 5% negli individui sotto i 40 anni d'età, ma con una prognosi più infausta negli anziani, che hanno tassi di mortalità superiori al 20%. La scarsa compliance del paziente, per ragioni psicologiche o per un'istruzione inadeguata, è la causa più comune di chetoacidosi diabetica, soprattutto quando gli episodi di chetoacidosi sono ricorrenti. Negli adolescenti con diabete di tipo 1 e con ripetuti episodi di chetoacidosi diabetica è spesso indicata una terapia comportamentale per migliorare la compliance alla terapia.

Anche i pazienti con diabete di tipo 2 possono sviluppare una chetoacidosi in condizioni di grave stress, come con una sepsi, un trauma o un intervento chirurgico.

Questa situazione di acidosi metabolica è causata dall'eccessiva lipolisi e  $\beta$ -ossidazione epatica degli acidi grassi indotta dalla iperstimolazione esercitata dal glucagone in assenza d'insulina. Il processo metabolico, infatti, porta alla formazione di metaboliti acidi (acetone, acido acetacetico, acido  $\beta$ -idrossibutirrico); vi può essere inoltre una diminuita volemia (a causa della glicosuria). La compensazione respiratoria produce tachipnea (respirazione di Kussmaul) ed è presente il classico odore di acetone nel respiro. Altri segni e sintomi, alcuni dei quali ascrivibili alla disidratazione, sono tachicardia, secchezza delle mucose, ipotensione, nausea e vomito, alterazioni delle funzioni mentali (che possono evolvere a coma in caso di chetoacidosi severa). La chetoacidosi può aggravarsi quando, in un paziente diabetico, vi è un'ulteriore necessità di insulina circolante

come nel caso di stress fisici o emotivi durante i quali il cortisolo, liberato in seguito alla stimolazione corticale surrenale da parte dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH), stimola la gluconeogenesi e inibisce l'azione dell'insulina.

3. Iperosmolarità non chetotica: si verifica più spesso in pazienti anziani con diabete di tipo 2 che hanno un apporto idrico inadeguato. I sintomi principali (ipotensione ortostatica, letargia e altri sintomi neurologici che possono esitare nel coma) sono legati alla grave disidratazione generata dalla diuresi osmotica non controbilanciata da un aumentato apporto idrico. La grave deplezione del volume ematico riduce l'escrezione renale di glucosio causando un rapido aumento dell'osmolarità plasmatica con possibilità di coma iperosmolare. La disidratazione del compartimento intracellulare a livello dei neuroni provoca l'insorgenza di diversi sintomi neurologici quali la confusione mentale, gli attacchi epilettici e il coma. L'assenza di respirazione di Kussmaul e dell'odore di acetone nel respiro, come anche la presenza di segni di disidratazione grave, sono importanti elementi della diagnosi differenziale rispetto alla chetoacidosi.

Le complicanze a lungo termine solitamente compaiono dopo 10-20 anni di malattia diabetica e colpiscono diversi organi e sistemi; la loro incidenza aumenta in funzione della gravità e della durata del diabete e sono responsabili della morbilità e della mortalità associate a questa patologia. Tali complicanze sono dovute agli squilibri metabolici causati dall'eccessivo livello di glucosio nel sangue e sono arbitrariamente suddivise in vascolari e non vascolari. Le complicanze vascolari si dividono a loro volta in microangiopatiche (retinopatia, neuropatia, nefropatia) e macroangiopatiche (coronaropatie, arteriopatie periferiche, malattie cerebrovascolari). Le non vascolari coinvolgono il sistema nervoso (neuropatie), l'apparato gastrointestinale (gastroparesi, diarrea), il sistema genito-urinario (disfunzioni sessuali, infezioni delle vie urinarie), la pelle (ulcerazioni, problemi di cicatrizzazione) e l'occhio (cataratta). Inoltre nei pazienti diabetici aumenta anche l'incidenza generale di patologie infettive. (Celotti, 2013).



## 1.2. NEUROPATIA DIABETICA

La neuropatia diabetica (ND) è una delle più diffuse complicanze a lungo termine del diabete mellito e rappresenta una delle principali cause di mortalità associata a questa patologia. L'incidenza della ND è di circa l'8% nei pazienti diabetici al momento della diagnosi, mentre sale al 50% nei casi di diabete a lunga durata (maggiore di 25 anni) (Boulton et al., 2005).

Le neuropatie diabetiche sono eterogenee e colpiscono diverse parti del sistema nervoso con conseguenti diverse manifestazioni cliniche. In particolare la ND può indurre alterazioni anatomiche e funzionali a carico del sistema nervoso periferico (nervi sensitivi e motori), del sistema nervoso somatico o vegetativo (che comprende componenti che si localizzano sia nella zona centrale che periferica del sistema nervoso responsabili della regolazione di quelle funzioni automatiche, prive del controllo della coscienza, come il battito cardiaco o la secrezione ormonale) e del sistema nervoso centrale (cervello e midollo spinale).

La neuropatia che si riscontra nel diabete colpisce tutte e tre le sezioni del sistema nervoso, generando sintomi estremamente vari.

### **Sistema Nervoso Periferico**

La neuropatia a carico del sistema nervoso periferico (SNP) può essere classificata in base alla localizzazione anatomica e/o in base al tipo di fibre nervose coinvolte. Nel primo caso si distinguono neuropatie focali e/o diffuse, nel secondo caso si parla di polineuropatia sensomotoria distale simmetrica (DSPN) in quanto sono interessate le fibre somatiche (Thomas et al., 1997).

Tali disordini possono manifestarsi sia a livello clinico, con numerosi e differenti sintomi, che subclinico, con anomalie riscontrabili solo con *test* diagnostici specifici.

Le neuropatie focali sono le meno comuni ed hanno in genere un effetto acuto e limitante. Possono interessare un solo nervo (mononeuropatie) o più nervi ma senza un coinvolgimento generalizzato (mononeuropatie multiple). I nervi più colpiti sono quelli cranici e femorali e predominano le anomalie motorie. Tra le neuropatie focali sono comprese anche le radiculopatie, che interessano le radici dei nervi e le plessopatie, che riguardano regioni del plesso brachiale e lombosacrale.

Le neuropatie diffuse sono le più comuni ed hanno in genere un effetto cronico e progressivo. Tra queste la DSPN è la forma più comune di neuropatia diabetica periferica ed è causata da un processo neuropatico assonico che danneggia sia le fibre nervose grandi e mielinizzate sia quelle più piccole mielinizzate e non. Nei nervi periferici coinvolti, sia motori che sensitivi, si osserva un ritardo nella conduzione dell'impulso nervoso; il coinvolgimento sensitivo di solito avviene per primo e generalmente è bilaterale, simmetrico ed associato ad una diminuita percezione delle vibrazioni e della temperatura. L'alterazione della sensibilità provoca disturbi che inizialmente sono rappresentati da sensazioni anomale come i formicolii, che generalmente si sviluppano nelle estremità inferiori e si estendono gradualmente più in alto: dalle dita a tutto il piede e quindi alle gambe con una distribuzione simmetrica (ad entrambi gli arti) detta "a calza". Con la stessa sequenza si manifestano i disturbi a carico delle mani e delle braccia (interessamento "a guanto") (Figura 1). Nei casi più gravi può riguardare anche la regione toracica e addominale (Callaghan et al., 2012). Dal senso di formicolio si può passare al bruciore, alla sensazione di "puntura di spilli", al dolore, che può variare qualitativamente e quantitativamente (dal dolore crampiforme prevalentemente notturno, a fitte lancinanti alle piante dei piedi). Il dolore, quando presente, può passare dal lieve fastidio ai sintomi gravi ed invalidanti. Il deficit sensitivo può talvolta essere sufficiente per evitare che i pazienti provino dolore (Greenspan et al., 2009).

Per quanto riguarda la componente motoria, l'alterazione comporta una profonda debolezza muscolare, soprattutto a carico delle piccole articolazioni; obiettivamente si può osservare una diminuzione delle masse muscolari che nei quadri clinici estremi può condurre a deformazioni caratteristiche di mani e piedi (ad "artiglio di uccello").

La diagnosi della neuropatia periferica si avvale, oltre al fondamentale esame obiettivo neurologico, anche di metodiche strumentali come l'importantissima elettromiografia (EMG), che consiste nella registrazione delle velocità di conduzione motoria e sensitiva dei nervi esplorati. Lo specialista può interpretare i tracciati elettromiografici indicando con precisione le disfunzioni dei nervi esaminati e quantificandone la gravità.

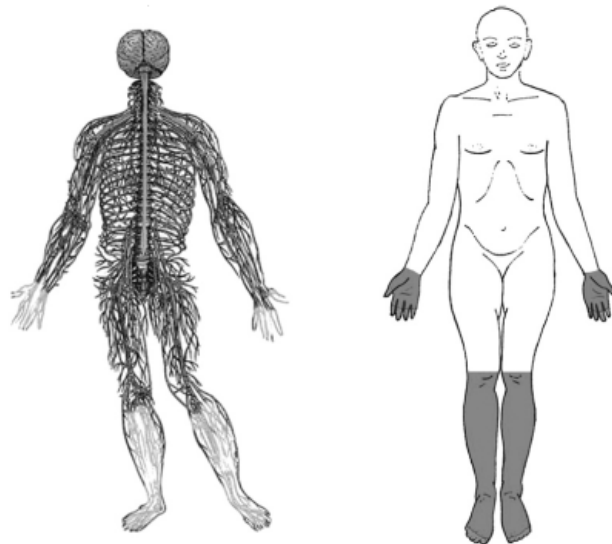
## **Sistema Nervoso Autonomo o Vegetativo**

La neuropatia a carico del sistema nervoso autonomo o vegetativo è un tipo di neuropatia diffusa che coinvolge le fibre autonome e per questo prende il nome di neuropatia diabetica autonoma (DAN). La DAN, che spesso accompagna la DSPN, può interessare sia il sistema nervoso simpatico sia quello parasimpatico e si manifesta dunque in modi diversi a seconda delle fibre autonome coinvolte. Questa sezione del sistema nervoso è quella preposta al controllo di quelle funzioni dell'organismo al di fuori del controllo della coscienza (respirazione, attività cardiaca, ecc.). Nell'apparato digerente, ad esempio, il sistema nervoso si occupa di regolare i movimenti e la secrezione ghiandolare di stomaco, duodeno, intestino tenue e crasso; nel sistema circolatorio controlla il battito cardiaco e la pressione arteriosa; nell'apparato urinario attiva i movimenti vescicali responsabili della minzione. Questi sono solo alcuni esempi delle attività svolte dal sistema nervoso vegetativo, che rendono ragione dello spettro quanto mai vario di sintomi che possono essere generati da una disfunzione di questo importante sistema di regolazione, sintomi che possono trarre in inganno anche i medici, quando non siano posti nella giusta relazione con la presenza della malattia diabetica. A livello oculare si può avere una ridotta risposta pupillare alla luce, che si ripercuote anche sulla acuità visiva. Nel distretto gastrointestinale sono coinvolti esofago, stomaco, duodeno, colecisti ed intestino con una sintomatologia che potrà variare a seconda dell'organo colpito: senso di nausea dopo i pasti, rallentato svuotamento gastrico, episodi di diarrea. A livello urogenitale si avrà la cosiddetta vescica diabetica, caratterizzata da un ritardato stimolo ad urinare, con successiva dilatazione della vescica e perdita di urina. Potranno quindi associarsi frequenti infezioni delle vie urinarie. Il coinvolgimento del sistema endocrino, deputato nell'organismo alla produzione di ormoni, ha ripercussioni sullo stato ipoglicemico del paziente diabetico: infatti, mentre normalmente in caso di ipoglicemia si ha una secrezione di ormoni (catecolamine) che determina sintomi come la tachicardia, nel diabetico questa risposta ormonale è ridotta al punto che il paziente non avverte nessuna sintomatologia di allarme, potendo quindi incorrere nei gravi rischi dell'ipoglicemia. La compromissione del distretto termoregolatore si manifesta con un senso di calore agli arti anche quando questi sono esposti al freddo, con l'assenza di sudorazione al tronco e agli arti ed aumento di sudorazione al volto ed al collo. Di notevole importanza clinica è anche la compromissione del distretto cardiovascolare: all'inizio vi è aumento della velocità dei battiti cardiaci (tachicardia, 90-

100 battiti al minuto), mentre tardivamente si può manifestare una mancata risposta della frequenza cardiaca al cambio di posizione da quella supina a quella eretta e alla respirazione profonda. Un altro importante sintomo è il calo della pressione arteriosa (almeno 30 mmHg) che si verifica passando dalla posizione supina e quella eretta e che determina la comparsa di vertigini, ronzii, stato confusionale fino alla perdita di coscienza.

## Sistema Nervoso Centrale

Nel sistema nervoso centrale si possono riscontrare processi degenerativi a carico dei neuroni e dei fasci nervosi di encefalo, tronco encefalico, nervi ottici, causati anch'essi dall'iperglicemia diabetica. Queste alterazioni causano deficit delle varie funzioni: cognitive, sensitive, motorie, di memoria, di comportamento, visive ed acustiche. Vi sono indagini altamente sensibili che possono svelare questi danni anatomici e funzionali. Per prevenire nel miglior modo possibile lo sviluppo di queste complicanze è ancora una volta di fondamentale importanza il controllo della glicemia: riuscire a mantenere uno stato normoglicemico può evitare il perpetuarsi e l'aggravarsi del danno, anche se non può sempre consentire la sua regressione (Biessels et al., 2008, 2002; Gispén and Biessels, 2000; Jacobson et al., 2002; McCall 2002; Kodl and Seaquist, 2008).



**Figura 1:** configurazione a “guanto” o a “calza” della polineuropatia sensomotoria distale simmetrica (DSPN).

## 1.2.1. MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELL'INSORGENZA DELLA NEUROPATIA DIABETICA

La patogenesi della ND è legata a diverse disfunzioni metaboliche, tutte ricollegabili all'iperglicemia e all'insulino-resistenza che caratterizzano il DM. I due più importanti *trials* clinici effettuati su pazienti diabetici di tipo 1 e 2, il *Diabetes Control and Complication Trial (DCCT)* e il *UK Prospective Diabetes Study (UKPDS)*, infatti, dimostrano che un rigoroso controllo farmacologico della glicemia riduce l'incidenza e la progressione della ND, individuando nell'iperglicemia la principale causa di questa patologia (Boulton, 1998; Stratton et al., 2000; Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, 2002).

L'aumentata concentrazione intracellulare di glucosio nel tessuto nervoso conseguente all'iperglicemia è legata al fatto che i trasportatori del glucosio presenti in questo tessuto non sono sensibili all'insulina; pertanto non si instaura un'insulino-resistenza come nel tessuto adiposo, muscolare ed epatico e il glucosio è libero di entrare all'interno della cellula (Celotti, 2013).

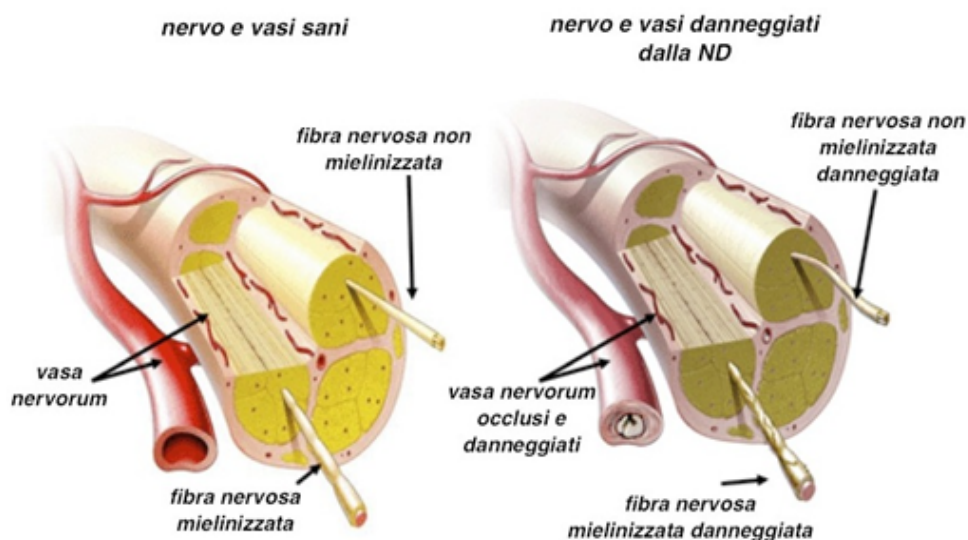
Numerosi meccanismi sembrerebbero alla base del danno neurale dovuto allo stato iperglicemico, ma si pensa che il ridotto flusso neuro-vascolare e la derivata ipossia neurale abbiano un ruolo centrale nell'eziologia di tale patologia (Figura 2) (Cameron et al., 2001).

Le neuropatie diabetiche hanno quindi sicuramente una causa o concausa vascolare (microangiopatie dei vasa nervorum) che diversi studi hanno dimostrato essere scatenata da vari meccanismi biochimici tutti aventi come caratteristica comune l'eccesso di glucosio: *i)* attivazione della via dei polioli, *ii)* aumento della formazione di diacilglicerolo, *iii)* attivazione della via dell'esossamina e *iv)* formazione di proteine glicate.

Questi mediatori influenzano profondamente il normale processo di rimodellamento del vaso sanguigno, conducendo ad alterazioni del ricambio cellulare, della matrice extracellulare, della regolazione del tono e della permeabilità vascolare e della

coagulazione. Tra gli elementi cellulari che costituiscono il vaso sanguigno, gli studi di patogenesi si sono incentrati in particolare sulle cellule endoteliali, in quanto le alterazioni della loro funzione rappresentano l'evento centrale in grado di innescare tutte le alterazioni vascolari tipiche della vasculopatia diabetica. L'endotelio normale, infatti, costituisce una barriera al passaggio di macromolecole e cellule, contribuisce a regolare la pressione arteriosa e il flusso sanguigno, modula la coagulazione e la fibrinolisi e partecipa al rimodellamento vascolare. Un endotelio sano, quindi, tende a determinare vasodilatazione, bassa permeabilità, attività anticoagulante e anti-aggregante, inibizione della proliferazione cellulare e dell'accumulo di matrice. L'endotelio aterogeno, al contrario, è caratterizzato da elevata permeabilità, dalla presenza di patterns pro-coagulanti e pro-aggreganti e dall'accumulo di matrice extracellulare. In corso di vasculopatia diabetica sono presenti tutte queste alterazioni e le alterazioni della funzione di barriera sono le più precoci ad apparire e si manifestano sia clinicamente, ad esempio con il passaggio di proteine nelle urine, sia sperimentalmente mediante l'aumento della deposizione di macromolecole sulla parete vascolare.

Tali meccanismi sembrano colpire oltre i neuroni anche altri elementi neurali, come le cellule di Schwann nel sistema nervoso periferico e gli oligodendrociti nel midollo spinale.



**Figura 2:** rappresentazione del nervo sano (a sinistra) e del nervo neuropatico (a destra). In quest'ultimo si possono osservare occlusioni a livello dei vasi e danni alla guaina mielinica e all'assone.

## • **Via dei polioli**

La via dei polioli, o via del sorbitolo, è una delle vie metaboliche del glucosio, e consiste di due reazioni (Figura 3): la prima, catalizzata dall'enzima nicotinammide adenina dinucleotide fosfato (NADPH)-dipendente aldoso-reduttasi (A-R), riduce il glucosio in sorbitolo; la seconda, catalizzata dall'enzima nicotinammide adenina di nucleotide (NAD)-dipendente sorbitolo deidrogenasi (SDH), ossida il sorbitolo formato precedentemente in fruttosio. In condizioni fisiologiche solo una minima parte del glucosio, 3% circa, viene metabolizzato attraverso questa via, essendo favorita la glicolisi. Nella condizione di iperglicemia presente nel DM però, vi è un aumento dell'afflusso di glucosio verso la via dei polioli, essendo la via glicolitica saturata dall'eccesso di substrato. Ciò comporta l'attivazione degli enzimi A-R e SDH per un fattore di massa, con l'aumento dei loro prodotti, sorbitolo e fruttosio rispettivamente.

L'elevata concentrazione intracellulare di sorbitolo comporta un aumento dell'osmolarità cellulare ed un efflusso compensatorio di mioinositolo, un importante segnale di trasduzione, e di taurina, un antiossidante (Nakamura et al., 1999; Vincent et al., 2004). Inoltre, dato che l'enzima A-R richiede come cofattore NADPH, diminuisce la rigenerazione NADPH dipendente di glutazione ridotto (GSH), con un aumento dello stress ossidativo (Jermendy et al., 1991; Brownlee, 2005).

L'aumento di fruttosio a sua volta, essendo un agente glicante 10 volte più potente del glucosio (Obrosova et al., 2005), promuove la formazione dei prodotti di glicazione, oltre a favorire lo sbilanciamento ossido-reduttivo per deplezione di NADPH (Feldman et al. 1997).

L'attivazione dell'enzima A-R infine aumenta la produzione di diacilglicerolo, che attiva la proteina chinasi C (discussa più avanti) (Yamagishi et al., 2003; Uehara et al., 2004).

Questi sbilanci metabolici si traducono in danni tissutali in vari distretti, come il cristallino, la retina, i glomeruli renali ed i nervi periferici, bersagli tipici delle complicanze del diabete.

Attualmente numerosi studi clinici che si basano sull'utilizzo degli inibitori dell'A-R (ARIs), dimostrano che bloccando il primo enzima della via metabolica, si verificano modesti miglioramenti della funzionalità nervosa e della morfometria (Hotta et al., 1995; Efanova et al., 1999; Greene et al., 1999)

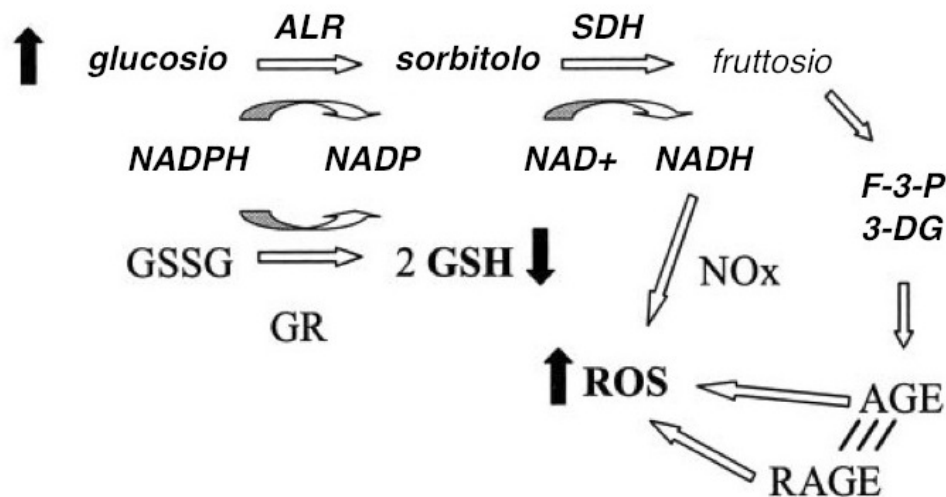


Figura 3: rappresentazione schematica della via dei polioli.

- **Aumento della formazione di diacilglicerolo e attivazione della proteina chinasi C**

Con proteina chinasi C (PKC) si intende una superfamiglia di isoenzimi coinvolti nella trasduzione del segnale agenti attraverso la fosforilazione di un'ampia varietà di substrati proteici cellulari. Molti di questi enzimi sono attivati dal 1,2-diacilglicerolo (DAG) in presenza di fosfatidilserina.

L'iperglicemia è in grado di incrementare la sintesi di DAG, con conseguente attivazione della PKC. L'over-attivazione di questo enzima causa l'aumento dell'espressione di numerosi fattori coinvolti nel danno vascolare, come il fattore nucleare kB (NF-kB), l'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e il TGF- $\beta$ .

L'esatto meccanismo d'azione con cui la PKC contribuisce alla ND non è ben chiaro e necessita di ulteriori studi; tuttavia si ritiene che l'anomala stimolazione di questo enzima sia in grado di alterare le normali funzioni fosforilative coinvolte nella trasduzione del segnale, determinando fenomeni di vasocostrizione, alterazione della permeabilità capillare, ipossia, angiogenesi e alterazioni della membrana basale nervosa (Arikawa et al., 2007; Das Evcimen and King, 2007). L'attivazione della PKC è stata correlata allo sviluppo di retinopatie, nefropatie e danni vascolari che sono spesso presenti nella ND



(Arikawa et al., 2007; Das Evcimen and King, 2007; Veves and King, 2001).

L'attivazione della PKC sembra inoltre alterare la funzionalità della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi e di altri enzimi cruciali nella conduzione dell'impulso nervoso (Greene et al., 1987; Xia et al., 1995)

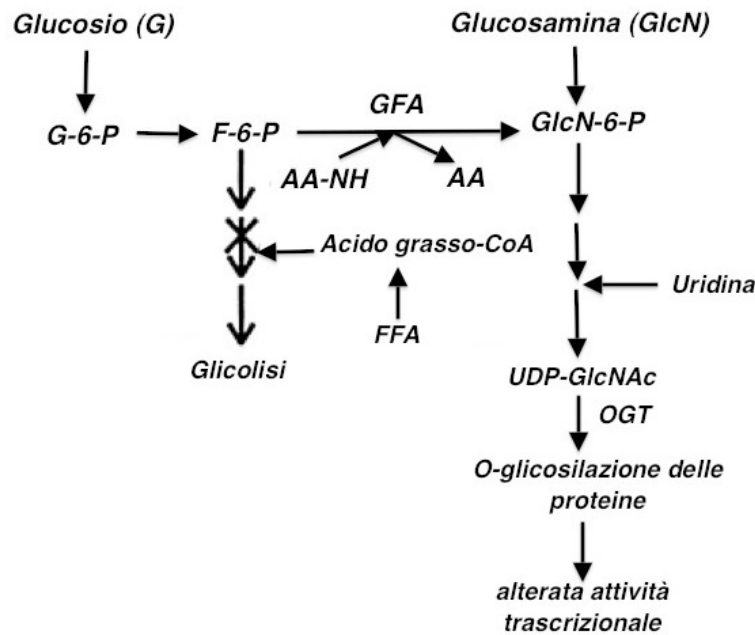
Infine il collegamento tra l'attivazione PKC e la ND è sostenuto dall'osservazione di alcuni fenomeni di insulino-resistenza, dovuti in buona parte anche a questo .

## • **Via dell'esossamina**

Nella via dell'esossamina il fruttosio-6-fosfato proveniente dalla glicolisi viene convertito in glucosamina-6-fosfato ad opera della glutamina-fruttosio-6-fosfato-amidottransferasi (Thornalley, 2005) (Figura 4). La glucosamina-6-fosfato è quindi convertita in uridina-difosfato-N-acetil-glucosamina (UDP-GlcNAc). Quest'ultima è un substrato della UDP-GlcNAc transferasi, che la lega a residui di serina o treonina di alcune proteine bersaglio, influenzando l'espressione genica (Brownlee, 2001; Kolm-Litty et al., 1998; Sayeski and Kudlow, 1996).

La condizione di iperglicemia presente nel DM aumenta l'afflusso di substrato verso questa via metabolica, portando ad un eccesso di GlcNAc e ad una modificazione dell'espressione genica di vari bersagli molecolari. Per esempio possono venire glicosilate proteine rilevanti nei meccanismi di resistenza insulinica come il fosatidilinositol 3-chinasi (PI3K), il substrato-1 del recettore dell'insulina (*Insulin Receptor Substrate-1*, IRS-1), la glicogeno sintetasi, il trasportatore di glucosio di tipo 4 (GLUT-4). Inoltre la glicosilazione O-GlcNAc è in grado di stimolare l'espressione genica del TGF- $\beta$  e dell'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1).

Ulteriori studi inoltre hanno evidenziato un coinvolgimento della via dell'esossamina nello sviluppo di insulino-resistenza e di complicazioni vascolari (Dias and Hart, 2007; Love and Hanover, 2005).



**Figura 4:** rappresentazione schematica della via dell'esossamina.

## • Formazione di proteine glicate

L'elevata concentrazione intracellulare di glucosio aumenta la glicazione proteica, cioè l'attacco di residui glicosilici ai gruppi amminici di proteine intra-ed extra-cellulari. La reazione è di solito irreversibile e non specifica, perché non è catalizzata da enzimi ma dipende dalla concentrazione di glucosio. Questo processo modifica in modo irreversibile la conformazione delle proteine alterandone le funzioni. Inoltre, le proteine glicate tendono a formare legami con altre proteine producendo degli addotti proteici chiamati prodotti avanzati della glicazione (*Advanced Glycation End products*, AGEs) che a causa della loro reattività possono produrre danni tissutali quali l'alterazione della matrice extracellulare, l'accelerazione dei processi aterosclerotici e disfunzioni endoteliali.

Gli AGEs inducono marcati effetti vascolari, sia agendo direttamente sia in seguito al legame con i specifici recettori (*Receptors for Advanced Glycation End products*, RAGEs) (Jude et al., 1999). Sono stati identificati recettori per gli AGEs (Neeper et al., 1992) sulle cellule endoteliali, sui fibroblasti, sulle cellule del mesangio e sui macrofagi. In quest'ultimo tipo di cellule, l'internalizzazione degli AGEs produce il rilascio di fattori di crescita quali TNF $\alpha$ , l'interleuchina 1 (IL-1), il fattore di crescita insulino simile di tipo 1 (*Insulin like Growth Factor-1*, IGF-1) e il fattore di crescita derivato dalle piastrine

(*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF); le cellule endoteliali accumulano AGEs nel sub-endotelio producendo un aumento della permeabilità capillare e causando una riduzione della produzione di monossido di azoto (NO); a livello mesangiale, gli AGEs, invece, aumentano la produzione di matrice extracellulare con un meccanismo PDGF-dipendente. Gli AGEs possono, inoltre, reagire con le lipoproteine a bassa densità (*Low-Density Lipoprotein*, LDL) impedendo il loro legame con i recettori cellulari per queste lipoproteine e rendendole disponibili per l'ossidazione e la successiva captazione tramite il recettore "scavenger". RAGE si trova anche nell'endotelio e nelle cellule di Schwann, e la sua attivazione si ritiene porti alla trascrizione di alcuni geni pro-infiammatori, tra cui NF- $\kappa$ B e l'interleuchina 6 (IL-6) (Bierhaus et al., 2001). L'elevato livello di AGEs presente nei pazienti diabetici è in grado quindi di causare un'eccessiva stimolazione di RAGE, determinando uno stato di infiammazione a livello dei nervi periferici (Bierhaus et al., 2004; Karachalias et al., 2003; Wada and Yagihashi, 2005).

L'iperglicemia cronica produce di per sé stress ossidativo e nitrosativo con formazione di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), che sono causa di ulteriori danni cellulari e possono attivare i meccanismi sopra descritti.

È stato riscontrato, infatti, un innalzamento dei livelli di ROS prodotti e una riduzione dell'attività della catalasi e della glutatione perossidasi, principali meccanismi di protezione dall'eccessiva produzione di ROS, a livello del midollo spinale, dei nervi periferici, nei vasa nervorum e nei gangli delle radici dorsali (DRG) (Stevens et al., 2000; Obrosova et al., 2001).

È stato recentemente documentato che nelle cellule endoteliali e di Schwann del nervo periferico, nella glia e nei neuroni dei DRG, negli astrociti, oligodendrociti e neuroni del midollo spinale dei soggetti affetti da diabete mellito si verifica anche un accumulo della concentrazione di NO, il principale responsabile dello stress nitrosativo (Obrosova, 2009).

Queste specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto tramite diversi meccanismi (quali danno diretto all'acido desossiribonucleico (DNA), deplezione di sostanze antiossidanti endogene, lipoperossidazione e ossidazione dei gruppi tiolici delle proteine) (Galli et al., 2008) portano a una ridotta velocità di conduzione nervosa (NCV) e a un deficit del flusso ematico nervoso, parametri caratteristici della ND (Nagamatsu et al., 1995; Cameron et al., 2001; Obrosova et al., 2005; Inkster et al., 2007).

## 1.3. DOLORE NEUROPATICO

### 1.3.1. IL DOLORE

Il dolore è definito come “una sgradevole esperienza emotiva e sensoriale associata a reale o potenziale danno del tessuto o descritta in termini di tale danno” (Associazione Internazionale per lo Studio del Dolore, IASP, 1986; Merskey et al., 1994). Tale definizione deriva dalla necessità di garantire una distinzione tra stimolo e percezione. In altre parole, uno stimolo nocicettivo o dannoso o potenzialmente dannoso non è necessariamente percepito come doloroso, mentre uno stimolo innocuo può essere, a sua volta, doloroso (Luyten et al., 2005).

Il dolore può essere classificato in molti modi, tenendo conto per esempio della sua durata, della localizzazione e della sua eziologia. Per quanto riguarda la durata, può essere recente (acuto), episodico persistente o cronico (se persiste per più di 6 mesi) (Merskey et al., 1994). Un altro aspetto del tempo è la cronobiologia, cioè se il dolore si presenta, o riacutizza, in un determinato tempo della giornata, della settimana, del mese (ciclo mestruale), della stagione o della vita (prenatale, neonatale, bambino, adolescente, adulto, vecchiaia). Il dolore può essere anche classificato in base alla sua localizzazione corporea (viscerale, muscolo-scheletrico o superficiale) e alla sua specifica localizzazione anatomica, come braccia, gambe, spalle, petto, cuore, polmoni, ecc.. Inoltre conoscere la presunta patofisiologia che lo produce è importante per distinguere se generato da eventi traumatici, infiammatori, degenerativi o ischemici e, soprattutto, se coinvolge il sistema nervoso o i tessuti periferici (Bonica, 1979; Jañig et al., 2006; Wolf et al., 2007; Boulton, 2007),

Il dolore neuropatico viene anche definito come “un dolore iniziato o causato da una malattia o danno a carico del sistema nervoso periferico o centrale e da una disfunzione del sistema nervoso” (IASP; Chong et al., 2001). Può essere associato o meno a deficit sensitivi, allodinia (dolore suscitato da uno stimolo che normalmente non è in grado di provocare una sensazione dolorosa (IASP, 1994)), o iperalgesia (eccessiva risposta ad uno stimolo che è normalmente doloroso). A seconda della sede, il dolore può essere definito: *i*) nocicettivo, quando insorge in un tessuto in seguito ad un trauma o ad un insulto termico o chimico. A seconda delle strutture sede della lesione, il dolore nocicettivo viene suddiviso in dolore somatico (quando interessa cute, sottocute, e muscoli) o viscerale (da

distensione, compressione e invasione dei visceri); *ii*) non nocicettivo, quando non deriva dall'azione diretta dei nocicettori. Se ne riconoscono due forme: dolore neuropatico, causato da una disfunzione organica periferica o centrale del sistema nervoso; dolore psicogeno quando ha un'origine psicologica; *iii*) misto, quando è coinvolta sia la componente nocicettiva che neuropatica.

La sensazione dolorosa è mediata da un sistema che si estende dalla periferia, tramite le terminazioni di neuroni sensoriali (nocicettori), fino alla corteccia cerebrale passando attraverso le corna dorsali del midollo spinale. Tra la sede del danno tissutale e la percezione del dolore intesa come esperienza sensoriale si interpongono una serie di eventi fisiologici che definiscono la cosiddetta nocicezione.

## 1.3.2. VIE NERVOSE DEL DOLORE

La conduzione nervosa è mediata da proteine transmembrana distribuite lungo l'assone che intervengono direttamente sulla trasmissione dell'impulso nervoso. I canali del sodio voltaggio dipendenti sono responsabili della propagazione del potenziale d'azione; i canali veloci e lenti del potassio sono invece responsabili di numerose attività elettrofisiologiche secondarie, che comportano il recupero della condizione dello stato di riposo dopo il passaggio dell'impulso nervoso (Garbay et al., 2000).

Per gli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  viene stabilito, ad opera di una pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, un gradiente di concentrazione attraverso la membrana plasmatica; la concentrazione intracellulare dello ione  $\text{K}^+$  è maggiore di quella extracellulare, favorendo così la diffusione del  $\text{K}^+$  verso l'esterno della cellula (Karp, 2004). Gli ioni  $\text{Na}^+$ , invece, seguono un gradiente in direzione opposta, in quanto la loro concentrazione all'esterno della cellula è maggiore di quella interna e questa differenza favorisce la diffusione degli ioni  $\text{Na}^+$  verso l'ambiente intracellulare (Karp, 2004).

Quando tra il versante citoplasmatico ed extracellulare della membrana plasmatica vi è una differenza di concentrazione di ioni negativi e positivi, ne risulta un voltaggio o differenza di potenziale elettrico, che mediamente nei neuroni si aggira sui 70 millivolt (mV). La maggior parte dei canali ionici aperti nella membrana plasmatica di una cellula nervosa a riposo è selettiva per il  $\text{K}^+$  e il suo flusso in uscita provoca un eccesso di cariche negative sul lato citoplasmatico della membrana: il valore del potenziale di membrana è quindi

preceduto da un segno negativo (-70 mV) (Karp, 2004).

In seguito ad uno stimolo, l'assone risponde aprendo i canali per il sodio, favorendo l'ingresso di un piccolo numero di ioni all'interno della cellula (Karp, 2004). Questo movimento di cariche positive verso l'interno riduce il potenziale di riposo rendendolo meno negativo e provocando una diminuzione della polarità tra le due facce della membrana (depolarizzazione). Il cambiamento del voltaggio provoca l'apertura dei canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio dipendenti e gli ioni sodio diffondono liberamente all'interno della cellula. Il potenziale di membrana si inverte per breve tempo raggiungendo un valore di 40 mV, che approssima il potenziale di equilibrio di questo ione. Dopo circa un millisecondo, i canali del sodio si richiudono spontaneamente, bloccando un'ulteriore entrata degli ioni. Simultaneamente, il cambiamento del potenziale di membrana causato dall'influsso di  $\text{Na}^+$  apre i canali voltaggio dipendenti del  $\text{K}^+$ ; ne consegue che gli ioni potassio si riversano fuori dalla cellula seguendo il loro gradiente di concentrazione. In questo modo il potenziale viene riportato ad un valore negativo di circa -80 mV, che approssima il potenziale di equilibrio di questo ione (Karp, 2004). Il potenziale di membrana largamente negativo provoca la chiusura dei canali del  $\text{K}^+$  voltaggio dipendenti, il che riporta la membrana alla sua condizione di riposo (Karp, 2004).

Viene così introdotto il concetto di potenziale d'azione, che è semplicemente la rappresentazione del potenziale di membrana in un suo dato segmento e in un determinato momento. Lo spostamento ad alta velocità di un potenziale d'azione lungo l'assone viene chiamato conduzione, e rappresenta il flusso di energia elettrica tra due regioni cellulari. La caratteristica fondamentale del potenziale d'azione è che non perde d'intensità a distanza, diversamente dai potenziali graduati (Silverthorn, 2005).

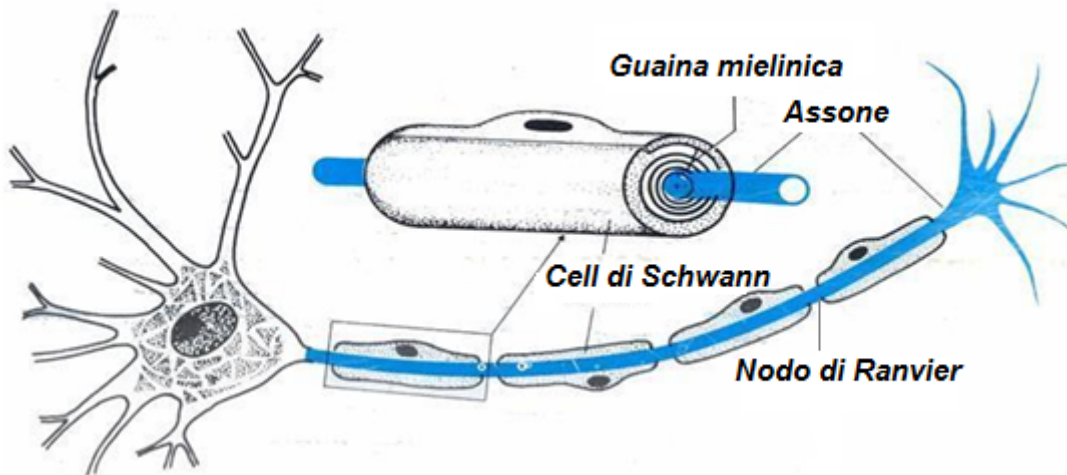
Una componente molto importante per la corretta conduzione nervosa è la guaina mielinica.

La guaina mielinica è una struttura multilamellare avvolta concentricamente intorno all'assone costituita da membrane cellulari e con funzione di isolante elettrico.

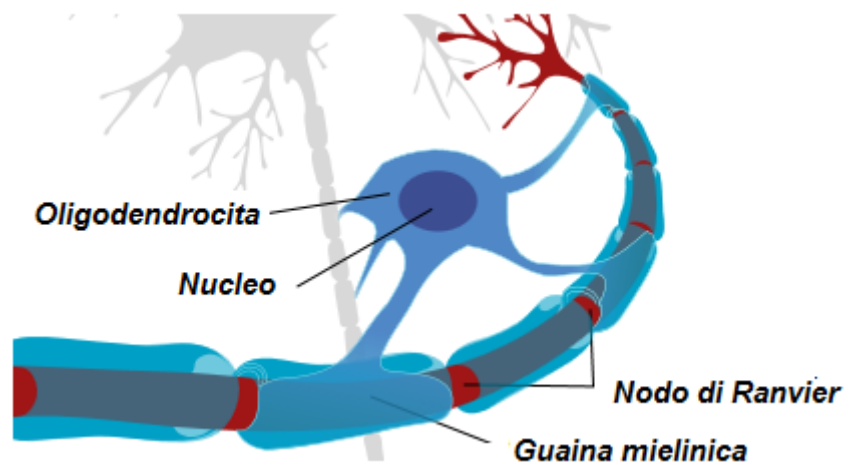
Il ruolo principale della mielina è quello di permettere una trasmissione più veloce dell'impulso nervoso lungo l'assone, prevenendo la dissipazione di cariche elettriche nell'ambiente circostante (Garbay et al., 2000).

Nel SNC e nel SNP la mielina è formata da diverse tipologie cellulari, oligodendrociti e cellule di Schwann rispettivamente (*Figure 5 e 6*); una singola cellula di oligodendrocita

può prendere contatto con diversi assoni, mentre una cellula di Schwann si associa ad un solo assone, ricoprendone circa 1 - 1,5 mm. Di conseguenza un assone può essere avvolto anche da 500 cellule di Schwann (Silverthorn, 2005).



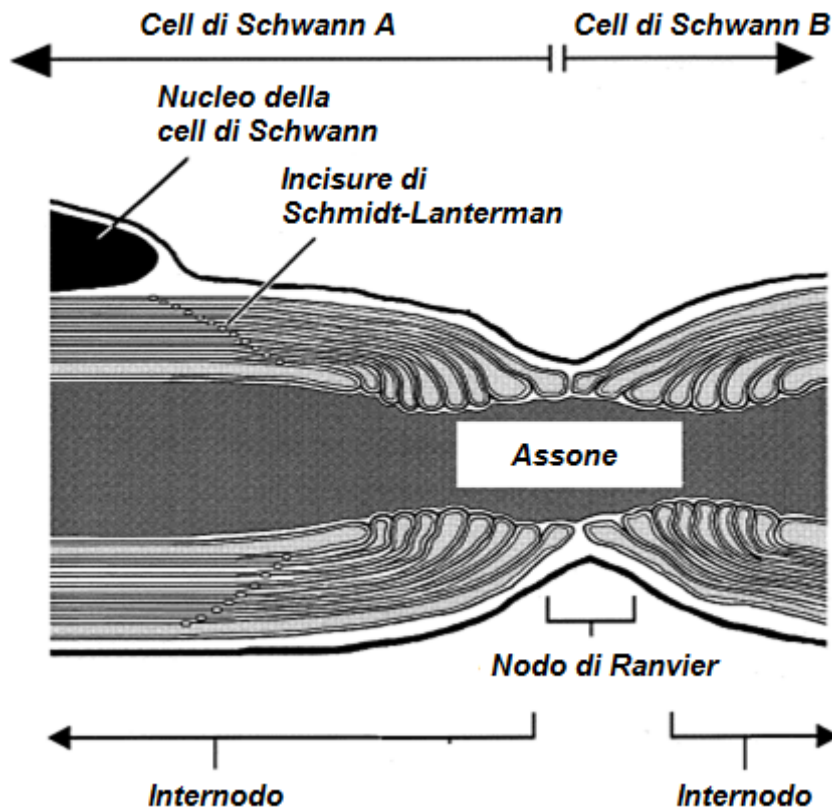
**Figura 5:** guaina mielinica di una fibra nervosa del SNP.



**Figura 6:** guaina mielinica di una fibra nervosa del SNC.

Elevate quantità di materiale non conduttivo vengono così deposte attorno ai segmenti dell'assone, conferendo isolamento elettrico al tratto interessato. L'accesso all'interno di tale struttura è garantito da profondi canali citoplasmatici che attraversano a spirale la guaina, chiamati incisure di Schmidt-Lanterman. Queste incisure sono necessarie per il nutrimento del neurone, altrimenti isolato dall'ambiente esterno.

La regione compatta di ogni segmento mielinico localizzata tra due nodi di Ranvier (regioni assonali non mielinizzate) è chiamata internodo (*Figura 7*). La componente gliale di ogni nodo di Ranvier è formata dalle porzioni non compatte di due cellule mielinizzanti adiacenti.



*Figura 7: struttura della guaina mielinica nel SNC.*

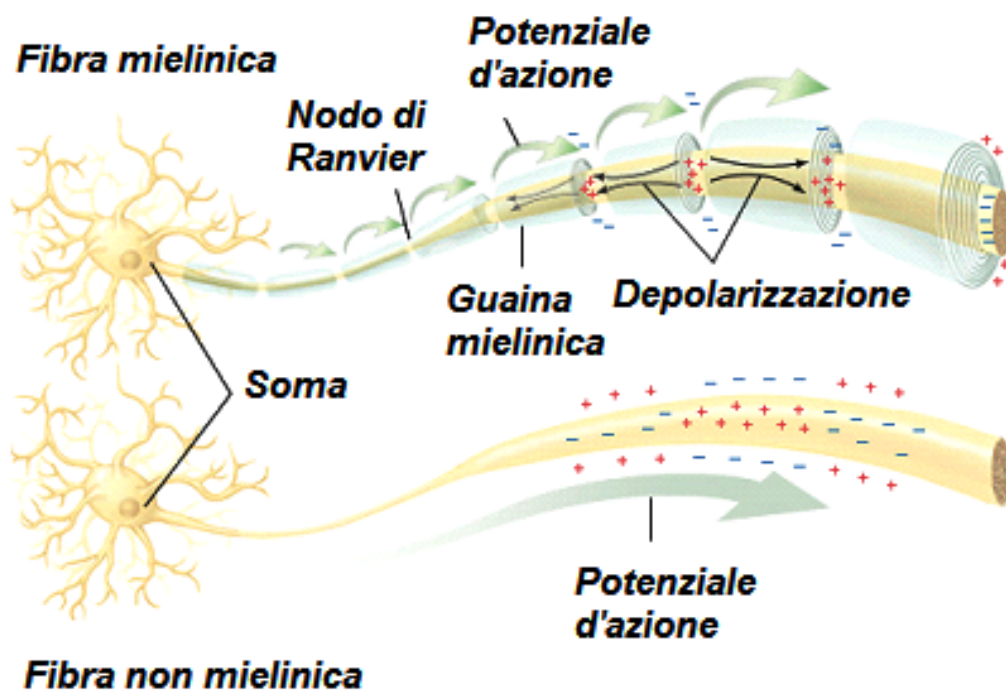
I canali del sodio voltaggio dipendenti ed i canali veloci e lenti del potassio sono concentrati a livello dei nodi di Ranvier. La guaina mielinica, attraverso la sua resistenza elettrica e la sua bassa capacitanza, permette la depolarizzazione della membrana assonale internodale con un consumo energetico minimo. Inoltre i canali del sodio vengono attivati dalla depolarizzazione della membrana assonale, a sua volta indotta dall'arrivo di un'onda di ioni sodio carichi positivamente; si ha così il massivo influsso di ulteriori ioni sodio nell'assone, con l'origine di una nuova onda di depolarizzazione. Quest'ultima, seguendo il gradiente di concentrazione del sodio, viene passivamente trasmessa lungo il segmento internodale al successivo nodo di Ranvier, dove viene generato un nuovo potenziale d'azione. Grazie alla disposizione segmentata della mielina, il potenziale d'azione procede



saltando da un nodo di Ranvier all'altro, da cui il termine "conduzione saltatoria" (Ritchie, 1984).

Il salto di depolarizzazione non solo permette un aumento della velocità di conduzione dell'impulso nervoso, ma anche un risparmio di energia e di spazio; un assone demielinizzato dovrebbe avere infatti un diametro 40 volte maggiore di quello di un assone mielinizzato e dovrebbe consumare 5000 volte più energia per poter conseguire una conduzione equivalente in termini di velocità.

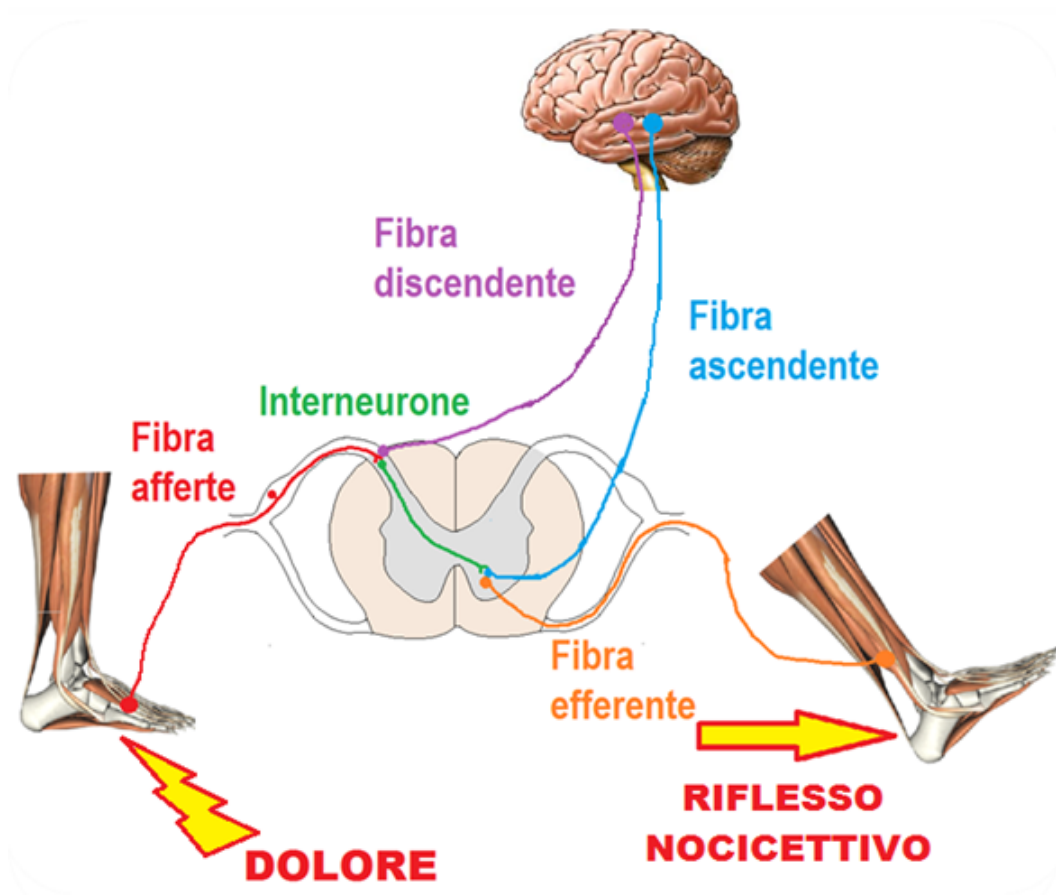
Lo stesso processo di conduzione è presente anche nelle fibre non mielinizzate, in cui la minore densità dei canali del sodio determina un'inferiore ampiezza dell'onda di depolarizzazione, dando luogo ad una più lenta velocità di trasmissione dell'impulso nervoso lungo l'assone (Figura 8).



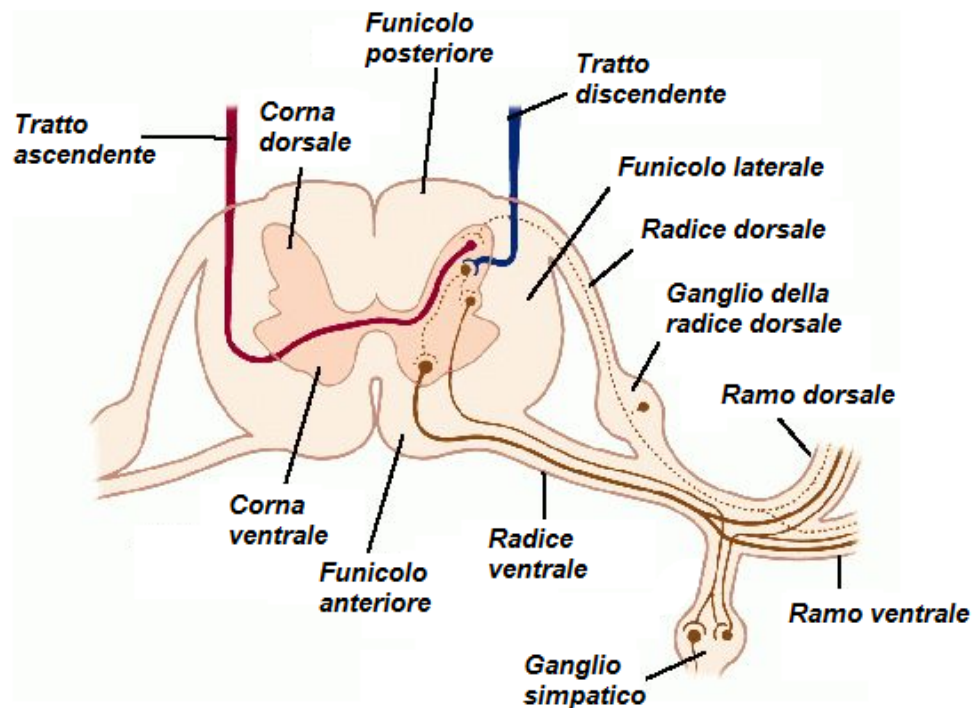
**Figura 8:** trasmissione dell'impulso nervoso in una fibra mielinica e in una fibra non mielinica.

Il ruolo isolante della guaina mielinica è cruciale per il corretto ed efficiente funzionamento del sistema nervoso, come è evidente dalle conseguenze derivanti dalla perdita di mielina nel sistema nervoso periferico in condizioni patologiche come il diabete mellito, la sindrome di Guillain-Barrè e la Charcot-Marie-Tooth, e nel sistema nervoso centrale in malattie quali la sclerosi multipla (Garbay et al., 2000).

Alla base dell' insorgenza e propagazione della sensazione dolorifica vi è un complesso circuito neuronale che ci permette di percepire lo stimolo dolorifico (Figura 9, 10).

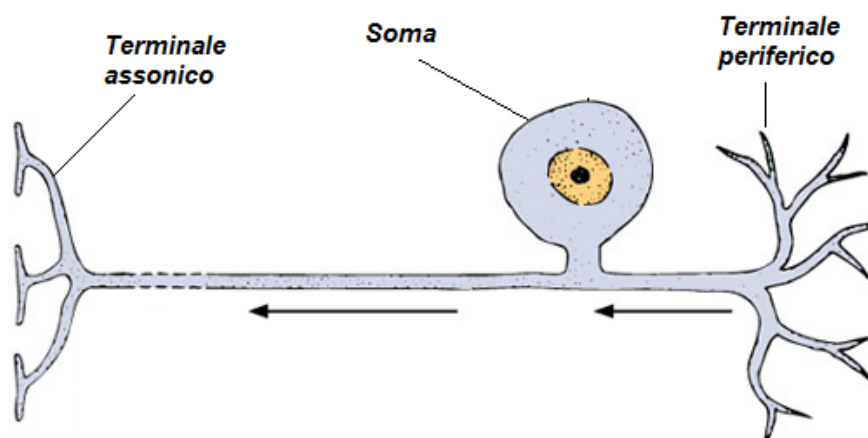


*Figura 9: vie nervose del dolore.*



*Figura 10: sezione di midollo spinale e rappresentazione delle vie nervose del dolore.*

I neuroni sensoriali hanno una struttura particolare chiamata pseudo-unipolare (Figura 11): dal corpo centrale, risiedente nei DRG si dirama un unico assone, il quale, poco lontano dal soma, si biforca in due braccia, una diretta alla periferia (afferenza primaria), l'altra alle corna dorsali del midollo spinale.



*Figura 11: neurone sensitivo pseudounipolare.*

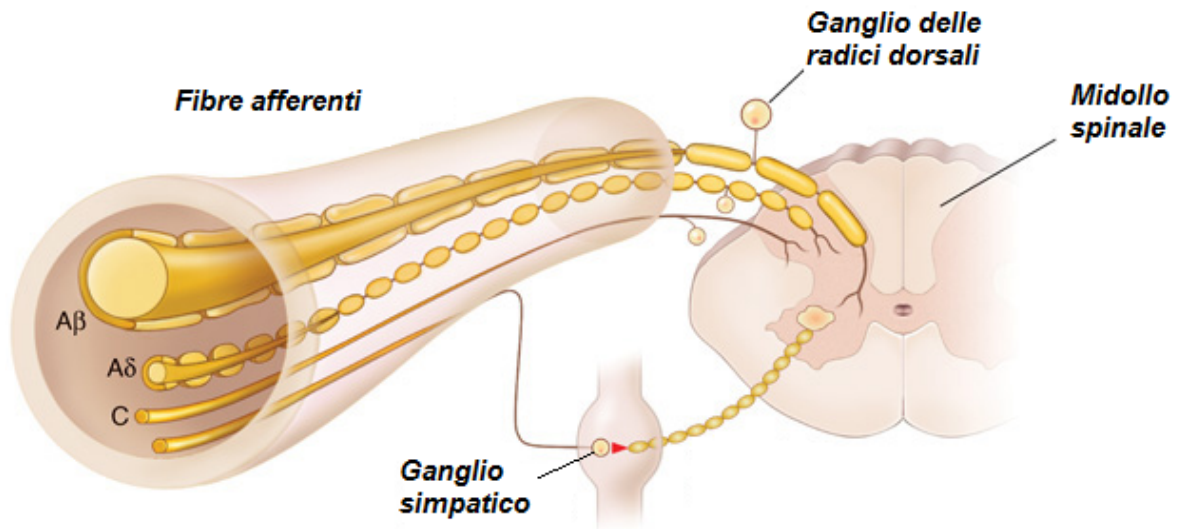
Le afferenze sensoriali primarie innervano la pelle ed i tessuti più profondi del nostro corpo e rispondono a specifici tipi di stimoli, dolorosi o non dolorosi. Esse presentano infatti un recettore sensoriale, che nel caso delle fibre dolorifiche prende il nome di nocicettore. Il compito dei nocicettori è quello di rilevare uno stimolo e di trasformarlo in energia elettrica. Quando l'energia elettrica raggiunge il valore soglia, si genera un potenziale d'azione, che viaggia lungo la fibra afferente verso il SNC, permettendo così la percezione del dolore. I nocicettori rispondono a diversi tipi di stimoli: termici (termocettori), meccanici (meccanocettori), chimici (chemiocettori). Inoltre esistono nocicettori in grado di rilevare diverse tipologie di impulsi (nocicettori polimodali) ed altri che si attivano solo in seguito all'infiammazione del tessuto innervato (nocicettori silenti). Le fibre assionali dei nocicettori possono essere classificate a seconda del loro *target* periferico (afferenze cutanee, viscerali, articolari, muscolari), della velocità di conduzione dell'impulso nervoso (dipendente dalla mielinizzazione e dallo spessore della fibra), delle proprietà responsive (tipo di stimolo percepito e intensità dello stimolo necessaria all'attivazione) e del mediatore neurochimico sfruttato (peptidergico come la SP, o non peptidergico come il glutammato).

Esistono 3 tipi di fibre nocicettive: A beta ( $A\beta$ ), A delta ( $A\delta$ ) e C (Figura 12).

Le  $A\beta$  sono spesse fibre mielinizzate ad alta velocità di conduzione e a bassa soglia, che rispondono a stimoli meccanici.

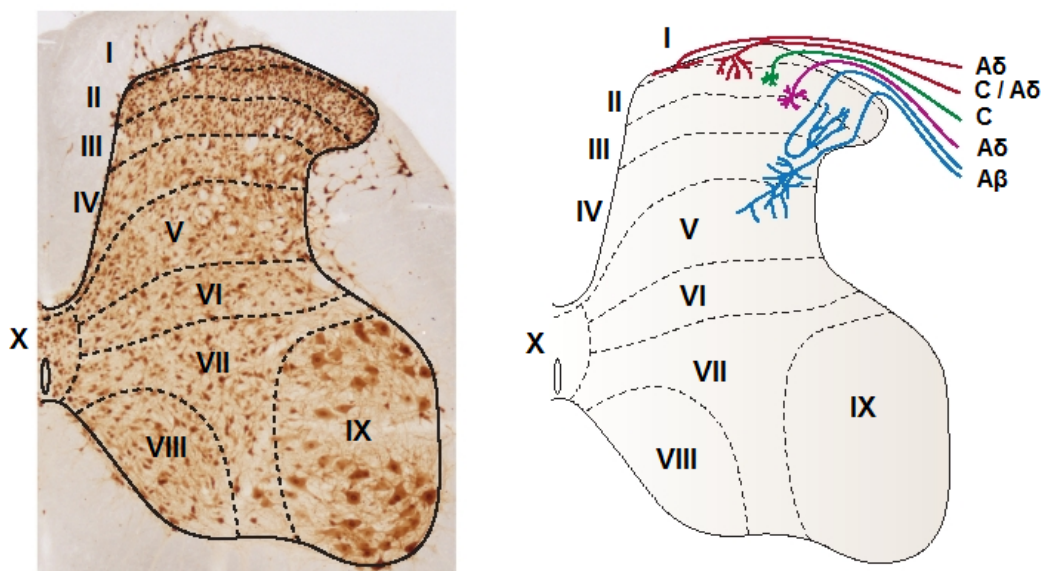
Le  $A\delta$  sono fibre sottili poco mielinizzate a moderata velocità di conduzione e ad alta soglia, che rispondono a stimoli termici e pressori.

Le C sono fibre sottili non mielinizzate a lenta velocità di conduzione e ad alta soglia, che rispondono a stimoli termici e pressori.



**Figura 12:** tipologia delle fibre afferenti nocicettive.

La diversa velocità di conduzione dell'impulso nervoso è responsabile di due fasi temporalmente distinte della percezione nervosa: la prima, acuta e intensa, mediata dalle fibre veloci A $\beta$  e A $\delta$ , la seconda, prolungata e meno intensa, mediata dalle fibre lente C. Tutte le fibre afferenti sensoriali primarie sopra citate terminano nelle corna dorsali del midollo spinale (lamine I-V), punto nevralgico della trasmissione del dolore (Figura 13).



**Figura 13:** terminazione delle fibre sensoriali afferenti primarie nelle corna dorsali del midollo spinale.

All'interno delle corna dorsali del midollo spinale la maggior parte delle fibre afferenti primarie contrae sinapsi con un interneurone, il cui assone rimane interamente nel midollo spinale e arborizza al suo interno. Gli interneuroni compongono la quasi totalità della massa delle lamine I, II e III del midollo spinale e si dividono in inibitori ed eccitatori. Gli inibitori sfruttano come neurotrasmettitore l'acido gamma-aminobutirrico (GABA) e/o la glicina, mentre gli eccitatori il glutammato. Oltre a questi mediatori, studi immunocitochimici hanno permesso di evidenziare la presenza di numerosi altri neurotrasmettitori in una o entrambe le tipologie di interneuroni come la somatostatina, la SP, il neuropeptide Y, la galanina, l'encefalina e la dinorfina (Todd et al., 1993).

Nonostante gli interneuroni siano il maggior *target* postsinaptico delle afferenze primarie, esse possono anche connettersi direttamente a neuroni di proiezione.

I neuroni di proiezione presentano assoni che partono dal midollo spinale e terminano in diverse aree cerebrali, formando un insieme di vie neuronali coinvolte nella percezione del dolore. Attraverso lo studio retrogrado e anterogrado di queste vie (Hylden et al., 1989; Lima et al., 1988; Spike et al., 2003; Bernard et al., 1995; Gauriau et al., 2004), è stato possibile identificare i principali *target* anatomici di questi neuroni:

- Medulla caudale ventrolaterale, responsabile dell'integrazione delle risposte nocicettive e cardiovascolari.
- Nuclei del tratto solitario, responsabili della tachicardia riflessa legata ad uno stimolo dolorifico.
- Area parabrachiale laterale, collegata ad amigdala ed ipotalamo e quindi coinvolta nelle risposte emozionali ed autonome legate al dolore.
- Materia grigia periacqueduttale, coinvolta nello sviluppo delle risposte messe in atto per far fronte a stimoli stressori.
- Nuclei talamici, coinvolti negli aspetti sensoriali/discriminativi e affettivi/emotivi del dolore.

Studi di immunoreattività hanno evidenziato nei neuroni di proiezione la presenza del recettore della neurochinina 1 (NK1R), *target* principale della SP (Figura 14) e del recettore AMPA (acido  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazol propionico), *target* principale del glutammato (Spike et al., 2003; Todd et al., 2000).

Oltre a queste vie ascendenti, esistono anche vie discendenti coinvolte nella sensazione dolorifica, le quali partono da un'area cerebrale e raggiungono le corna dorsali del midollo

spinale.

Due vie monoaminergiche discendenti arrivano al midollo spinale, una serotoninergica, originante dal nucleo magno del rafe, ed una noradrenergica, originante dal *locus coeruleus*. Un'ulteriore via discendente è rappresentata da quella gabaergica che parte dalla medulla rostrale ventromediale.

Questi circuiti neuronali hanno un effetto inibitorio verso il dolore acuto, poiché bloccano la secrezione dei neurotrasmettitori eccitatori (glutammato e SP) dai terminali sinaptici delle fibre afferenti, impedendo la trasmissione dell'impulso dolorifico.

Infine l'informazione nocicettiva può convergere, attraverso gli interneuroni, anche alle corna ventrali del midollo spinale e generare così il riflesso nocicettivo, responsabile delle risposte più rapide dell'organismo per limitare il danno in atto o potenziale.

### **1.3.3. PATOGENESI DEL DOLORE NEUROPATICO**

I danni neuronali provocati dalla neuropatia instaurano un processo patologico che porta alla manifestazione della sensazione dolorifica.

Importanti alterazioni possono colpire sia il SNC che il SNP e possono essere di tipo funzionale, chimico e/o anatomico senza il coinvolgimento dei nocicettori.

Una comoda classificazione del dolore neuropatico si basa sulla presunta eziologia (tabella 1 e 2) e sui meccanismi patofisiologici alla base della sua insorgenza (tabella 3), anche se tutt'oggi non è ancora possibile correlare i segni e i sintomi alla patofisiologia del dolore (Scadding GW., 2003).

Le proprietà patofisiologiche responsabili del dolore neuropatico possono essere classificate principalmente in 4 gruppi: generazione ectopica dell'impulso nelle fibre afferenti primarie danneggiate, sensibilizzazione centrale, disinibizione (fallimento o riduzione dei normali meccanismi inibitori) e plasticità neuronale (cambiamenti degenerativi e rigenerativi associati con un'alterata connettività) (tabella 3).

**Cause periferiche del dolore neuropatico**

Mononeuropatie e mononeuropatie multiple	Trauma: compressione, transezione, post-toracotomia, cicatrici dolenti. Mononeuropatia e amitrofia diabetica Amitrofia neuralgica Malattie del tessuto connettivo Plessopatia maligna o da radiazioni Piede da trincea Borreliosi
Polineuropatie:	
• Metaboliche/Nutrizionali	Diabetica, Alcolica, Pellagra, Beriberi, Amiloidea, Sindrome del piedi bruciante
• Tossiche/da farmaco	Isioniazide, Cisplatino, Vincristina, Nitrofurantoina, Disulfiram, Tallio, Arsenico, Clioquinolo
• Infettive	HIV, polineuropatia infiammatoria acuta
• Ereditarie	Malattia di Fabry, neuropatia sensoriale ereditaria dominante/HSAN
• Maligne	Mieloma carcinomatoso
• Neuropatia a piccole fibre idiopatica	

**Tabella 1:** cause alla base dell'insorgenza del dolore neuropatico nel SNP



### **Cause centrali del dolore neuropatico**

Radici spinali/gangli delle radici dorsali	Ernia del disco, aracnoidite, nevralgia post erpetica, nevralgia del trigemino, avulsione della radice, rizotomia chirurgica, tumori.
Midollo spinale	Compressione, Siringomelia e tumori intrinseci, sclerosi multipla, vascolare: infarto, emorragia, alformazione aterovenosa (AVM), disrafismo spinale, mancanza di vitamina B12, HIV, sifilide, cordotomia antero-laterale
Tronco cerebrale	Sindrome midollare laterale, tumori, sclerosi multipla, tubercoloma
Talamo	Infarto, emorragia, tumori, lesioni chirurgiche
Area sub-corticale e corticale	Infarto, trauma, tumore, malformazione aterovenosa (AVM)

**Tabella 2:** cause alla base dell'insorgenza del dolore neuropatico nel SNC

### **Patofisiologia del dolore neuropatico**

Nervi periferici	Generazione ectopica dell'impulso nervoso–EIG (per anormale espressione del canale del Sodio) <ul style="list-style-type: none"><li>• Aumentata da: stimolazione meccanica, Adrenalina/Noradrenalina, ischemia, riscaldamento delle fibre mielinizzate, raffreddamento delle fibre non-mielinizzate</li><li>• Diminuita da: anestesia locale, bloccanti del recettore alfa, bloccanti del trasporto assonale, corticosteroidi, carbamazepina, fenitoina</li></ul>
------------------	---

Gangli delle radici dorsali	EIG
Radici dei nervi spinali	EIG
Sistema nervoso centrale	Sensitizzazione centrale <ul style="list-style-type: none"><li>• Wind-up dei neuroni delle corna dorsali mediato dai recettori NMDA</li><li>• Sintesi delle prostaglandine e dell'ossido nitrico nei neuroni delle corna dorsali</li></ul>
	Disinibizione <ul style="list-style-type: none"><li>• Deafferenzazione delle cellule delle corna dorsali</li><li>• Riduzione della inibizione spinale</li><li>• Riduzione della inibizione nella corteccia insulare</li></ul>
	Plasticità <ul style="list-style-type: none"><li>• Eccitotossicità dei neurotrasmettitori con conseguente morte cellulare</li><li>• Iper-regolazione dei recettori post-sinaptici</li></ul>
	Alterata connettività <ul style="list-style-type: none"><li>• Rigenerazione inappropriata (espressione delle proteine associate alla crescita)</li></ul>
	Effetti sul midollo rostrale ventromediale <ul style="list-style-type: none"><li>• Alterata fisiologia a livello rostrale in seguito a lesioni caudali.</li></ul>

**Tabella 3:** cause patofisiologiche del dolore neuropatico

## 1.3.4 MECCANISMI ALLA BASE DELL'INSORGENZA DEL DOLORE NEUROPATICO

I danni neuronali provocati dalla neuropatia instaurano un processo patologico che porta alla manifestazione della sensazione dolorifica.

Importanti alterazioni possono colpire sia il sistema nervoso centrale che periferico e possono essere di tipo funzionale, chimico e/o anatomico.

### **Dolore neuropatico e sistema nervoso periferico**

Nel SNP la neuropatia altera soprattutto la normale funzionalità delle fibre A $\delta$  e C, causando le seguenti anomalie:

- nelle fibre danneggiate si genera una risposta infiammatoria che crea un'infiltrazione locale (*"inflammatory soup"*) composta da molteplici elementi proinfiammatori: istamina, bradichinina, serotonina, adenosina trifosfato (ATP), prostaglandine, leucotrieni, citochine (IL-1  $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) e NGF (Millan et al., 1999; Willis et al., 1997; Sommer et al., 2004; Ito et al., 2001., Snider et al., 1998). L'infiltrazione infiammatoria causa la sensibilizzazione dei nocicettori (diminuzione della soglia di stimolazione e risposte allo stimolo più lunghe) e la generazione di impulsi spontanei;
- i danni alla membrana assonale portano all'espressione di nuovi canali ionici di membrana, tra cui i canali del sodio. I canali del sodio formati in risposta all'insulto patologico sono aberranti per diverse proprietà funzionali. Molti di essi risultano infatti essere resistenti alla tetrodotossina (tossina del pesce palla bloccante i canali del sodio) ed hanno la capacità di generare impulsi ectopici che provocano dolore e parestesia (Hirade et al., 1999; Devor et al., 1994);
- un'anomala connessione elettrica non sinaptica può generarsi tra fibre nervose di diverso tipo (A $\beta$  - C) della zona danneggiata, rendendo così possibile il trasferimento di impulsi da un assone all'altro (*"ephatic transmission"*) (Seltzer et al., 1979);
- le fibre nervose intatte adiacenti alle afferenze danneggiate possono creare nuove connessioni nella zona di tessuto denervata. Nei soggetti affetti da neuropatia diabetica

si è infatti notato un aumento dell'attività simpatica e dei livelli di noradrenalina circolante (Scadding et al., 1981).

Ciò è dovuto alla formazione di nuove terminazioni nervose da parte delle fibre adrenergiche (McLachlan et al., 1993), che causa una sensibilizzazione periferica (ipereccitabilità delle afferenze primarie).

## **Dolore neuropatico e sistema nervoso centrale**

La sensibilizzazione periferica, caratterizzata dall'abbassamento della soglia di attivazione, dall'aumento della risposta ad uno stimolo e da un'anomala attività spontanea delle fibre afferenti (Baron et al., 2000; Woolf et al., 1992), può a sua volta generare una sensibilizzazione del SNC (sensibilizzazione centrale).

La sensibilizzazione centrale riguarda soprattutto le sinapsi eccitatorie delle corna dorsali del midollo spinale dove agisce il glutammato, principale neurotrasmettitore eccitatorio (Svendsen et al., 1998; Stanfa and Dickenson, 1999) (Figura 14).

A livello presinaptico il glutammato viene accumulato all'interno di vescicole e successivamente rilasciato per esocitosi grazie all'azione di specifiche famiglie di proteine, le sinapsine e le syntaxine. Le prime sono deputate all'ancoraggio delle vescicole di secrezione al citoscheletro che si distaccano da esso tramite la fosforilazione del residuo serinico della sinapsina (Bogen et al., 2006); le seconde ancorano le vescicole alle zone attive e ne facilitano la fusione. Studi condotti in modelli animali hanno dimostrato che danni neuronali al midollo spinale aumentano l'espressione genica di sinapsina, indicando il suo coinvolgimento nel rimodellamento sinaptico (Lau et al., 2011).

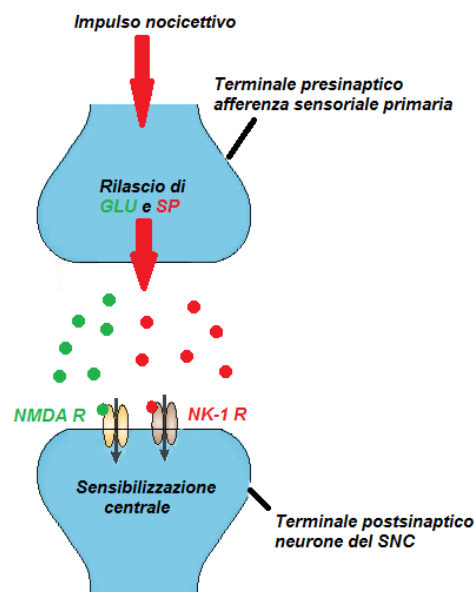
Il glutammato è un aminoacido molto affine al recettore postsinaptico NMDA, un canale ionico formato da tre subunità (GLUNR1, NR2 e NR3) che, una volta attivato, permette l'ingresso di sodio e di calcio nella cellula, depolarizzando la membrana cellulare e generando così un impulso elettrico (trasmissione sinaptica eccitatoria).

A livello postsinaptico, i recettori del glutammato sono concentrati in una struttura definita postsynaptic density (PSD), dove sono presenti anche molecole di trasduzione del segnale e proteine strutturali. Tra queste la più importante è la proteina della densità post-sinaptica 95 (PSD-95), una proteina citoscheletrica che ancora i recettori NMDA, soprattutto la subunità NR2 (Bard and Groc, 2011), alla membrana postsinaptica, regolandone l'attività (Lau and Zukin, 2007).

La struttura e la composizione della PSD può subire dei cambiamenti in base a specifiche attività neuronali o sensoriali (come i processi di apprendimento e di sviluppo della memoria). I neuroni, quindi, cambiano la morfologia delle connessioni sinaptiche e ne creano di nuove attraverso cambiamenti nella composizione molecolare delle sinapsi e nelle modificazioni chimiche delle proteine sinaptiche (plasticità sinaptica) (Sheng and Hoogenraad, 2007).

Nella neuropatia dolorosa l'aumentata eccitabilità delle fibre afferenti comporta un maggiore rilascio di neurotrasmettitori. In particolare l'aumento di glutammato a livello sinaptico comporta un'attivazione continua e prolungata dei recettori NMDA presenti sugli interneuroni del midollo spinale (potenziale a lungo termine), causando iperalgesia e abbassamento della soglia del dolore (Dickenson et al., 1997; Baranauskas and Nistri, 1998).

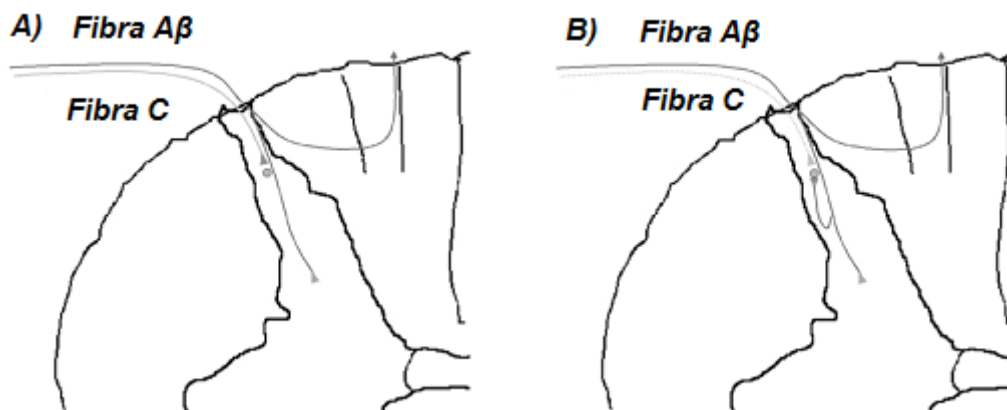
Più specificatamente, l'iperalgesia sembra essere correlata ad un aumento della fosforilazione attivante delle subunità dei recettori NMDA (Daulhac et al., 2011). Le più importanti chinasi che si occupano di queste regolazioni sono la PKC e la Src, che fosforilano le subunità GluN1, GluN2A e GluN2B (Viviani et al., 2003). In alcuni modelli animali di PDN si è notato come l'aumento dell'espressione della subunità GluN1 fosforilata (pGluN1) nel midollo spinale di ratto sia correlata con l'instaurarsi di sintomi dolorosi (Guo et al., 2004; Daulhac et al., 2011).



**Figura 14:** sensibilizzazione centrale.

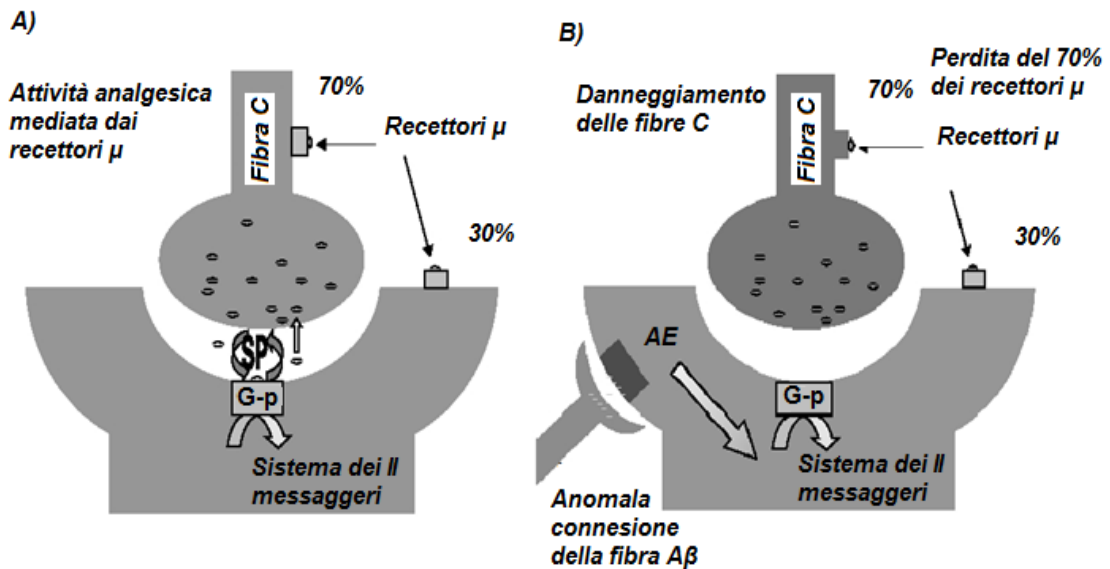
L'ipereccitabilità neurale è dovuta non solo ad una aumentata attività eccitatoria ma anche alla diminuzione dell'attività degli interneuroni inibitori e delle vie discendenti adrenergiche e serotoninergiche. In particolare nei pazienti affetti da dolore neuropatico si è registrata una diminuzione del tono GABAergico e glicinergico negli interneuroni della corna dorsali del midollo spinale (Bhisitkul et al., 1990; Woolf et al., 2004).

Anche le fibre C sono coinvolte nello sviluppo della sensazione dolorifica. Infatti, il loro danneggiamento può causare deafferentazione degli interneuroni del midollo spinale e in risposta a questo fenomeno si ha un rimodellamento delle fibre A $\beta$ , che creano nuove connessioni con gli interneuroni deafferenziati (plasticità neuronale) (Woolf et al., 1992; Woolf et al., 1995). La stimolazione delle fibre A $\beta$ , fisiologicamente associate alla sensibilità meccanocettiva, può quindi causare allodinia meccanica; un semplice tocco può così generare dolore (Figura 15);



**Figura 15:** A) Terminazione normale delle fibre A $\beta$  e C nelle corna dorsali del midollo spinale. B) Riarrangiamento delle terminazioni nervose in seguito alla degenerazione delle fibre C. Le fibre A $\beta$  formano sinapsi con le fibre C.

Oltre all'allodinia meccanica, la degenerazione delle fibre afferenti C può causare perdita della responsività agli oppioidi. A livello spinale, infatti, la maggior parte dei recettori  $\mu$  per gli oppioidi si trova sul terminale presinaptico delle fibre C. La perdita di queste afferenze comporta dunque la mancata risposta analgesica associata agli oppioidi e l'inefficacia di un importante approccio farmacologico al dolore neuropatico (Figura 16) (Dickenson et al., 1994);



**Figura 16:** A) Situazione fisiologica del rapporto tra fibre C e recettori  $\mu$ . B) Perdita della responsività analgesica agli oppioidi in seguito al danneggiamento delle fibre C e alla loro degenerazione. Le connessioni anomale delle fibre  $A\beta$  con le postsinapsi rilasciano amminoacidi eccitatori (AE) con effetto stimolatorio. (G-p: proteina G).

se la stimolazione dolorifica diventa persistente, come nel caso di dolore cronico, possono esserci alterazioni anche nell'espressione genica. Nel SNC può infatti variare la regolazione della sintesi proteica, con alterazioni fenotipiche e/o morfologiche di carattere patologico. Nei casi di dolore neuropatico cronico ad esempio si nota un aumento dei livelli di SP e di dinorfina (Woolf et al., 1999; Draisci et al., 1991);

# 1.4 NEUROPATIA DIABETICA DOLOROSA

Il dolore è uno dei sintomi che più spesso caratterizzano la ND, a tal punto che la PDN è stata riconosciuta come una sindrome specifica di ND.

L'epidemiologia della PDN non è ancora nota con chiarezza, dato che storicamente gli studi epidemiologici sulla ND non fanno differenza tra i pazienti che manifestano o meno sintomatologia dolorosa, ma considerano il dolore come uno dei criteri di inclusione.

In generale, in letteratura, la prevalenza della PDN varia dal 10% al 20% dei soggetti diabetici, e dal 40% al 50% di quelli affetti da ND (Veves et al., 1993; Galer et al., 2000; Gordois et al., 2003).

Nella PDN il dolore è di tipo neuropatico, sia centrale che periferico, e può manifestarsi in vario modo nei pazienti. I sintomi dipendono infatti dal tipo di fibre nervose interessate (motorie, sensitive, vegetative) e dalla loro localizzazione. In genere il dolore viene percepito come una sensazione di bruciore, di scossa elettrica, di intenso formicolio e può essere moderato o severo. Può anche verificarsi parestesia (insorgenza di una sensazione elementare come formicolio, pizzicore e solletico in assenza di una stimolazione specifica), disestesia (vari stimoli destano reazioni diverse dal normale), allodinia (dolore suscitato da uno stimolo che normalmente non è in grado di provocare una sensazione dolorosa (IASP, 1994)), iperalgesia (eccessiva risposta ad uno stimolo che è normalmente doloroso) e iperpatia (aumentata percezione dolorosa di uno stimolo sensoriale che coinvolge grandi aree del corpo, sino a divenire talvolta generalizzata). Oltre a questi sintomi definiti "positivi", ne esistono altri "negativi", come deficit sensoriali (ipoestesia e ipoalgesia), debolezza muscolare (astenia) e alterazione dei riflessi.

Il dolore è di solito più intenso la notte e viene percepito soprattutto ai piedi e alle gambe, ma può coinvolgere anche mani e braccia.

Anche se in alcuni casi può risolversi completamente o solo in parte (Young et al., 1988; Benbow et al., 1993), il dolore può cronicizzare e persistere per diversi anni (Boulton et al., 1983), compromettendo la qualità di vita dei pazienti in molti aspetti come il sonno, l'umore, l'abilità al lavoro e le relazioni interpersonali (Galer et al., 2000; Vileikyte et al.,



2003).

Classificare clinicamente il dolore risulta difficile, ma è importante al fine della diagnosi e per la scelta di un'adeguata terapia. Non sempre infatti la sintomatologia dolorifica riferita dal paziente diabetico risulta essere dovuta alla PDN, ma ad altri fattori come la deficienza di vitamina B12, l'ipotiroidismo e l'uremia.

Diversi *test* fisici possono evidenziare la presenza di alterazioni sensoriali e di dolore. Ad esempio un esame della sensibilità alle vibrazioni può essere eseguito appoggiando un diapason sull'alluce del paziente e registrando l'inizio e la fine della percezione della vibrazione generata.

La sensibilità pressoria può invece essere giudicata attraverso la stimolazione della pianta del piede con un monofilamento di 10 grammi. In questo *test* viene valutato se il paziente percepisce o meno lo stimolo esercitato attraverso il filamento. Infine la sensibilità al dolore superficiale può essere valutata attraverso l'utilizzo di uno spillo.

Anche gli esami neurofisiologici svolgono un importante ruolo diagnostico, come l'elettromiografia (analisi dell'attività delle fibre muscolari stimulate attraverso un elettrodo aghiforme) e l'elettroencefalografia (analisi della velocità di conduzione delle fibre nervose stimulate da un impulso elettrico).

Indispensabile risulta infine il colloquio con il paziente al fine di comprendere al meglio la sintomatologia e di diagnosticare correttamente la patologia: vari questionari sono stati proposti per la valutazione del dolore neuropatico nei pazienti, come il *McGill Pain Questionnaire*, il *Neuropathic Pain Questionnaire* e il *Pain Diagnostic Questionnaire*.

Per quanto riguarda la terapia, ad oggi non sono ancora stati trovati farmaci in grado di curare la PDN e l'approccio terapeutico generale resta quello di alleviare la sintomatologia dolorifica nel paziente.

A tal scopo, il primo obiettivo è il controllo della glicemia: diversi studi hanno infatti dimostrato che un accurato controllo glicemico non solo sarebbe in grado di bloccare la progressione del dolore neuropatico, ma abbasserebbe anche il rischio di sviluppare la PDN (Amthor et al., 1994; The Diabetes Control and Complication Trial Research Group, 1995; Tesfaye et al., 1996; UK Prospective Diabetes Study Group, 1998).

Oltre all'insulina, i farmaci più utilizzati per il trattamento della PDN sono gli antidepressivi triciclici e di seconda generazione, gli antinfiammatori non steroidei e gli antiepilettici (Gore et al., 2007), sostanze che, purtroppo, non sono del tutto efficaci, sia

per il lungo tempo richiesto per agire, sia per l'insorgenza di effetti collaterali legati proprio all'uso prolungato di questi medicinali, aggravando così la condizione di salute già precaria dei pazienti.

L'obiettivo oggi è dunque quello di trovare farmaci efficaci in grado di agire direttamente all'origine del dolore neuropatico, per poter così curare questa grave e diffusa patologia.

## 1.4.1 NEUROINFIAMMAZIONE

Un aspetto comune riscontrato nel dolore neuropatico è la presenza di infiammazione nel sito di lesione del nervo. L'infiammazione, o flogosi, è un meccanismo di difesa non specifico, innato, che costituisce una risposta protettiva, che segue all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale del danno cellulare o tissutale, nonché avviare il processo riparativo. I processi fisiopatologici che costituiscono la risposta infiammatoria comprendono vasodilatazione e aumento di permeabilità, con conseguente passaggio di liquidi dal letto vascolare al tessuto lesio (edema) ed infiltrazione leucocitaria nell'area di lesione.

Quando la risposta infiammatoria è a carico del SNC o SNP si parla di neuroinfiammazione.

La microglia e gli astrociti sono due tipi cellulari residenti all'interno del SNC che svolgono un ruolo chiave nella organizzazione locale della risposta neuro infiammatoria (Figura 17). La microglia è coinvolta nei processi di sviluppo, mantenimento e riparazione dell'ambiente neuronale. Nel cervello sano queste cellule si trovano in uno stato di quiescenza caratterizzato da una bassa espressione dei recettori di membrana coinvolti in funzioni immunologiche (Hanisch et al., 2007). Sebbene si trovino in questo stato di "riposo", le cellule della microglia monitorano costantemente i cambiamenti che avvengono nell'ambiente circostante e sono pronte ad intervenire per garantire l'integrità tissutale. Quando stimolata, la microglia acquisisce una morfologia ameboide ed esprime una serie di molecole di superficie (Oehmichen et al., 1975; Cho et al., 2006), come MHC, i recettori per le chemochine, CD-14 e TLR-4 (Rock et al., 2004). Questo stato attivato coincide con la produzione di mediatori solubili sia dannosi, come citochine pro-infiammatorie, specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (Sawada et al., 1989; Moss et al., 2001; Viviani et al., 2001; Liu et al., 2002; Tansey et al., 2007), sia non dannosi come citochine anti-infiammatorie e fattori trofici (Morgan et al., 2004; Liao et al., 2005; Muller et al., 2006). La produzione bilanciata di questi fattori contribuisce al recupero della funzione cerebrale.

Le cellule della microglia sono considerate le principali cellule immunitarie residenti nel SNC, tuttavia è importante sottolineare come anche gli astrociti siano cellule immunocompetenti e regolatori chiave dell'infiammazione del SNC al pari delle prime. Gli

astrociti sono le cellule gliali più abbondanti nel SNC e svolgono funzioni essenziali per l'omeostasi cerebrale e neuronale. Come la microglia, gli astrociti si attivano in un processo conosciuto con il termine "astrogliosi", il quale è caratterizzato da alterata espressione genica, dall'aumento dell'espressione di molecole specifiche (proteina acida gliale fibrillare (GFAP) e vimentina), ipertrofia e proliferazione cellulare (Rdet et al., 1997). Gli astrociti attivati rilasciano diverse molecole coinvolte nel processo infiammatorio come citochine, chemochine e fattori di crescita, contribuendo sia ad effetti neuroprotettivi che neurotossici (Farina et al., 2007).

Nella PDN lo stato attivato della microglia e degli astrociti perdura nel tempo continuando a produrre fattori proinfiammatori in grado sia di sostenere l'attivazione gliale stessa sia di sensibilizzare o stimolare direttamente i neuroni. Ciò comporta il mantenimento e l'amplificazione del dolore neuropatico, con conseguente iperalgesia ed allodinia.

Tra le sostanze secrete dalla glia, come detto precedentemente, ruolo fondamentale è svolto dalle citochine (Dinarello et al., 1999), molecole infiammatorie in grado di modulare nei neuroni sia la conduttività e la numerosità dei recettori NMDA e AMPA del glutammato (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2006), sia il rilascio di SP dalle afferenze sensoriali primarie (Linda R. et al., 2003), alterando così l'eccitabilità neuronale (Figura 17). Tra queste un ruolo importante è svolto da:

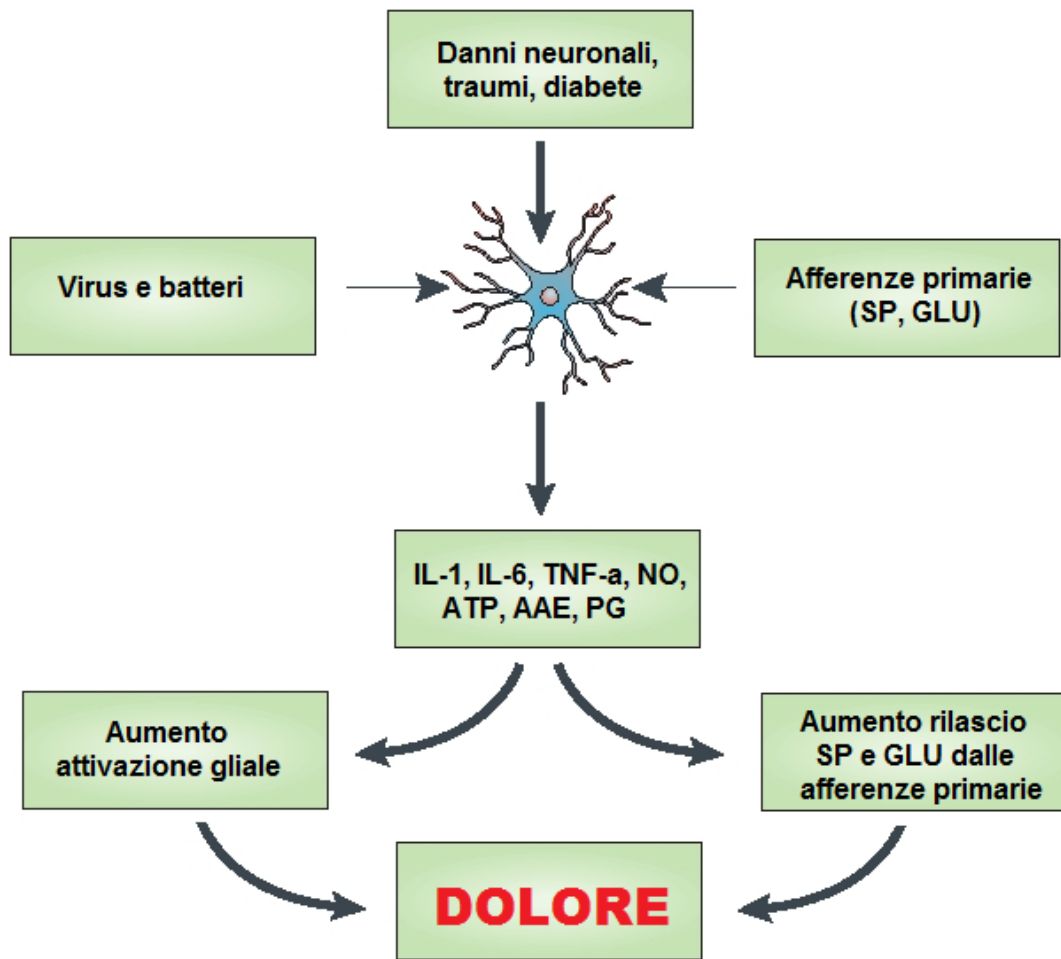
- **Interleuchine:** gruppo di citochine, chiamate così per la loro capacità di comunicare con i leucociti. Esistono oltre 30 isoforme di interleuchine, alcune di queste sono antiinfiammatorie (IL-4 e IL-10), altre pro-infiammatorie (IL-1, IL-6 e IL-8) e sono coinvolte in numerosi meccanismi di dolore neuropatico associato al diabete. Studi sui roditori, nei quali è stata indotta la patologia diabetica con un'iniezione di STZ, hanno rivelato un aumento dei livelli di mRNA dell'IL-6 nei topi diabetici rispetto ai controlli (Bierhaus et al., 2004; Yamakawa et al., 2011);
- **Chemochine:** grande gruppo di proteine a basso peso molecolare la cui funzione principale consiste nell'attivazione e nel reclutamento (chemiotassi) dei leucociti nei siti di flogosi. Numerosi studi sui modelli animali di neuropatia diabetica hanno mostrato un aumento dell'espressione dei recettori delle chemochine CX3CR1 e CCR2 nei tessuti neurali in seguito a danno, dimostrando così il loro coinvolgimento nella trasmissione dolorifica (Vallejo et al., 2010).

- TNF $\alpha$ : citochina pro-infiammatoria coinvolta nei processi nocicettivi di origine neuropatica e infiammatoria, in grado di indurre potenziali d'azione ectopici nei neuroni sensoriali (Sorkin et al., 1997) e risposta nocicettiva di tipo meccanico e termico nei roditori (Wagner and Myers, 1996). Il legame tra TNF $\alpha$  e la nocicezione è confermato dal fatto che la sua espressione aumenta in seguito ad uno stimolo termico o meccanico in un modello di ND (Okamoto et al., 2001).

Per esplorare ulteriormente il ruolo di TNF $\alpha$  nella ND, sono stati effettuati studi su modelli di roditori nei quali è stata indotta la patologia diabetica, mediante un'iniezione di STZ; la somministrazione di TNF $\alpha$  nel nervo sciatico degli animali ha determinato una riduzione della velocità di conduzione nei nervi motori, che è un sintomo molto ricorrente nei pazienti con ND (Satoh et al., 2003).

Diversi ricercatori hanno dimostrato che la somministrazione di citochine proinfiammatorie esogene ha indotto un aumento della nocicezione e della sensibilità neuronale verso stimoli nocicettivi dimostrando l'importante ruolo svolto da queste molecole nella percezione della sensazione dolorifica (Maier et al., 1998; DeLeo et al., 1996; Falchi et al., 2001; Reeve et al., 2000; Tadano et al., 1999). Inoltre, la somministrazione di antagonisti delle citochine si è rivelata efficace nel risolvere o prevenire l'allodinia e l'iperalgia in tutti i modelli animali testati (Watkins et al., 1997; Milligan et al., 2001; Milligan et al., 2003; Switzer et al., 2001).

Risulta dunque evidente il ruolo centrale che la neuroglia svolge nel complesso quadro della patogenesi del dolore neuropatico evocato dal diabete.



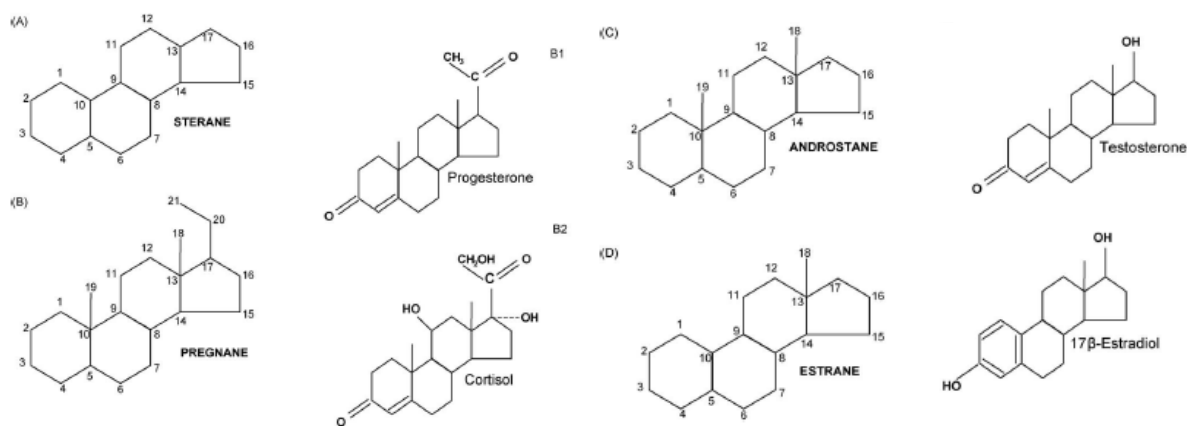
*Figura 17: ruolo della glia nel dolore neuropatico.*

## 1.5 STEROIDI NEUROATTIVI

### 1.5.1 DEFINIZIONE DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI

Gli ormoni steroidei sono una serie di composti di natura lipidica derivanti da un precursore comune, il colesterolo. La loro sintesi avviene prevalentemente a livello degli organi steroideogenici periferici, in particolare nelle gonadi e nelle ghiandole surrenali, mediante l'intervento di diversi enzimi.

Sono chimicamente costituiti dal fondamentale gruppo idrocarburico tetraciclico saturato (1,2-ciclopentanoperidrofenantrene) chiamato anche sterano, caratteristico del colesterolo (Figura 18).



**Figura 18:** Struttura chimica degli steroidi. (A) nucleo sterano o gruppo idrocarburico saturato tetraciclico presente nella struttura di tutti i composti steroidei. (B) Nucleo pregnano che caratterizza gli steroidi C21 come i progestinici (B1) e i corticosteroidi (B2) rappresentati dal progesterone e dal cortisolo, rispettivamente. (C) Nucleo androstano degli steroidi C19 come gli androgeni rappresentati dal testosterone. (D) Nucleo estrano degli steroidi C18 come gli estrogeni rappresentati dall'estradiolo.

In relazione alla loro natura, al sito di sintesi, alle specifiche caratteristiche chimiche e ai recettori con i quali si legano ed interagiscono, gli ormoni steroidei prodotti endogenamente possono essere raggruppati in diverse categorie: androgeni (testosterone e suoi derivati), estrogeni (estradiolo), progestinici (progesterone e suoi derivati) e in corticosteroidi, ovvero mineralcorticoidi (aldosterone) e glucocorticoidi (cortisolo). I corticosteroidi e i progestinici sono steroidi C21 e possiedono il nucleo pregnano con un gruppo “en-4-one-3” e una funzione ossidata al C20. Gli androgeni sono steroidi C19 e contengono il nucleo androstano che può avere legati a sé i gruppi 17 $\beta$ -idrossilato e l’ “en-4-one-3” come il testosterone. Gli estrogeni sono steroidi C18 che contengono il nucleo estrano con una funzione ossidrilica al C3, l’anello A aromatico e una funzione ossidata al C17; a differenza degli altri steroidi, gli estrogeni non hanno il gruppo metilico al C10 (Mensah-Nyagan et al. 2009).

La natura chimica degli steroidi permette loro di comportarsi come molecole lipofile, soprattutto quando si trovano in forma libera o non coniugata con i radicali solfati. Per questo motivo gli steroidi sintetizzati nelle ghiandole periferiche sono in grado di raggiungere e agire su diversi tessuti.

Per diversi anni la produzione degli steroidi endogeni è stata esclusivamente deputata alle ghiandole surrenali e alle gonadi, ma ora è noto che anche altri tessuti come l’intestino, il fegato, la prostata e il sistema nervoso sono in grado di sintetizzare e/o metabolizzare gli steroidi.(Belanger et al 1989; Dalla-Valle et al., 1992; Martel et al., 1994; Baulieu et al., 1999)

In particolare, il sistema nervoso viene controllato in maniera paracrina e autocrina dagli steroidi sintetizzati direttamente dai neuroni e dalle cellule gliali, che per questo motivo vengono chiamati neurosteroidi (Baulieu 1998).

Risulta difficile, quindi, discriminare se l’effetto degli steroidi sia dovuto alla sintesi in “situ”, agli ormoni periferici o alla conversione enzimatica degli steroidi nei rispettivi metaboliti più attivi. Per questo motivo è stato coniato il termine steroidi neuroattivi (Paul and Purdy, 1992; Rupprecht and Holsboer, 1999; Melcangi and Panzica, 2001; Rupprecht et al., 2001; Melcangi et al., 2008) per indicare tutti gli steroidi che sono in grado di regolare le funzioni neuronali.

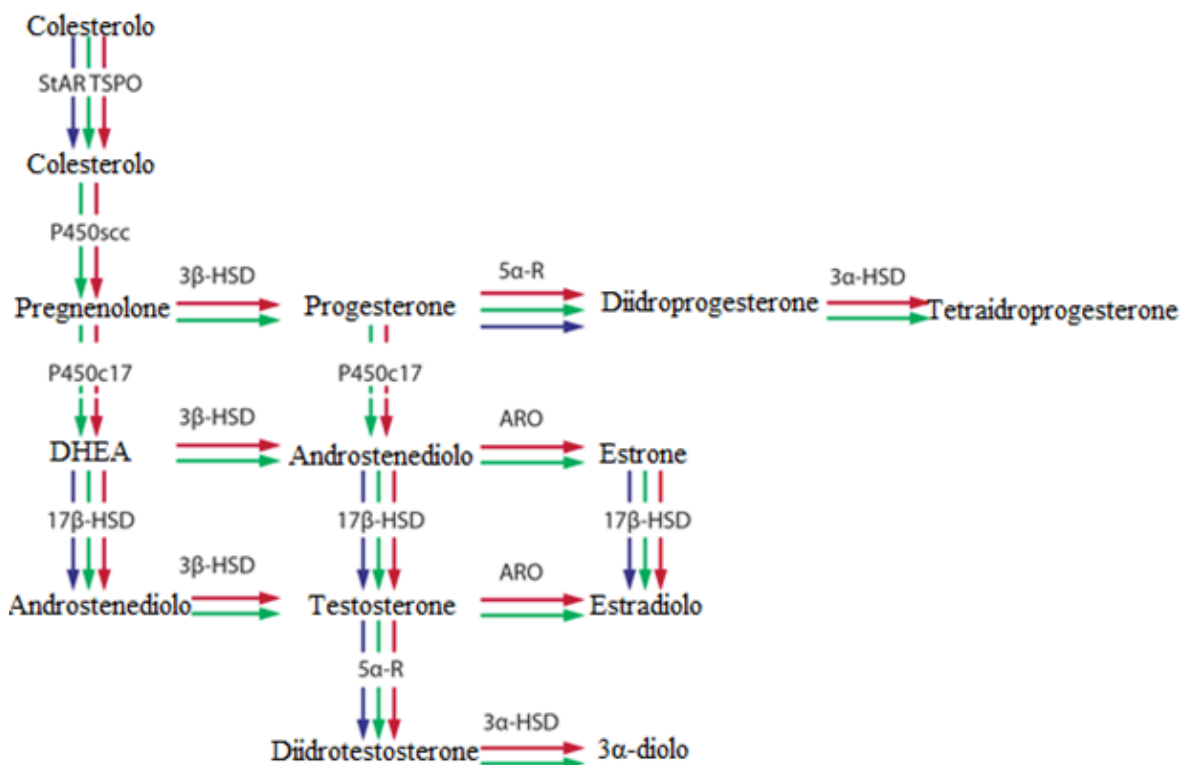


## 1.5.2 BIOSINTESI DEGLI STEROIDI NEUROATTIVI

La sintesi degli steroidi neuroattivi non è una peculiarità degli organi steroidogenici, ma può avvenire anche a livello del sistema nervoso (Baulieu, 1999).

La formazione dei neurosteroidi è stata evidenziata nel sistema nervoso attraverso differenti studi, sia biochimici sia molecolari, che hanno dimostrato l'espressione nei neuroni e/o nelle cellule gliali delle proteine implicate nel trasporto del colesterolo all'interno del mitocondrio e di numerosi enzimi chiave della steroidogenesi (Pelletier 2010)

I processi implicati nella sintesi degli steroidi nel sistema nervoso centrale sono schematicamente rappresentati in figura 19.



**Figura 19:** Rappresentazione schematica della neurosteroidogenesi. Le frecce rappresentano la localizzazione cellulare nei neuroni (rosse), negli astrociti (verdi) e nella microglia (blu).

Il primo passaggio è rappresentato dalla conversione del colesterolo a pregnenolone. Questo processo si compone di due reazioni: la reazione enzimatica vera e propria che rappresenta il primo passaggio enzimatico della sintesi di tutte le classi di ormoni steroidei e che è catalizzata dall'enzima mitocondriale citocromo P450 che taglia la catena laterale del colesterolo (P450<sub>scc</sub>) e dal trasferimento del colesterolo dalla membrana mitocondriale esterna a quella interna, dove è localizzato l'enzima P450<sub>scc</sub>. Questo passaggio rappresenta il punto limite di tutto il processo steroidogenico ed è sotto il controllo ormonale. A livello della membrana mitocondriale esterna due proteine quali il TSPO (Papadopoulos et al., 2006), e la proteina regolatrice della steroidogenesi acuta (StAR) (Lavaque et al., 2006), esercitano un ruolo attivo.

La proteina TSPO è ampiamente espressa in tutto l'organismo ma è particolarmente presente nei tessuti in cui vengono sintetizzati gli steroidi (Gavish et al., 1999; Lacapere and Papadopoulos, 2003), e questo è in linea con l'importanza che riveste nella sintesi di queste molecole. Nel cervello, invece, la sua espressione è limitata alle cellule ependimali e alla glia (Lacapere and Papadopoulos, 2003), mentre nel sistema nervoso periferico si trova espressa nelle cellule di Schwann. Per quanto riguarda la proteina StAR, essa viene prodotta come precursore da 37 kDa e successivamente è trasportata nel mitocondrio dove viene trasformata, attraverso un processo proteolitico, in una proteina inattiva di 30 kDa intramitocondriale. StAR è ampiamente distribuita nel cervello, anche se sono stati riportati differenti livelli di trascrizione a seconda dell'area considerata. In particolare, l'espressione di StAR sembra essere ristretta a specifiche popolazioni neuronali e astrogliali in tutte le aree cerebrali, anche se la sua espressione è predominante nei neuroni (Sierra et al., 2003).

Nel SNP invece, StAR è maggiormente espressa nelle cellule di Schwann (Benmessahel et al., 2004). Anche i passaggi consecutivi della steroidogenesi sembrano avvenire sia nei neuroni (Tsutsui et al., 2000) che nella glia. Gli astrociti, gli oligodendrociti e le cellule di Schwann sono in grado di trasformare il colesterolo in pregnenolone (PREG) e di metabolizzare il pregnenolone in progesterone (PROG), reazione che viene catalizzata dall'enzima 3 $\beta$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\beta$ -HSD) (Hu et al., 1987; Akwa et al., 1993; Jung-Testas et al., 1999; Zwain and Yen, 1999) o in deidroepiandrosterone (DHEA) (Melcangi et al., 2008). In particolare, queste molecole esercitano effetti sul SNC di per sé, ma possono, mediante delle trasformazioni metaboliche, portare alla formazione di

metaboliti neuroattivi. Grazie alla loro struttura lipofila, gli steroidi neuroattivi possono spostarsi da una cellula all'altra (Giatti et al., 2012b). Questo influisce notevolmente sul loro metabolismo e dipende dal repertorio enzimatico espresso nei diversi tipi cellulari. Per esempio, il DHEA può essere convertito in androstenediolo e successivamente in testosterone, o in androstenedione in tutte le cellule del SNC (Melcangi et al., 2008). Nei neuroni, l'androstenedione, così come il testosterone, può essere convertito dall'aromatasi P450 (ARO) in estrone e 17 $\beta$ -estradiolo (17 $\beta$ -E2) rispettivamente.

Questo si verifica anche negli astrociti, che esprimono l'enzima ARO, ma non nella microglia (Garcia-Segura et al., 2003). Nei neuroni, così come negli astrociti, il PROG e il testosterone possono essere metabolizzati dal complesso enzimatico costituito da 5 $\alpha$ -reduttasi (5 $\alpha$ -R) e 3 $\alpha$ -idrossisteroide deidrogenasi (3 $\alpha$ -HSD) in diidroprogesterone (DHP) e tetraidroprogesterone (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP, noto anche come allopregnanolone), o diidrotestosterone (DHT) e 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolo (3 $\alpha$ -diolo) rispettivamente (Melcangi et al., 2008). Sebbene questi pathways siano tipici della microglia, essa non è in grado di produrre PREG o PROG dal colesterolo. Inoltre, esprimendo 17 $\beta$ -HSD, è in grado di sintetizzare l'androstenediolo a partire dal DHEA (Jellinck et al., 2007) e il testosterone dall'androstenedione (Jellinck et al., 2006; Jellinck et al., 2007). Infine, poiché le cellule microgliali non esprimono ARO, esse sono in grado di produrre estradiolo a partire solo da estrone e non da testosterone (Gottfried-Blackmore et al., 2008).

Il metabolismo di PROG e del testosterone ha un profondo impatto sul meccanismo d'azione di questi steroidi neuroattivi. Infatti, mentre il DHP, come il PROG, è in grado di interagire con il recettore steroideo classico, il recettore del PROG (PR) (Melcangi et al., 2008), il 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP è un potente ligando dei recettori steroidei non classici, come il recettore GABA-A (Lambert et al., 2003; Beelli and Lambert, 2005). Analogamente, il DHT è in grado di interagire con il recettore degli androgeni (AR), mentre il 3 $\alpha$ -diolo è un ligando del recettore GABA-A (Melcangi et al., 2008). Pertanto, la conversione metabolica del testosterone e del PROG nei loro derivati potrebbe modulare diversamente e specificamente il meccanismo d'azione dei rispettivi precursori, attraverso il reclutamento di diversi pathways del SNC.

Sia i neuroni che le cellule gliali esprimono i recettori estrogenici, rappresentati dalle 2 isoforme di recettori nucleari, ER- $\alpha$  e ER- $\beta$  (Melcangi et al., 2001; Brinton et al., 2008; Melcangi et al., 2008). Tuttavia, non tutti i tipi di cellule gliali esprimono lo stesso

repertorio di recettori steroidei e la loro espressione cambia in relazione allo stato di attivazione delle cellule, alla localizzazione regionale e allo stadio di sviluppo. Per esempio, un recettore per gli estrogeni (ER $\alpha$ ) è espresso in cellule microgliali, mentre ER $\beta$ , AR e PR non sembrano essere espresse in condizioni fisiologiche (Sierra et al., 2007; Sierra et al., 2008). Astrociti esprimenti AR sono stati osservati nella corteccia cerebrale di ratti al decimo giorno post-natale (DonCarlos et al., 2006) nel nucleo arcuato e nella formazione dell'ippocampo di ratti adulti (Tabori et al., 2005; DonCarlos et al., 2006).

L'espressione dei recettori steroidei e il loro metabolismo possono essere modificati da insulti differenti. Nei ratti, per esempio, lesioni cerebrali inducono l'espressione di ER $\alpha$  nelle cellule astrocitarie immunoreattive a vimentina e a GFAP, o del recettore degli androgeni nella microglia immunomarcata con MHC di classe II e lecitina. Questi dati suggeriscono che l'espressione dei diversi recettori in diversi tipi cellulari è necessaria per la corretta modulazione della risposta agli insulti (Garcia-Ovejero et al., 2002).

### **1.5.3 STEROIDI NEUROATTIVI E SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Gli steroidi neuroattivi agiscono come importanti regolatori fisiologici della funzionalità del SNC (Melcangi et al. 2008, 2011, Panzica et al. 2012). Inoltre, studi condotti su modelli sperimentali di diverse patologie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla, i traumi cerebrali, l'ictus, l'autismo e la schizofrenia, hanno dimostrato che la somministrazione degli steroidi neuroattivi è in grado di favorire diversi processi protettivi/riparativi come l'inibizione della morte neuronale, la neurogenesi, la mielinizzazione, la riduzione della neuroinfiammazione e la modulazione delle sensazione dolorifiche (Brinton & Wang 2006, Garcia-Segura & Balthazart 2009, Melcangi & Garcia-Segura 2010, Melcangi et al. 2011, Kipp et al. 2012, Panzica et al. 2012, Schumacher et al. 2012, Mensah-Nyagan et al. 2009).

Gli effetti degli steroidi neuroattivi sono stati valutati anche su un modello sperimentale di Parkinson (PD), ottenuto usando la neurotossina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), che mima per certi aspetti la patologia umana (Vajda, 2002). I risultati ottenuti somministrando 17 $\beta$ -estradiolo o DHEA, rispettivamente, alle scimmie ovaectomizzate o ai topi, entrambi trattati con MPTP, hanno dimostrato che tali steroidi proteggono dalla

neurotossina i neuroni dopaminergici nello striato (D'Astous, et al. 2003, Morisette et al. 2009). Questo risulta importante perché la loro ridotta attività causa la morte neuronale nella *pars compacta* della sostanza *nigra* che è considerata la causa principale della comparsa del Parkinson nell'uomo.

Interessanti risultati sono stati anche ottenuti nel modello di esposizione cronica al manganese che provoca il manganismo, un disordine neurodegenerativo simile al morbo di Parkinson che altera la funzionalità dei trasportatori del glutammato presenti sugli astrociti. Come recentemente osservato nelle colture primarie degli astrociti corticali il trattamento con estradiolo e con il modulatore selettivo dei recettori per gli estrogeni, il tamoxifene, aumenta la funzionalità dei trasportatori del glutammato stimolando l'espressione di TGF $\beta$ 1 e contrasta l'inibizione della captazione del glutammato indotta dal manganese (Lee et al. 2009).

Nel modello sperimentale della sclerosi multipla, (l'encefalomielite autoimmune sperimentale, EAE), il progesterone (PROG) non solo è in grado di diminuire la severità clinica, la demielinizzazione e la disfunzione neuronale (Garay et al. 2008) ma anche di impedire il danno assonale (Garay et al. 2009). Tale effetto sembra essere in accordo con la diminuzione dei livelli di PROG osservata nel midollo spinale degli animali EAE (Giatti et al. 2009a). Oltre al PROG anche l'estradiolo sembra essere neuroprotettivo in tale modello: il suo effetto viene esplicato attraverso il recettore 30 accoppiato alle proteine G (GPR30), la cui attivazione diminuisce la produzione di IL-17 in seguito all'aumento di espressione della proteina della morte programmata 1 (PD-1) nelle cellule CD4+Foxp3+ regolatorie, contrastando così gli effetti clinici della patologia (Wang et al. 2009a, b).

Molti ricercatori sostengono che gli steroidi neuroattivi, agendo durante i periodi critici dello sviluppo cerebrale, possano modulare la vulnerabilità genetica alla base dell'insorgenza dei disordini psichiatrici tra cui schizofrenia e autismo (Knickmeyer and Baron-Cohen, 2006; Auyeung et al., 2008;). Sulla base di studi condotti su modelli sperimentali di tali patologie, è stato proposto che il gene maggiormente coinvolto nello sviluppo di questi disordini psichiatrici è quello che codifica per la proteina relina (Fatemi et al., 2005; Eastwood and Harrison, 2006; Abrahams and Geschwind, 2008, Biamonte et al., 2009), responsabile del corretto posizionamento dei neuroni durante lo sviluppo cerebrale (D'Arcangelo et al., 1995; Tissir and Goffinet, 2003). Il trattamento con estradiolo è in grado di contrastare la riduzione del numero delle cellule del Purkinje come anche i

bassi livelli di relina osservati nel cervelletto di questi animali, suggerendo così un suo possibile ruolo protettivo (Bender RA et al., 2010; Haraguchi S et al., 2012)

Inoltre, Marx e collaboratori (Marx et al., 2009, 2011) hanno dimostrato che in pazienti affetti da schizofrenia o da disordini schizoaffettivi, la somministrazione di pregnenolone induce una riduzione dei sintomi negativi e un miglioramento delle funzioni cognitive.

Come osservato da Ritsner, non solo il pregnenolone, ma anche il DHEA sembra avere un effetto benefico nel trattamento della schizofrenia (Ritsner, 2011). infatti, è stato osservato che i livelli plasmatici di DHEA risultano diminuiti nei pazienti schizofrenici e un miglioramento delle loro capacità cognitive e lavorative è associato con l'aumento dei livelli plasmatici di questo steroide.

La patofisiologia della malattia di Alzheimer (AD) viene attribuita agli effetti della  $\beta$ -amiloide, un peptide che si accumula nel cervello causando neurotossicità e degenerazione (Vajda, 2002). Weil-Engerer e collaboratori (2002) hanno dimostrato che oltre all'aumento di questo peptide, certe aree cerebrali di pazienti con AD, comparate con le stesse regioni provenienti da persone anziane non affette dalla patologia, presentano ridotti livelli di steroidi neuroattivi. In particolare, è stata osservata una diminuzione dei livelli di deidroepiandrosterone solfato (DHEAS) nell'ipotalamo e di pregnenolone solfato (PREGS) nel cervelletto e nello striato che correla con le aumentate concentrazioni delle proteine implicate nella formazione di placche e di aggregati neurofibrillari, come la  $\beta$ -amiloide e la proteina Tau fosforilata (Weill-Engerer et al. 2002).

## **1.5.4 STEROIDI NEUROATTIVI E MODULAZIONE DEL DOLORE**

Nel 1927 Cashin e Moravek avevano osservato che la somministrazione intravenosa di colesterolo era in grado di inibire la sensazione dolorifica nei mammiferi.

Successivamente, Selye e Masson (1942) hanno dimostrato che alcuni steroidi contenenti il gruppo pregnano come il progesterone e il deossicorticosterone potevano indurre sedazione e anestesia nel ratto.

Prese insieme, queste osservazioni hanno aperto la strada allo sviluppo di vari analoghi sintetici contenenti il gruppo pregnano in grado di ridurre il dolore attraverso l'attivazione allosterica dei recettori GABA-A (Kraulis et al., 1975; Holzbauer, 1976; Purdy et al., 1991;

Majewska, 1992; Belelli and Lambert, 2005).

In ogni modo, l'uso terapeutico dei glucocorticoidi e dei loro analoghi è considerata la migliore strategia contro il dolore evocato da uno stato infiammatorio, nonostante l'insorgenza di diversi effetti collaterali (Barnes, 1998; Belvisi and Hele, 2003).

I glucocorticoidi riducono il dolore infiammatorio attraverso una azione antinfiammatoria sul tessuto centrale o periferico danneggiato, inibendo l'espressione della collagenasi (l'enzima chiave coinvolto nella degenerazione del tessuto durante il meccanismo infiammatorio) e delle citochine proinfiammatorie e/o stimolando la sintesi della lipocortina che blocca la produzione di eicosanoidi (Firestein et al., 1991; Barnes and Adcock, 1993; Fakih et al., 2002; Sabilia, 2003).

Osservazioni psicosociali e diversi studi condotti dai ricercatori hanno suggerito che la percezione del dolore è influenzata dal tipo di sesso (Fillingim, 2000; Robinson et al., 2000; Paller et al., 2009). Infatti, le donne percepiscono più dolore degli uomini, hanno un maggiore rischio di sviluppare il dolore cronico e una soglia e tolleranza del dolore più bassa (Unruh, 1996; LeResche, 1999; Fillingim and Gear, 2004).

Studi clinici hanno inoltre dimostrato che le donne hanno meno controllo inibitorio del dolore durante le fasi mestruali e luteali, confermando l'idea che le fluttuazioni dei livelli degli steroidi sessuali possono influenzare significativamente la percezione del dolore (Julien et al., 2005).

Oltre che nell'uomo, differenze legate al sesso nelle risposte nocicettive e nella modulazione del dolore sono presenti anche negli animali (Berkley, 1997; Riley et al., 1998; Fillingim and Ness, 2000; Chesler et al., 2002; Mogil and Crager, 2004). Infatti, gli androgeni, e in particolare il testosterone, esercitano un'azione analgesica null'uomo e in diversi modelli sperimentali mentre gli estrogeni sono sia iperalgesici che analgesici a seconda della condizione sperimentale considerata (Ceccarelli et al., 2003; Aloisi et al., 2004; Hau et al., 2004; Aloisi e Bonifazi, 2006).

Per determinare il ruolo degli steroidi sessuali sul controllo endogeno del dolore, diversi studiosi ne hanno valutato gli effetti su modelli animali gonadectomizzati in cui è stato indotto il dolore con la formalina. In particolare, durante la fase eccitatoria, i ratti maschi gonadectomizzati presentano più dolore dei ratti non sottoposti a gonadectomia, mentre le femmine gonadectomizzate esibiscono durante l'interfase inibitoria del dolore, una minore risposta nocicettiva rispetto ai propri controlli. A supporto di questi dati, il trattamento

ormonale di questi animali ha rivelato che il testosterone gioca un ruolo protettivo nella percezione del dolore, mentre gli estrogeni o il progesterone agiscono principalmente sull'inibizione dei meccanismi del dolore (Gaumond et al., 2002, 2005, 2007).

Kibaly e collaboratori nel 2008 hanno osservato che il trattamento acuto con il DHEA induce una rapida azione pro-nocicettiva e un ritardo nell'azione anti-nocicettiva. Infatti, l'inibizione della sintesi del DHEA, mediante somministrazione intratecale di ketoconazolo (inibitore dell'enzima P450c17), induce analgesia nei ratti neuropatici. Il trattamento cronico di DHEA, invece, aumenta e mantiene elevata la soglia basale del dolore sia nei ratti neuropatici che controllo, suggerendo che i metaboliti androgenici generati dalla somministrazione giornaliera di DHEA esercitano effetti analgesici, mentre il DHEA stesso (prima di essere metabolizzato) induce una rapida azione pro-nocicettiva. Infatti la somministrazione intratecale di testosterone, un steroide che deriva dal DHEA, induce analgesia nei ratti neuropatici (Kibaly et al., 2008).

Gli steroidi neuroattivi modulano i recettori GABA-A, NMDA e il recettore purinergico dell'ATP (P2X) i quali giocano un ruolo cruciale nella regolazione del dolore (Baulieu et al., 1999; Millan, 1999,2002; Mensah-Nyagan et al., 2008), ma la sintesi di tali steroidi vicino al loro sito d'azione nei centri neurali del dolore è un prerequisito essenziale per rendere credibile il loro coinvolgimento nella modulazione del dolore. Per questo motivo sono stati realizzati una serie di studi per investigare se il midollo spinale, che controlla la trasmissione dolorifica (Haines et al., 1997; Millan, 1999,2002), possiede anche i macchinari enzimatici per la sintesi degli steroidi in loco. È stato dimostrato che le corna dorsali del midollo spinale di ratto contengono vari enzimi chiave nella sintesi degli steroidi come P450scc, P450c17, 5 $\alpha$ -R e 3 $\alpha$ -HSD e quindi sono considerate un centro attivo nella sintesi dei neurosteroidi (Patte-Mensah et al., 2003, 2004 a,b, 2005, 2006; Kibaly et al., 2005, 2008; Meyer et al., 2008; Mensah-Nyagan, 2008). Inoltre è stato osservato che la SP, uno dei più importanti neuropeptidi coinvolti nella nocicezione rilasciato dalle afferenze sensoriali primarie, inibisce in maniera dose-dipendente la sintesi di 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP nelle corna dorsali del midollo spinale (Patte-Mensah et al., 2005). Il 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP è un potente stimolatore allosterico dei recettori GABA-A e quindi la SP, riducendone la sintesi, potrebbe diminuire indirettamente il tono inibitorio spinale mediato dal recettore GABA-A e quindi facilitare la trasmissione dei segnali nocicettivi.

Infatti, risultati ottenuti dal *plantar test* e dal *test* di Von Frey, due studi comportamentali



utilizzati rispettivamente per la valutazione della soglia nocicettiva termica e meccanica, hanno mostrato che la somministrazione intratecale di  $3\alpha,5\alpha$ -THP, come anche dei suoi analoghi sintetici, induce analgesia in modelli sperimentali di dolore neuropatico (Goodchild et al., 2000, 2001; Nadeson and Goodchild, 2000, 2001; Gambhir et al., 2002; Meyer et al., 2008). Diversamente dal  $3\alpha,5\alpha$ -THP, la somministrazione intratecale di Provera (inibitore della  $3\alpha$ -HSD) aumenta sia l'iperalgia termica che l'allodinia meccanica negli stessi modelli sperimentali considerati (Meyer et al., 2008).

Gli steroidi neuroattivi  $5\alpha$ -ridotti possono indurre una potente analgesia periferica non solo mediata dai recettori GABA-A (come nel caso del  $3\alpha,5\alpha$ -THP) ma anche mediata dai canali del calcio di tipo T dei quali sono dei potenti bloccanti (Pathirathna et al., 2005; Todorovic et al., 1998a, 1998b, 2009). I canali del calcio di tipo T, infatti, agiscono come amplificatori della trasmissione nocicettiva in vivo (Todorovic et al., 2001), quindi la loro inattivazione è in grado di ridurre la sensazione della percezione dolorifica (Pathirathna et al., 2005).

Ad ulteriore conferma dell'attività analgesica degli steroidi neuroattivi, la somministrazione sottocutanea di testosterone e dei suoi derivati  $5\alpha$ -ridotti, DHT e  $3\alpha$ -diolo, protegge dall'iperalgia termica valutata mediante il *tail-flick* e il *paw-lick test* nei ratti gonadectomizzati rispetto ai loro controlli non sottoposti a gonadectomia (Edinger et al., 2005). Inoltre è stato anche osservato che ratti maschi castrati presentano una significativa riduzione della soglia del dolore, la quale torna a livelli normali dopo somministrazione di testosterone (Jaiprakash R.M. et al., 1995).

Appare quindi evidente come la somministrazione di steroidi neuroattivi possa essere efficace nell'attenuare la sensazione dolorifica derivante da diverse patologie, come la ND per la quale non esiste una terapia mirata a risolvere la sintomatologia dolorifica all'origine ma soltanto in grado di attenuarla.

## 2. SCOPO DELLA TESI

La neuropatia diabetica è una grave complicazione a lungo termine del diabete mellito caratterizzata da cambiamenti funzionali e strutturali a carico sia del SNP che del SNC.

Nel primo caso si ha degenerazione assonale, demielinizzazione paranodale, perdita delle fibre mielinizzate e diminuzione dell'NCV (Sugimoto et al., 2000; Vinik et al., 2000).

Nel SNC invece la ND è associata a disturbi cognitivi, ad aumentato rischio di demenza, infarto, malattie cerebrovascolari, malattia di Alzheimer e a disordini psichiatrici come disturbi alimentari e depressione (Biessels et al., 2008, 2002; Gispen and Biessels, 2000; Jacobson et al., 2002; McCall 2002; Kodl and Seaquist, 2008).

Uno dei sintomi che più spesso accompagnano la ND è il dolore, a tal punto che la PDN è stata riconosciuta come una sindrome specifica di ND.

Nonostante la sua ampia diffusione (la prevalenza della PDN varia dal 10% al 20% dei soggetti diabetici, e dal 40% al 50% di quelli affetti da ND (Veves et al., 1993; Galer et al., 2000; Gordois et al., 2003)), non sono ancora stati trovati farmaci efficaci per la cura del dolore e si continuano a somministrare medicinali non specifici in grado di attenuare la sintomatologia dolorifica, ma non di risolverla all'origine, come antiinfiammatori non steroidei, antidolorifici, antidepressivi triciclici ed oppiacei. Questo, oltre alla mancata risoluzione della patologia, comporta anche l'insorgenza di importanti effetti collaterali, che aggravano la condizione già precaria dei pazienti.

Risulta quindi importante studiare i meccanismi molecolari alla base del dolore evocato dalla ND e proporre nuovi approcci terapeutici.

In particolare, numerosi studi evidenziano come gli steroidi neuroattivi agiscano da importanti regolatori fisiologici della funzionalità del SNC (Garcia-Segura et al., 1994): essi interagiscono oltre che con i recettori nucleari classici anche con i recettori GABAA, NMDA e P2X, i quali esercitano un ruolo cruciale nella regolazione del dolore. Poiché diversi studi hanno evidenziato che la percezione del dolore è influenzata dal tipo di sesso, sono stati studiati più approfonditamente gli steroidi sessuali: da questi studi emerge come gli androgeni, e in particolare il testosterone, esercitino un'azione analgesica nell'uomo (Ceccarelli et al., 2003; Aloisi and Bonifazi, 2006). Inoltre è stato anche osservato che ratti maschi castrati presentano una significativa riduzione della soglia del dolore, la quale torna

a livelli normali dopo somministrazione di testosterone (Jaiprakash and Vilas, 1995).

A conferma dell'attività analgesica del testosterone, la somministrazione sottocutanea di tale ormone, del DHT e del  $3\alpha$ -diolo protegge dall'iperalgia termica valutata mediante il *tail-flick* e il *paw-lick test* nei ratti gonadectomizzati rispetto ai loro controlli non sottoposti a gonadectomia (Edinger and Frye, 2005).

Sulla base di queste osservazioni lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare la PDN nel modello animale di diabete di tipo 1 e di valutare i possibili effetti analgesici del DHT e del  $3\alpha$ -diolo, metaboliti  $5\alpha$ -ridotti del testosterone, in un modello animale di DM. La patologia è stata indotta tramite un'iniezione intraperitoneale di STZ in ratti maschi adulti di ceppo Sprague-Dawley. Gli animali sono stati trattati a giorni alterni, per 30 giorni, con DHT, con  $3\alpha$ -diolo o con il solo veicolo di scioglimento (olio di sesamo) e gli effetti del trattamento sono stati valutati mediante test comportamentali e analizzando diversi parametri neurotrasmettitoriali e neuroinfiammatori coinvolti nella generazione, amplificazione e mantenimento della sensazione dolorifica.

# 3. MATERIALI E METODI

## 3.1 ANIMALI

Gli animali utilizzati in questa sperimentazione sono ratti Sprague-Dawley maschi di due mesi di età (Crl: CD BR, Charles River, Lecco, Italia). Gli animali sono stati mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari dell'Università degli Studi di Milano in condizioni di temperatura e umidità controllate, esposti a 12 ore di luce (a partire dalle 6.30) e 12 ore di buio. Gli esperimenti sono stati condotti secondo quanto stabilito dalla Comunità Europea (Direttiva 86/609/EEC, Official Journal L 358, 18/12/1986 p.0001-0028), e secondo le regolamentazioni locali (Decreto Legislativo Italiano n. 116 – 27/01/1992) per la cura e l'utilizzo degli animali da laboratorio.

- **Induzione del diabete**

Dopo un periodo di adattamento di una settimana, gli animali sono stati pesati e un gruppo è stato reso diabetico mediante una singola iniezione intraperitoneale di STZ (60 mg/Kg) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sciolta al momento dell'uso in un tampone citrato 0,09 M, pH 4,8. Gli animali controllo (CTR) sono stati trattati con il solo tampone citrato. L'iperglicemia è stata verificata 48 ore dopo l'iniezione di STZ misurando il livello di glucosio proveniente dal sangue prelevato dalla vena caudale, con un misuratore di glicemia OneTouch Ultra2 (LifeScan). Soltanto gli animali con una glicemia maggiore di 300 mg/dl sono stati classificati come diabetici. Questi sono stati ulteriormente randomizzati in quattro gruppi sperimentali: animali diabetici trattati con il solo veicolo (olio di sesamo) (STZ), animali diabetici trattati DHT (STZ+DHT) e animali diabetici trattati con 3 $\alpha$ -diolo (STZ+3 $\alpha$ -diolo). Lo stesso giorno della randomizzazione gli animali del gruppo DHT e 3 $\alpha$ -diolo hanno ricevuto la prima delle 16 iniezioni sottocutanee dello specifico trattamento (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) disciolto in 200  $\mu$ l di olio di sesamo. I ratti appartenenti agli altri due gruppi sperimentali (CTR e STZ) sono stati trattati solo con 200  $\mu$ l del veicolo di scioglimento. Da questo momento la somministrazione dei trattamenti (per i gruppi STZ+DHT e STZ+3 $\alpha$ -diolo) e del solo veicolo di scioglimento

(per i gruppi CTR e STZ) è avvenuta a giorni alterni per un tempo complessivo di 30 giorni. Ventiquattro ore dopo l'ultimo trattamento, è stata ricontrollata la glicemia, i ratti sono stati pesati e sacrificati, le corna dorsali del midollo spinale e i DRG sono stati prelevati e rapidamente congelati.

## **3.2 ANALISI QUANTITATIVA DEGLI STEROIDI**

L'analisi degli steroidi neuroattivi è stata condotta attraverso l'uso della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (analisi LC-MS/MS) che utilizza l'elio come gas di collisione. L'HPLC, con una pompa Surveyor LC Plus (ThermoFisher, San José, USA), è stata accoppiata con uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare (ThermoFisher, San José, USA) equipaggiato con una sorgente che opera in modalità ionica positiva a pressione atmosferica (APCI+).

Il dosaggio degli steroidi neuroattivi presenti nel midollo spinale degli animali controllo e trattati sono stati estratti come precedentemente descritto da Pesaresi e collaboratori (Pesaresi et al., 2010). Brevemente, ai campioni sono stati aggiunti gli standard di riferimento interni e gli stessi campioni sono stati omogenizzati in 2ml di metanolo/acido acetico (99:1 v/v) utilizzando un sonicatore. Dopo averli caricati in una colonna C18, gli steroidi sono stati eluiti con metanolo (5 ml), risospesi in una miscela di metanolo/acqua (1:1 v/v) prima di essere iniettati in una colonna analitica RP-C18 (Hypersil Gold, ThermoFisher Co, San José, USA).

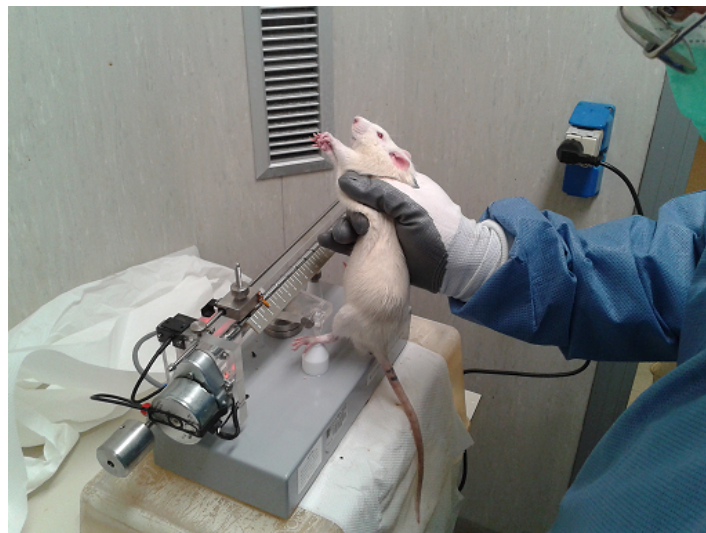
L'analisi quantitativa è stata effettuata sulla base di curve di calibrazione preparate ed analizzate usando standard di riferimento interni deuterati, secondo la stessa procedura descritta per i campioni. La linearità della curva standard è stata valutata utilizzando GraphPad PRISM (versione 5).

### 3.3 TEST COMPORTAMENTALI

In questa sperimentazione sono stati effettuati dei *test* comportamentali ogni 10 giorni circa dall'induzione del diabete, al fine di determinare l'insorgenza PDN.

- **Iperalgesia meccanica: Randall-Selitto**

L'insorgenza di iperalgesia meccanica è stata valutata mediante il *test* di Randall-Selitto (Strumentazione: Ugo Basile, Italia), un metodo introdotto nel 1957 ed ampiamente impiegato fino ad oggi per determinare la soglia di sensibilità allo stimolo meccanico. Questo *test* quantifica la risposta di sottrazione della zampa posteriore a seguito dell'applicazione di una forza progressiva sul dorso della zampa stessa. L'animale è manipolato con cura in modo da evitarne lo stress. L'incremento della forza applicata è di 16 gr/secondo e, onde evitare danni ai tessuti, viene applicato un cut-off di 250 gr. A distanza di almeno 30 minuti la misurazione viene ripetuta sulla zampa opposta (Figura 20).



**Figura 20:** *test di Randall-Selitto.*

## • Allodinia meccanica: Von Frey

Il *test* di Von Frey è stato ampiamente descritto come metodo per determinare la presenza di allodinia meccanica utilizzando filamenti numerati (*Von Frey hairs*) di diversa rigidità, che imprimono una forza incrementale secondo una scala logaritmica.

Inizialmente gli animali vengono posti all'interno di un *box* di perspex (7,5cm per 9,0cm) su una piattaforma sopraelevata in alluminio forato. Dopo un periodo di acclimatamento di 15 minuti, vengono applicati per 10 secondi sulla superficie glabra della zampa posteriore dell'animale i filamenti di Von Frey, al fine di determinare il tempo della soglia di risposta. Per valutare la soglia di ritrazione della zampa (*withdrawal threshold*) viene utilizzato il metodo *up-down* (Chaplan et al., 1994; Dixon, 1980), che consiste nell'applicare come primo filamento quello corrispondente al 50% della soglia di ritrazione della zampa in condizioni basali e successivamente un filamento di forza decrescente o uno di forza crescente, rispettivamente in presenza o assenza di risposta nocicettiva.

Il test continua fino ad ottenere almeno sei misurazioni intorno al valore soglia di ritrazione della zampa. Ogni misurazione deve essere eseguita a distanza di almeno tre minuti dalla successiva, in modo da evitare la presenza di risposte amplificate a causa di stimolazioni ravvicinate. In questo modo è possibile determinare il valore corrispondente al 50% della soglia di ritrazione della zampa (Figura 21).



**Figura 21:** test di Von Frey.

## 3.4 ANALISI PROTEICA

- **Omogeneizzazione dei tessuti**

La sezione dorsale del midollo spinale lombare è stata omogeneizzata in un buffer di lisi più EDTA (tampone fosfato salino (PBS) a pH 7.4) con Nonidet P-40 all'1% e supplementato con un *cocktail* di inibitori delle proteasi, utilizzando l'omogeneizzatore TissueLyser II Quiagen . Il campione è stato omogenato per 5 minuti ad una frequenza di 30/secondo e successivamente centrifugato per 3 minuti a 2000 rpm per rimuovere il materiale particolato.

La concentrazione proteica di ciascun campione è stata determinata con il metodo di Bradford, usando l'albumina di siero bovino come standard (Bradford, 1976).

- **Estrazione della frazione postsinaptica (TIF, Frazione Insolubile al Triton)**

Le corna dorsali del midollo spinale lombare sono state omogeneizzate in ghiaccio in saccarosio 0,32M contenente Hepes 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 1mM, PMSF 0,1mM a pH 7,4 ed in presenza di un set completo di inibitori delle proteasi (Complete<sup>TM</sup>, Roche Diagnostics) e di inibitori delle fosfatasi (PhosSTOP, Roche Diagnostics). Il tessuto omogeneizzato è stato centrifugato a 13.000 g per 15min per ottenere la frazione cruda di membrana (frazione P2). Il pellet (P2) è stato risospeso in un tampone contenente Hepes 1mM, KCl 75mM e l'1% di Triton X-100 (Complete<sup>TM</sup>) con un omogeneizzatore di tessuto vetro-vetro Potter-Elvehjem e centrifugato a 100.000 g per 1h a 4°C. Il pellet (P3) è poi stato omogeneizzato con un omogeneizzatore di tessuto vetro-vetro Potter-Elvehjem in Hepes 20mM. La frazione insolubile in Triton (TIF) ottenuta è stata conservata a -80°C.



## • Western Blot

Per ogni campione è stata solubilizzata un'uguale quantità in un tampone contenente SDS allo 0,1% e lasciata per 5 minuti a 100°C. Successivamente i campioni sono stati caricati in un gel di sodio dodecil solfato (SDS)-poliacrilammide al 10% e sottoposti ad un trasferimento overnight su membrana di nitrocellulosa (Trans-blot, Bio-Rad, Segrate, Italia).

Il giorno successivo la membrana è stata incubata a temperatura ambiente con rosso ponceau 1X, in modo da poter visualizzare la presenza delle bande di proteine, ed è stata tagliata.

Tutti i frammenti sono stati bloccati a temperatura ambiente in PBS, con lo 0,1% di Tween 20, ed il 10% di latte. In seguito le diverse parti della membrana sono state incubate overnight a 4°C con un anticorpo primario diverso per ogni proteina: anticorpo monoclonale murino anti-sinapsina-1 e anti-sintaxina-1 (Synaptic Systems, Gottingen, Germany); anticorpo monoclonale murino anti-PSD-95 (Neuromab, USA); anticorpo monoclonale murino anti-GluN2B (Neuromab, USA); anticorpo monoclonale di coniglio anti-pGluN2B (NeuroMab, USA); anticorpo monoclonale murino anti-GluN1 (Life Technologies, Monza, Italia); anticorpo monoclonale murino anti-GluN2A (Life Technologies, Monza, Italia); anticorpo policlonale di coniglio anti-pGluN1 (Life Technologies, Monza, Italia). L'anticorpo primario è stato diluito 1:30000 per sinapsina 1 e syntaxina 1, 1:2500 per PSD-95, 1:500 per GluN2B, 1:1000 pGluN2B, 1:1000 GluN1, 1:500 pGluN1, 1:500 GluN2A in PBS con lo 0,1% di Tween 20 e il 3% di latte.

Come controllo una parte della membrana è stata incubata con un anticorpo monoclonale anti- $\alpha$ -tubulina diluito 1:10000 in PBS con lo 0,1% di Tween 20 e il 3% di latte (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Il giorno successivo le membrane, dopo essere state sottoposte ad un lavaggio di 30 minuti con PBS 0,1% Tween 20, sono state incubate con un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano per 2 ore a temperatura ambiente: immunoglobulina G (IgG) di pecora anti-topo per Syntaxina-1, Sinapsina-1, PSD-95, GluN1, GluN2A, GluN2B e  $\alpha$ -Tubulina (Amersham Biosciences SE-751 84, Uppsala, Sweden); IgG di capra anti-coniglio per pGluN1 e pGluN2B (Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA). L'anticorpo secondario è stato diluito 1:50000 per Sinapsina-1 e Syntaxina-1, 1:10000 per PSD-95, 1:10000 per GluN1, 1:10000 per pGluN1, 1:10000 per GluN2A, 1:10000 per

GluN2B, 1:10000 per pGluN2B e 1:50000 per  $\alpha$ -Tubulina in PBS con lo 0,1% di Tween 20 e l'1% di latte.

La presenza degli anticorpi sulla membrana è stata visualizzata, dopo lavaggio con PBS 0,1% Tween 20, utilizzando come metodo di rilevazione l'elettrochemiluminescenza, ECL (Perkin Elmer, Monza, Italia).

La presenza degli anticorpi sulla membrana è stata visualizzata, dopo lavaggio con PBS 0,1% Tween 20, utilizzando come metodo di rilevazione l'elettrochemiluminescenza, ECL (Perkin Elmer, Monza, Italia).

## • **Analisi dei dati**

L'autoradiografia ottenuta grazie al metodo ECL è stata acquisita con uno scanner Kodak Snap ed analizzata con ImageJ 1.33u. Esposizioni della membrana a tempi diversi sono state effettuate per assicurarsi che le bande autoradiografiche ottenute si trovassero in un range lineare di intensità.

Il programma di analisi d'immagini ImageJ permette di generare, a partire dalle bande ottenute, un plot formato da diversi picchi, le cui aree sono proporzionali all'intensità della bande corrispondenti.

L'espressione proteica delle proteine syntaxina1, sinapsina1, NR2Bp e  $\alpha$ -tubulina è stata calcolata misurando l'area densitometrica del picco. La quantità di ogni proteina è stata espressa come rapporto tra l'area del picco relativo e l'area del picco dell'*housekeeping* ( $\alpha$ -tubulina) corrispondente.

Per ogni singolo esperimento la media dei valori del gruppo controllo è stata settata a 100 e tutti gli altri valori sono stati espressi come percentuale di questa.

## 3.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'espressione genica è stata analizzata mediante la tecnica Real Time PCR quantitativa. L'RNA totale è stato estratto da frammenti congelati di sezioni dorsali di midollo spinale lombare, dai gangli delle radici dorsali del midollo spinale e dalle colture primarie di DRG. L'estrazione dell'mRNA è stata effettuata con un kit Nucleospin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Germania) e l'mRNA così ottenuto è stato quantificato utilizzando il Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). L'amplificazione dell'mRNA è stata condotta con il kit iScript™ One Step RT-PCR for Probes (Bio-Rad, Milano, Italia) e la quantificazione relativa dell'mRNA che codifica per IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ -1, SP e TLR-4 è stata effettuata rapportando la loro quantità con quella del gene controllo (18S) allestendo una curva standard. Gli oligonucleotidi impiegati per la real-time PCR sono stati acquistati da Life Technologies Corporation (Monza, Italia). Le analisi sono state condotte utilizzando lo strumento TaqMan qRT-PCR (CFX 96 Real-Time System, Bio-Rad, Segrate, Italia), gestito tramite un apposito software. I campioni analizzati sono stati caricati in triplicato in piastre da 96 pozzetti.

## 3.6 ANALISI DEL RILASCIO DI GLUTAMMATO

### • Purificazione dei sinaptosomi

I sinaptosomi, ottenuti dalle radici delle corna dorsali del midollo spinale congelate, sono stati preparati come descritto nel protocollo (Milanese et al., 2011). Le frazioni di midollo spinale dorsale sono state omogeneizzate a 4°C, utilizzando un omogeneizzatore teflon/vetro in saccarosio ghiacciato 0,32 M, tamponato con Tris-HCl a pH 7.4. Il tessuto omogeneizzato è stato centrifugato per 5 minuti, 1000 g a 4°C al fine di rimuovere i residui nucleari e cellulari. A questo punto, il surnatante è stato fatto depositare in 4 strati (2, 6, 10 e 20% v/v in Tris-HCl/saccarosio), tramite la centrifugazione in gradiente discontinuo di Percoll®; dopo un'ulteriore centrifuga per 5 minuti a 33,500 g a 4°C, le porzioni al 10% e

al 20% sono state raccolte, lavate tramite una centrifugazione per 15 minuti a 20,200 x g a 4°C e risospese in un medium fisiologico a pH 7.4 contenente: NaCl 140 mM, KCl 3mM, MgCl<sub>2</sub> 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, Hepes 10 mM e glucosio 10 mM.

La concentrazione proteica di ciascun campione è stata determinata con il metodo Bradford, usando l'albumina di siero bovino come standard (Lowry et al., 1951).

## • **Stimolazione dei sinaptosomi**

I sinaptosomi sono stati incubati a 37°C per 15 minuti; sono state preparate delle aliquote della sospensione sinaptosomiale che sono state poi stratificate su un filtro microporoso posto sul fondo di un set di camere parallele di superfusione mantenute a 37°C (Superfusion System, Ugo Basile, Comerio, Varese, Italia) (Raiteri et al., 1984). La superfusione è iniziata con uno standard alla velocità di 0,5 ml/min e continuata per 48 minuti. Dopo 36 minuti di superfusione, necessari per equilibrare il sistema, i campioni sono stati analizzati nel seguente modo: prima un campione per 3 minuti (t= 36-39 min, rilascio basale), poi un campione per 6 minuti (t=39-45 min, rilascio evocato) ed infine un altro campione per 3 minuti (t=45-48 min, rilascio basale). Dopo 39 minuti è stato applicato un periodo di stimolazione di 90 secondi, che è stato effettuato con KCl 15 mM che sostituisce una concentrazione equimolare di NaCl. Il flusso evocato è stato stimato sottraendo il contenuto del neurotrasmettitore dei due campioni a 3 minuti (flusso basale) dal rilascio evocato del campione a 6 minuti misurato durante e dopo l'impulso depolarizzante (stimolo evocato). Il rilascio dell'amminoacido è stato espresso come pmol/mg di proteina.

## • **Determinazione del rilascio di glutammato**

Il contenuto endogeno di glutammato è stato misurato tramite un'analisi in HPLC con una colonna cromatografica a fase inversa C18 derivatizzata con o-ftalaldeide e un gradiente di separazione (Chrompack, Middleburg, USA), accoppiata ad un fluorometro (lunghezza d'onda di eccitazione: 350 nm; lunghezza d'onda di emissione: 450 nm); come standard interno è stata usata l'omoserina (Molinaro et al., 2013).

Sono stati utilizzate le seguenti soluzioni tampone: solvente A, sodio acetato 0,1 M (pH 5.8)/metanolo (80:20 v/v); solvente B, sodio acetato 0,1 M (pH 5.8)/metanolo (20:80 v/v);

solvente C, sodio acetato (pH 6)/metanolo (80:20 v/v). il programma di eluizione prevede il passaggio in colonna: del solvente C al 100% per 4 minuti; del solvente A al 90% e del solvente B al 10% per un minuto; del solvente A al 42% e del solvente B al 58% per 14 minuti; del solvente B al 100% per un minuto; del flusso isocratico per 2 minuti; e del solvente C al 100% per un minuto. La velocità del flusso viene mantenuta a 0,9 ml/min.

## 3.7 ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

### • Preparazione dei campioni

È stato prelevato il midollo spinale di ogni animale e l'allargamento lombare è stato fissato in paraformaldeide al 4% per 24 ore a 4°C e incorporato in paraffina.

L'analisi immunoistochimica delle cellule immunoreattive per la GFAP è stata condotta su sezioni trasversali di midollo spinale, con uno spessore di 50 µm, ottenute utilizzando un vibratomo (VT 1000 S). L'analisi è stata svolta su sezioni in sospensione, sottoposte ad una moderata agitazione. L'attività perossidasi endogena è stata inibita mediante incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente (RT) in una soluzione di perossido di idrogeno al 3% in metanolo al 30%. Dopo diversi lavaggi, effettuati in un buffer di lavaggio (buffer fosfato 0,1M pH 7.4 contenente 0,3% albumina di siero bovino e 0,3% triton X-100), le sezioni sono state incubate overnight a 4°C con un anticorpo monoclonale di topo anti-GFAP (diluizione 1:500; Clone GA5, Sigma-Aldrich, Tres Cantos, Spagna) diluiti in buffer di lavaggio contenente siero normale di capra (NGS) al 3%. Il giorno successivo le sezioni sono state lavate e incubate con un anticorpo di capra anti-topo biotinilato (diluizione 1:250 in buffer di lavaggio), per 2 ore a RT. In seguito, dopo diversi lavaggi, i campioni sono stati sottoposti ad un'incubazione di 90 minuti a RT con un complesso avidina-biotina-perossidasi (diluizione 1:250; ImmunoPure ABC peroxidase staining kit). Il prodotto di reazione è stato rilevato mediante incubazione con 3,3'-diamminobenzide (2 µg/ml) e perossido di idrogeno allo 0,01% in buffer fosfato 0,1M (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Alla fine dell'analisi le sezioni sono state disidratate, montate su vetrini con gelatina, coperte ed esaminate al microscopio Leica DMRB-E.

## • **Analisi morfometrica**

A seguito della procedura immunohistochimica, mediante l'analisi morfometrica è stato valutato il numero delle cellule immunoreattive per la GFAP presente nelle sezioni delle corna dorsali del midollo spinale. Il numero di tali cellule è stato stimato grazie all'uso di un dissectore ottico (Tapia-Gonzalez et al., 2008), utilizzando sezioni con uno spessore pari all'altezza del dissectore (Hatton and von Bartheld, 1999) e una finestra di conteggio di 55 x 55 µm. Per ogni animale è stato valutato un numero totale di 10 riquadri.

Lo spessore delle sezioni è stato misurato utilizzando uno strumento digitale (Heidenhain-Metro MT 12/ND221, Traunreut, Germania) accoppiato ad un microscopio Leitz. I nuclei delle cellule immunoreattive sono stati contati per ogni piano focale ritrovato percorrendo l'intero spessore della sezione.

## **3.8 COLTURE CELLULARI**

Colture primarie di neuroni sensoriali sono state ottenute in seguito alla dissociazione enzimatica dei DRG isolati da ratti Sprague Dawley maschi adulti di 3 mesi di età mediante 0,25% di tripsina e 1% di collagenasi in terreno di coltura L-15 (Leibovitz, Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

La dissociazione è avvenuta mantenendo le cellule per 1 ora nell'incubatore in presenza di collagenasi 1% e successivamente altri 30 minuti dopo aver aggiunto la tripsina 0,25%.

Successivamente è stato aggiunto il siero fetale bovino (FBS) per bloccare l'azione della tripsina, le cellule sono state centrifugate per 5 minuti (1 minuto a 3000 g e 4 minuti a 1500 g). Dopo aver rimosso il surnatante è stato aggiunto un volume di terreno di coltura (DMEM contenente 10% siero e 1% di penicillina e streptomina) in quantità limitante e tale da poter piastrare le cellule in modo che aderiscano alla superficie delle piastre di coltura

Dopo aver dissociato meccanicamente la sospensione cellulare con l'uso del puntale le cellule sono state piastrate su petri di 35 mm di diametro pretrattate con poli-D-lisina e collagene e mantenute per 20 minuti in incubatore in modo da favorire l'adesione cellulare. A questo punto è stato aggiunto il terreno di coltura DMEM contenente 10% siero e 1% di penicillina e streptomina per raggiungere il volume finale.

Dopo 24 ore il terreno è stato cambiato con DMEM basso glucosio (5mM) contenete B-27 1x senza antiossidanti (Life Technologies, Monza, Italia), 1% di penicillina e streptomina e Ara-C 10  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Le cellule sono state lasciate 72 ore in incubatore, al termine delle quali il terreno di coltura è stato sostituito con DMEM basso glucosio (5mM) contenete B-27 1x senza antiossidanti, 1% di penicillina e streptomina e trattate con glucosio alla concentrazione di 40 mM che equivale ad un incremento di 1,8 volte rispetto al controllo che è simile ad un incremento pari a 1,4 volte rispetto alla concentrazione di glucosio nel sangue che viene misurato nei soggetti diabetici rispetto ai soggetti sani (Mayfield et al., 1998). A seconda del gruppo sperimentale le cellule sono state trattate con DHT (10  $\mu$ M), 3 $\alpha$ -diolo (1nM), muscimolo (agonista selettivo del recettore GABA-A, 1nM) e bicucullina (antagonista del recettore GABA-A, 1nM). Dopo 24 ore il terreno è stato rimosso e le cellule sono state raccolte in Trizol (Life Technologies, Monza, Italia) per la successiva estrazione dell'RNA.

### **3.9 ANALISI STATISTICA**

I dati quantitativi ottenuti sono stati analizzati con metodi statistici che potessero adattarsi ai protocolli sperimentali e alla natura dei dati stessi. Quindi, dopo averne verificato la normalità con il test di Kolmogorov-Smirnov, i dati sono stati analizzati con il T-test di Student, in caso di coppie di parametri indipendenti, o con l'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguito dai post-test Tukey-Kramer, in caso di esperimenti con più di due variabili. Una  $p \leq 0,05$  indica che il parametro osservato è statisticamente significativo.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con GraphPad PRISM (versione 5).

## 4. RISULTATI

Come precedentemente discusso, gli ormoni sessuali influenzano la percezione del dolore: diversi studi dimostrano infatti come gli androgeni, e in particolare il testosterone, esercitino un'azione analgesica nell'uomo (Ceccarelli et al., 2003; Aloisi and Bonifazi, 2006).

In questa sperimentazione si è voluto indagare il possibile ruolo analgesico del DHT e del  $3\alpha$ -diolo, metaboliti del testosterone, sul dolore evocato dalla neuropatia diabetica utilizzando un modello sperimentale di diabete di tipo 1 ottenuto mediante una singola iniezione intraperitoneale di STZ in ratti maschi adulti di ceppo Sprague-Dawley. Gli animali sono stati trattati a giorni alterni per 30 giorni con DHT,  $3\alpha$ -diolo o con il solo veicolo di scioglimento (olio di sesamo).

Nello studio da noi condotto sono stati confrontati tre gruppi sperimentali di ratti di pari età: non diabetici (controllo, CTR) , diabetici trattati con il solo veicolo (STZ), diabetici trattati con DHT (STZ+DHT) e diabetici trattati con  $3\alpha$ -diolo (STZ+ $3\alpha$ -diolo).

Come riportato in Tabella 4, i ratti diabetici presentano, alla fine dell'esperimento, una maggiore quantità di glucosio nel sangue e, come atteso, un minore aumento ponderale rispetto ai ratti controllo.



Tabella 4

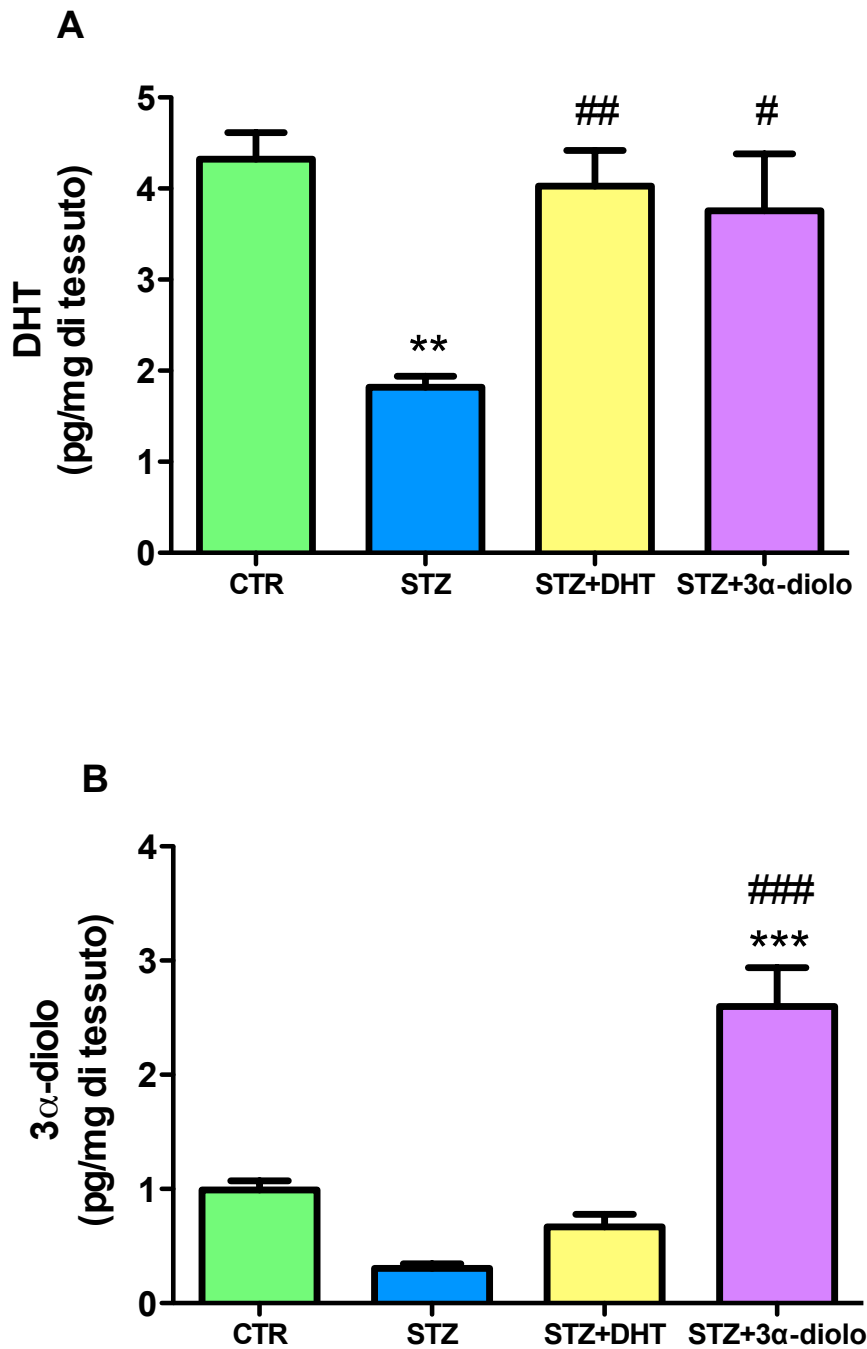
## Peso corporeo e livelli di glucosio nel sangue

Animali	Peso corporeo (g)		Glicemia (mg/100ml)	
	Prima dell'iniezione di STZ	Al sacrificio	Al sacrificio	
CTR	310,5 ± 7,12	551,1 ± 36,0	121,7 ± 19,15	
STZ	325,8 ± 7,17	336,5 ± 43,16 ***	481,3 ± 43,16 ***	
STZ+ DHT	326,7 ± 8,27	327,0 ± 41,98 ***	504,5 ± 38,45 ***	
STZ+3 $\alpha$ -diolo	321,3 ± 10,1	310,9 ± 43,2 ***	456,9 ± 48,7 ***	

**Tabella 4:** peso corporeo e glicemia dei ratti controllo e diabetici. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguito dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \*\*\*P < 0.001 vs CTR. n° animali controllo: 12; n° animali STZ 12; n° animali DHT: 12; n° animali 3 $\alpha$ -diolo: 12

## 4.1. ANALISI DEI LIVELLI DI DHT E 3 $\alpha$ -DIOLO NEL MIDOLLO SPINALE

L'analisi quantitativa degli steroidi neuroattivi tramite LC-MS/MS rivela che, ad un mese dall'induzione della patologia, si verifica una diminuzione significativa dei livelli di DHT nel midollo spinale dei ratti diabetici (Fig. 22A). Al contrario, il diabete, non influenza significativamente i livelli di 3 $\alpha$ -diolo (Fig. 22B). In seguito alla somministrazione di DHT si osserva un aumento significativo dei suoi livelli che vengono riportati a valori simili a quelli del gruppo CTR (Fig. 22A). Lo stesso trattamento non influenza significativamente i livelli di 3 $\alpha$ -diolo (Fig. 22B). La somministrazione di 3 $\alpha$ -diolo ne aumenta significativamente i livelli rispetto al gruppo CTR e STZ (Fig. 22B). Lo stesso trattamento induce un aumento significativo dei livelli di DHT rispetto al gruppo STZ (Fig. 22A).



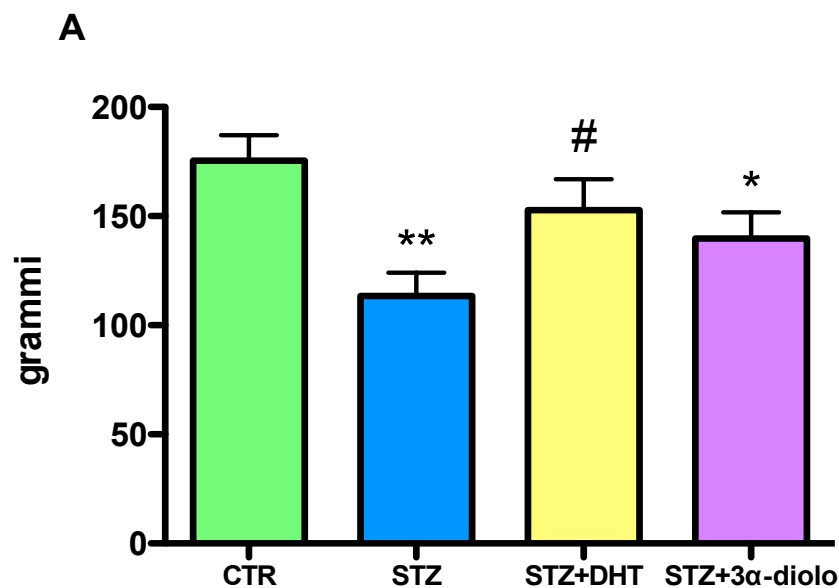
**Figura 22.** Livelli degli steroidi neuroattivi nel midollo spinale dei ratti controllo, diabetici, diabetici trattati con DHT e diabetici trattati con 3α-diolo. Il DHT (pannello A) e il 3α-diolo (pannello B) sono stati analizzati con LC-MS/MS. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs CTR; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$  vs STZ ( $n=6$  per ogni gruppo).

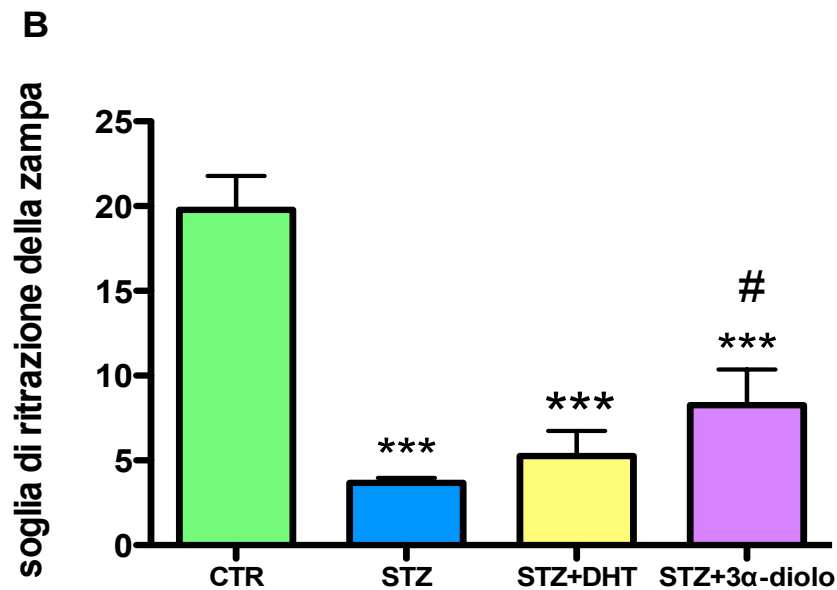
## 4.2. VALUTAZIONE DELLA SENSAZIONE DOLORIFICA NEGLI ANIMALI DIABETICI

Per poter analizzare la presenza e l'entità del dolore nelle sue varie forme di espressione (iperalgisia meccanica e allodinia), sono stati eseguiti due *test* comportamentali, ciascuno in grado di valutare una componente dolorifica specifica:

- test di Randall-Selitto, per l'iperalgisia meccanica (Fig. 23A).
- test di Von Frey, per l'allodinia meccanica (Fig. 23B).

Come riportato in figura 23A e 23B, già ad un mese dall'insorgenza della patologia diabetica si osserva un'abbassamento della soglia dolorifica in entrambi i test. Nel test di Randall Selitto il trattamento con DHT contrasta completamente questa diminuzione (Fig. 23A), mentre il 3 $\alpha$ -diolo risulta inefficace. Per quanto riguarda il test di Von Frey, solamente il trattamento con il 3 $\alpha$ -diolo sembra esercitare un effetto analgesico anche se non contrasta completamente l'effetto del diabete (Fig. 23B). Il trattamento con DHT è inefficace su questo parametro.



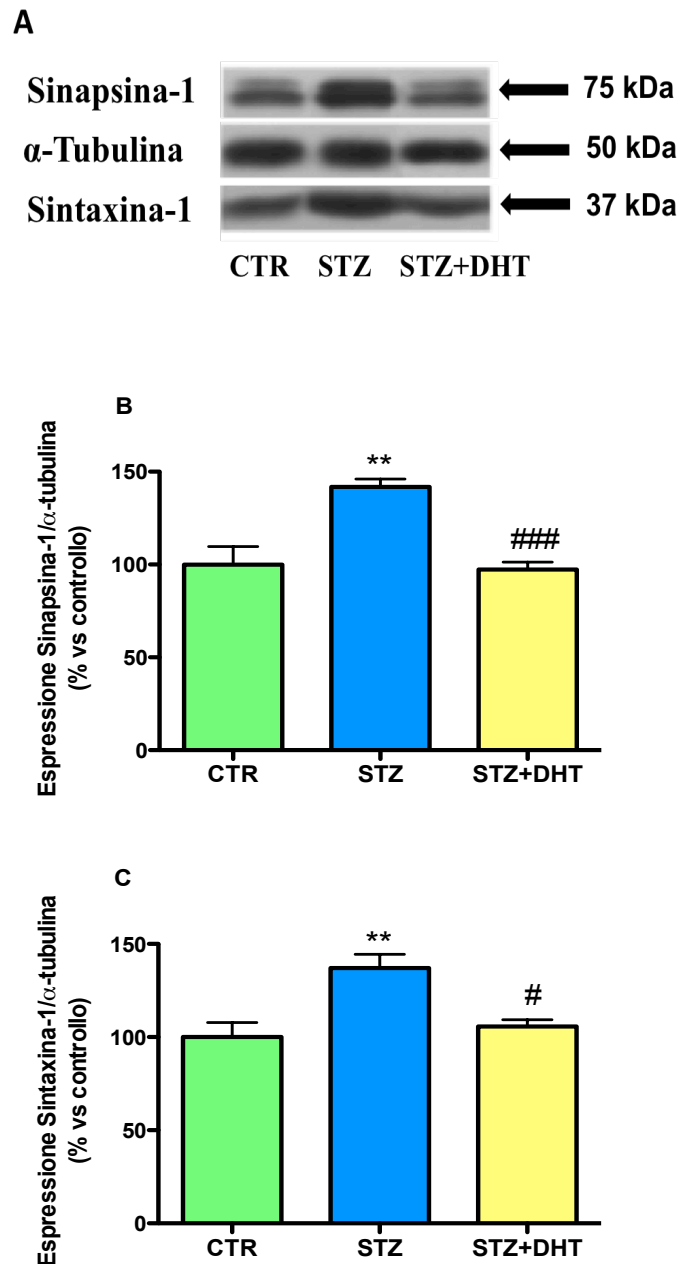


**Figura 23. Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT o 3α-diolo sull' iperalgesia meccanica e sull'allodinia tattile.** (A), la soglia di iperalgesia meccanica è stata quantificata mediante il test di Randall Selitto. (B), la soglia dell'allodinia tattile è stata valutata con il test di Von Frey. Il diabete induce lo sviluppo di iperalgesia meccanica (A) e di allodinia tattile (B) nella zampa dei ratti. La somministrazione di DHT impedisce l'iperalgesia meccanica (A), mentre la somministrazione di 3α-diolo riduce l'allodinia tattile (B). Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media ± SEM \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs CTR; # $p < 0.05$  vs STZ ( $n=12$  per ogni gruppo)).

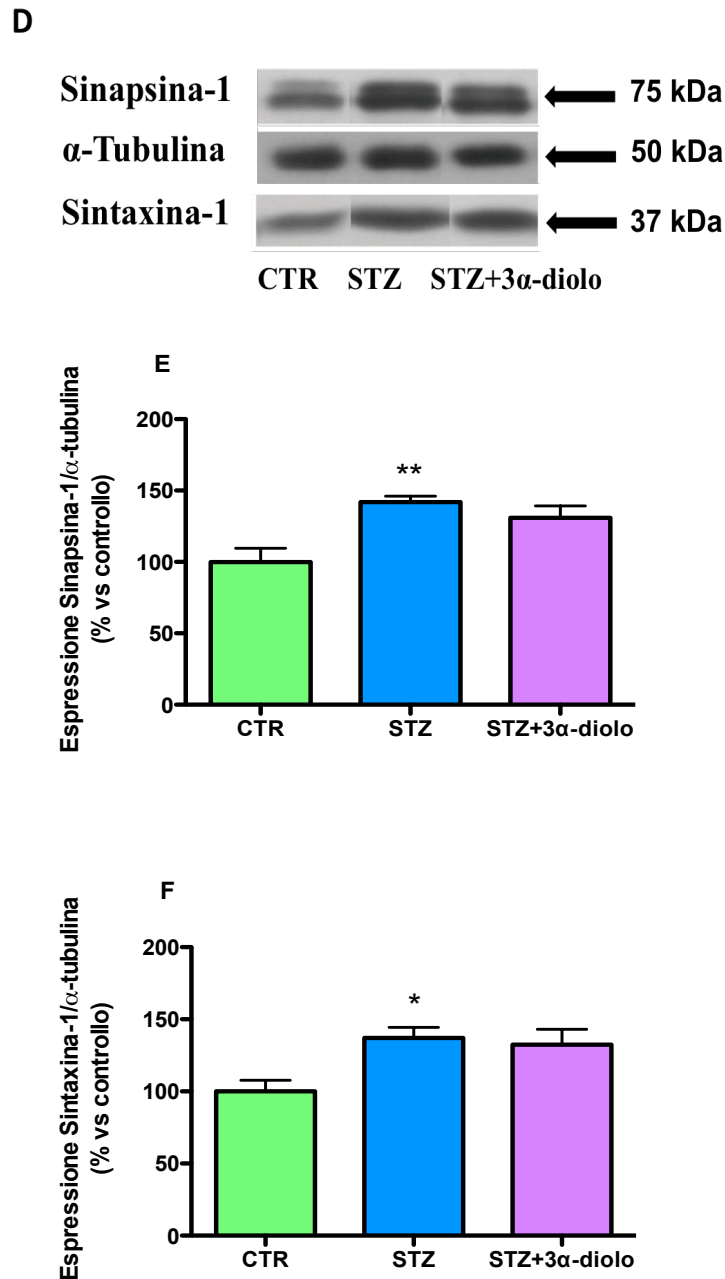
### **4.3. LIVELLI DI ESPRESSIONE DELLE PROTEINE PRE- E POST-SINAPTICHE E RILASCIO DI GLUTAMMATO NEI RATTI DIABETICI**

Gli effetti del DHT e del 3 $\alpha$ -diolo sono stati valutati nelle componenti pre- e post-sinaptiche della trasmissione glutammatergica. L'espressione delle proteine pre-sinaptiche, come sinapsina-1 e syntaxina-1 (Fig.24) sono state valutate nelle corna dorsali del midollo spinale. Il diabete induce un aumento di espressione di entrambe queste proteine e il trattamento con DHT (Figura 24A, B e C), ma non con 3 $\alpha$ -diolo (Figura 24 D, E e F), è in grado di contrastare completamente questo aumento. In accordo, come riportato in figura 25, il rilascio basale endogeno (pannello A) e quello stimolato con KCl (pannello B) di glutammato aumenta nei sinaptosomi isolati dalle corna dorsali del midollo spinale dei ratti STZ rispetto al gruppo CTR. Il trattamento con DHT o 3 $\alpha$ -diolo contrasta completamente l'effetto dell'STZ (Fig. 25).

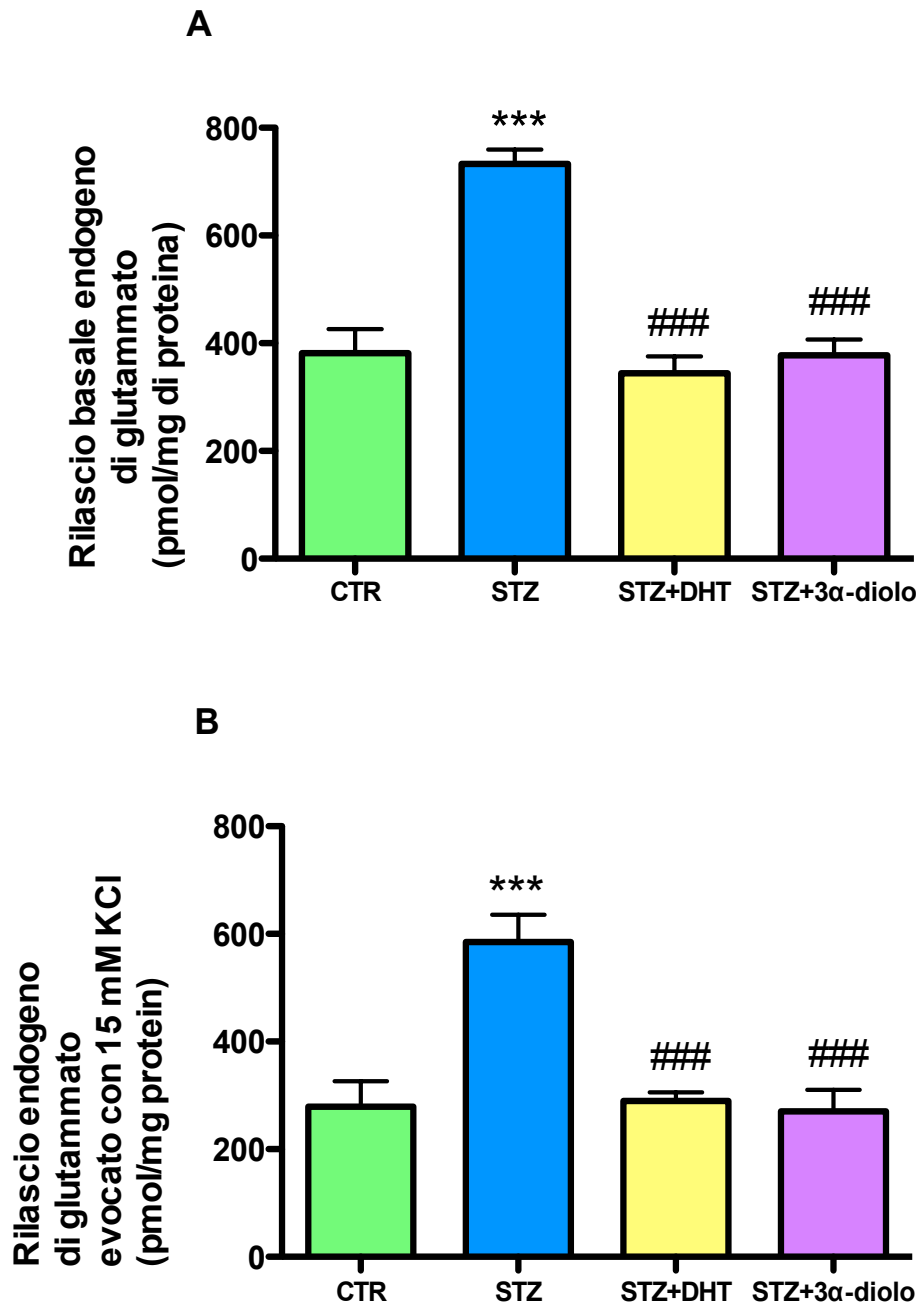
L'espressione delle proteine post-sinaptiche, PSD-95, GluN1, GluN2A e GluN2B è stata analizzata nei TIF isolati dalle corna dorsali del midollo spinale, ma nessuna delle proteine analizzate viene influenzata dal diabete (Fig. 26).



**Figura 24.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT sull'espressione delle proteine presinaptiche nelle corna dorsali del midollo spinale. (A), Western blot rappresentativo di Sinapsina-1 e di Sintaxina-1. (B, C), I livelli di Sinapsina-1 (B) e di Sintaxina-1 (C) sono stati normalizzati rispetto all' $\alpha$ -tubulina. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM ed espressi come percentuale dei valori rispetto al gruppo non diabetico (CTR) \*\* $p < 0.01$  vs CTR; # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$  vs STZ ( $n=6$  per ogni gruppo).

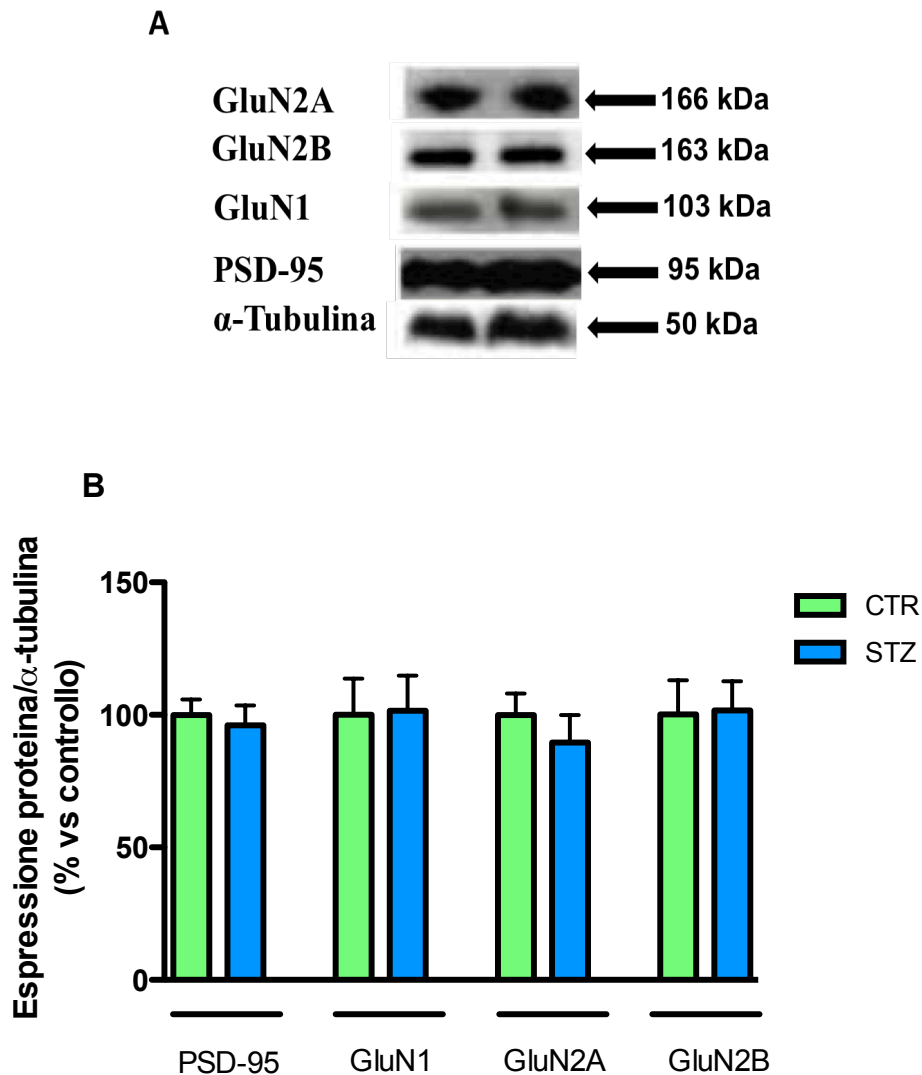


**Figura 25.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento 3 $\alpha$ -diolo sull'espressione delle proteine presinaptiche nelle corna dorsali del midollo spinale. (D), Western blot rappresentativo di Sinapsina-1 e di Sintaxina-1. (E, F), I livelli di Sinapsina-1 (E) e di Sintaxina-1 (F) sono stati normalizzati rispetto all' $\alpha$ -tubulina. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM ed espressi come percentuale dei valori rispetto al gruppo non diabetico (CTR) \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs CTR; (n=6 per ogni gruppo).



**Figura 26.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT o 3α-diolo sul rilascio basale ed evocato di glutammato nelle corna dorsali del midollo spinale. (A), Rilascio basale di glutammato. (B), Rilascio di glutammato evocato con KCl. Il diabete induce un aumento del rilascio di glutammato sia basale che evocato misurato nei sinaptosomi isolati dalle corna dorsali del midollo spinale. Il trattamento con DHT e 3α-diolo contrasta questo aumento. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$  vs CTR; <sup>###</sup> $p < 0.001$  vs STZ (A:  $n=8$  CTR e  $n=7$  per STZ, DHT e 3α-diolo. B:  $n=9$  per CTR e DHT;  $n=6$  per STZ e 3α-diolo).

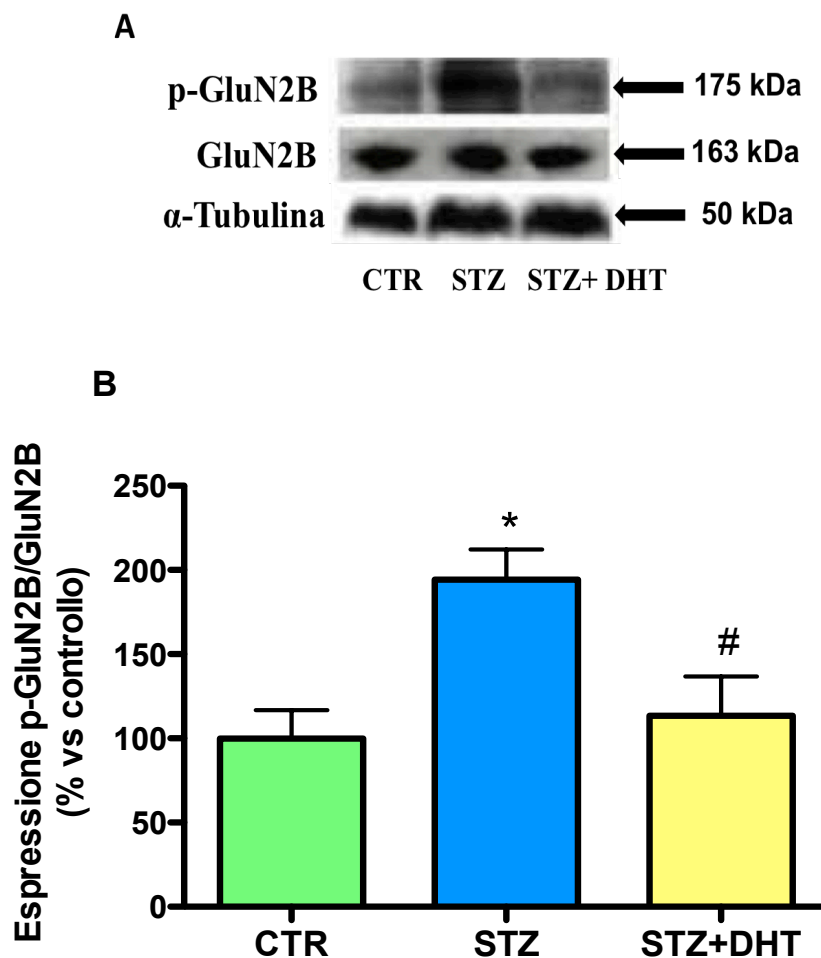


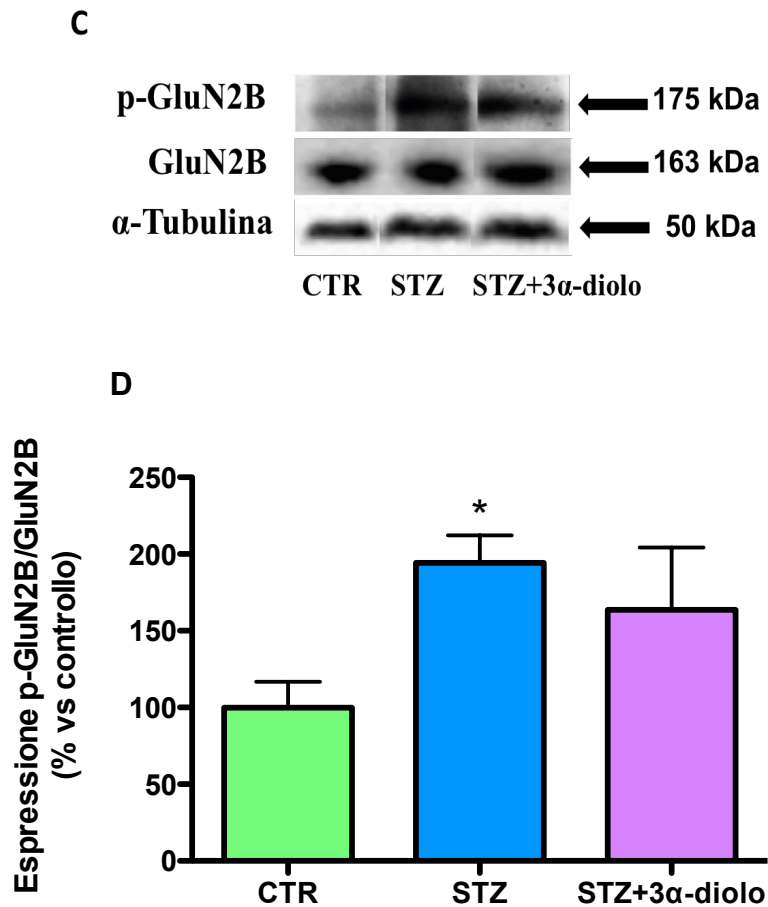


**Figura 27. Effetto del diabete sui livelli di PSD-95, GluN1, GluN2A e GluN2B nelle corna dorsali del midollo spinale.** Le proteine post-sinaptiche sono state analizzate mediante Western blot sulla frazione post-sinaptica insolubile al triton (TIF) ottenuta dalle corna dorsali del midollo spinale. (A), Western blot rappresentativo. (B), Livelli di PSD-95, GluN1, GluN2A e GluN2B espressi come percentuale dei valori rispetto al gruppo non diabetico (CTR). Per l'analisi statistica è stata eseguito il t test di Student. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. n=6 per ogni gruppo).

## 4.4. FOSFORILAZIONE DEL RECETTORE NMDA

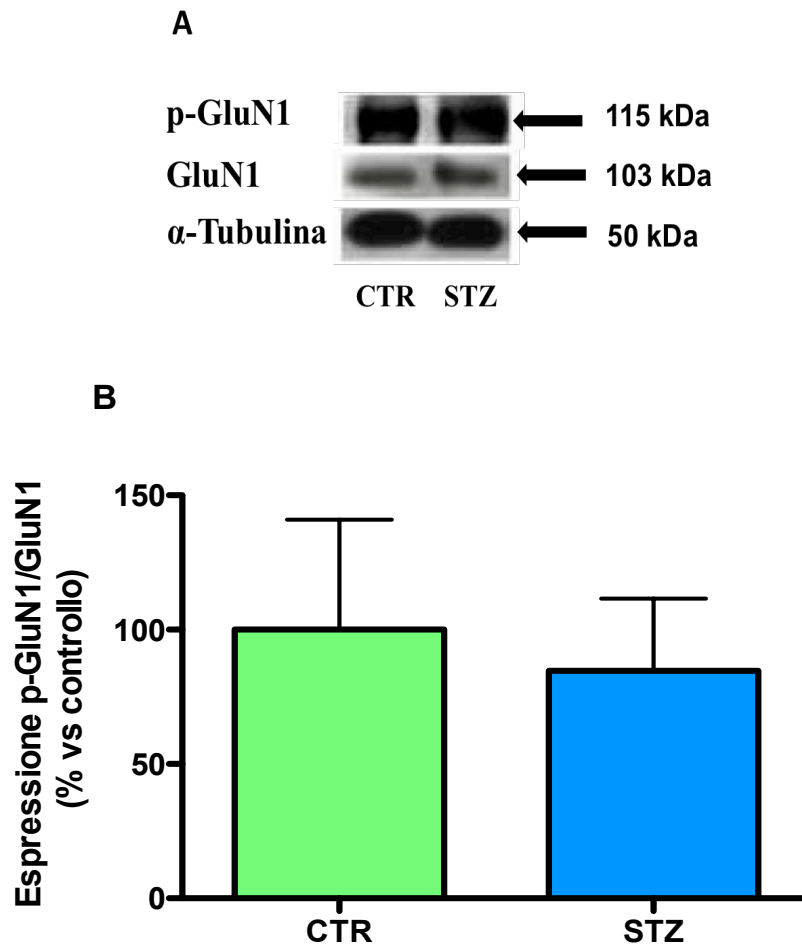
L'attività del recettore NMDA è modulata dalla fosforilazione mediata da diverse proteine con attività chinasi, in particolare, dalla PKC e di Src (Xiong et al., 1998; Yu et al., 1997). Come mostrato in figura 26, il diabete aumenta la fosforilazione Src-dipendente della subunità GluN2B in Tirosina 1472 (pGluN2B Y1472; Fig. 25A e B). Il trattamento con DHT è in grado di contrastare l'aumento di pGluN2B evocato dal diabete (Fig. 25A e B), mentre il trattamento con 3 $\alpha$ -diolo risulta inefficace (dati non mostrati). Dall'altro lato il diabete non influenza la fosforilazione PKC-dipendente di GluN1 sulla Ser896 (pGluN1 S896, Fig. 25C e D).





**Figura 28. Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT o 3α-diolo sui livelli pGluN2B nelle corna dorsali del midollo spinale.**

I livelli di GluN2B fosforilato in tirosina 1472 (pGluN2B) sono stati valutati mediante Western blot eseguito sulle frazioni post-sinaptiche insolubili al triton (TIF) ottenute dalle corna dorsali del midollo spinale. (A-D). Western blot rappresentativo di pGluN2B. (B, D), Livelli di pGluN2B normalizzati sui livelli di GluN2B totale ed espressi come percentuale dei valori rispetto al gruppo non diabetico (CTR). Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer (B) o il t test di Student (D). I dati sono espressi come media ± SEM \* $p < 0.05$  vs CTR; <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs STZ ( $n=6$  per ogni gruppo).



**Figura 29. Effetto del diabete in presenza sui livelli di pGluN1 nelle corna dorsali del midollo spinale.**

I livelli di GluN1 fosforilato in serina 896 (pGluN1 S896) sono stati valutati mediante Western blot eseguito sulle frazioni post-sinaptiche insolubili al triton (TIF) ottenute dalle corna dorsali del midollo spinale. (A,B). Western blot rappresentativo di pGluN1 (A). Livelli di pGluN1 espressi come percentuale dei valori rispetto al gruppo non diabetico (CTR) (B). Per l'analisi statistica è stata eseguito il t test di Student. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM (n=6 per ogni gruppo).

## 4.5. ESPRESSIONE DELLA SOSTANZA P, ATTIVAZIONE GLIALE E TSPO

L'analisi dell'espressione genica della SP nei gangli delle radici dorsali ha rivelato un aumento di espressione negli animali diabetici che viene completamente contrastato in seguito al trattamento con  $3\alpha$ -diolo (Fig. 27). Al contrario, il trattamento con DHT non ha effetto sulla modulazione di questo parametro.

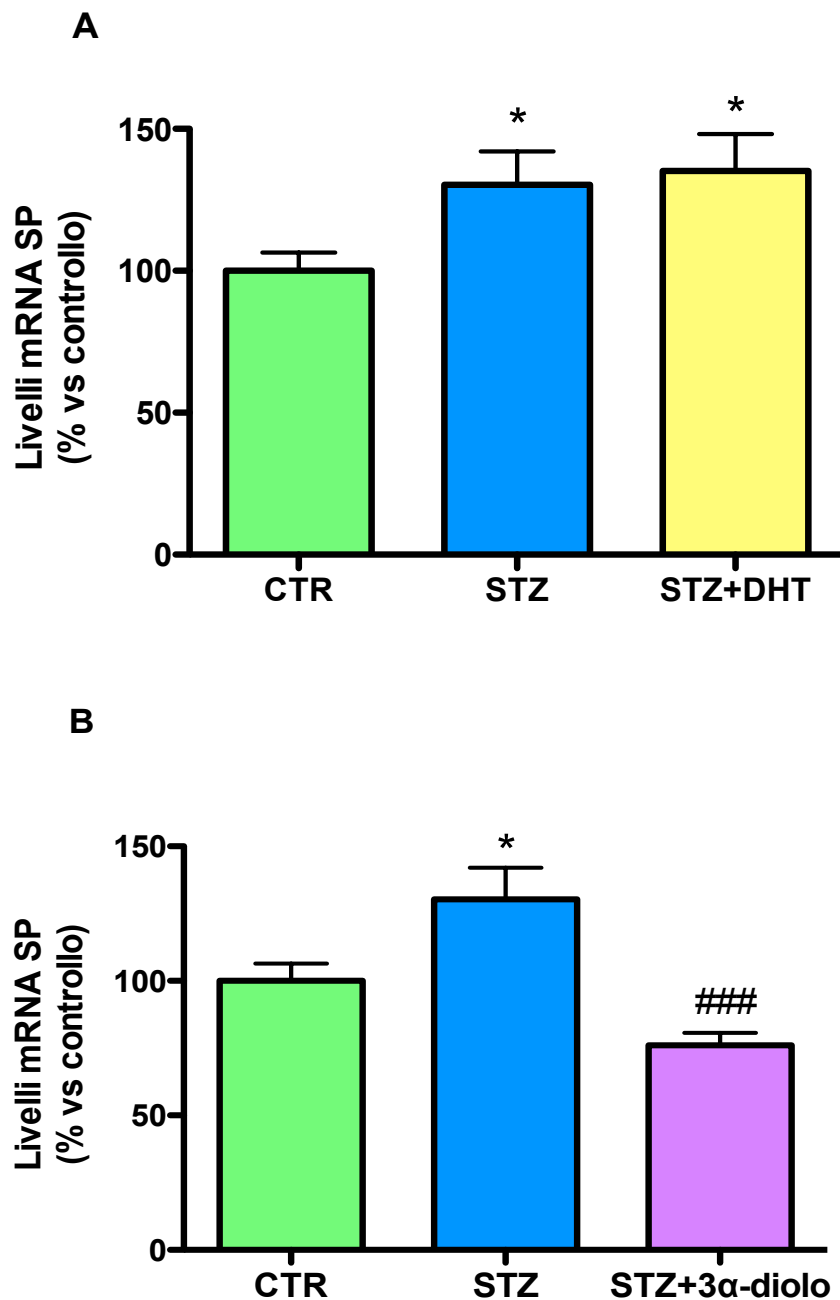
La valutazione del numero delle cellule immunoreattive alla GFAP nelle lamine I e II delle corna dorsali del midollo spinale ha mostrato che il diabete induce un aumento di questo parametro. Sia il trattamento con DHT che con il  $3\alpha$ -diolo sono in grado di diminuire significativamente il numero delle cellule immunoreattive alla GFAP negli animali diabetici (Fig.28).

Inoltre il diabete è in grado di indurre, sempre nelle corna dorsali del midollo spinale, un aumento dei livelli di mRNA di TLR4 (Fig.29A), di citochine pro-infiammatorie, come Il-1 $\beta$  (Fig.30) e TNF- $\alpha$  (Fig.29B) e di citochine anti-infiammatorie, come TGF $\beta$ -1 (Fig. 29C) e di TSPO (Fig. 29D).

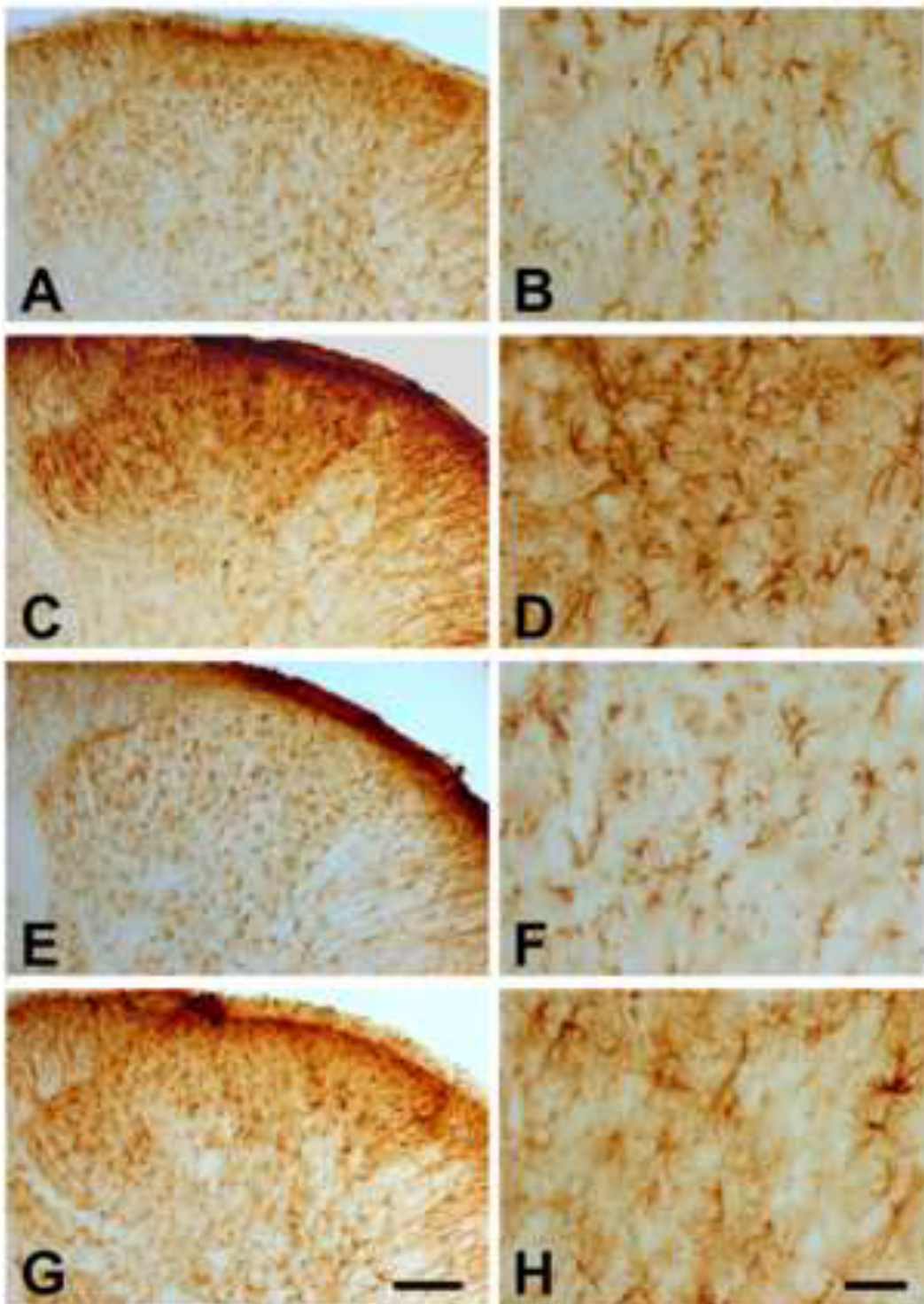
Il trattamento con  $3\alpha$ -diolo è in grado di opporsi agli effetti osservati su tutti questi parametri (Fig. 29A-D e 30). Il trattamento con DHT è efficace nel modulare l'espressione genica di Il-1 $\beta$  (Fig. 30) ma non l'espressione di TLR4, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ -1 e TSPO.

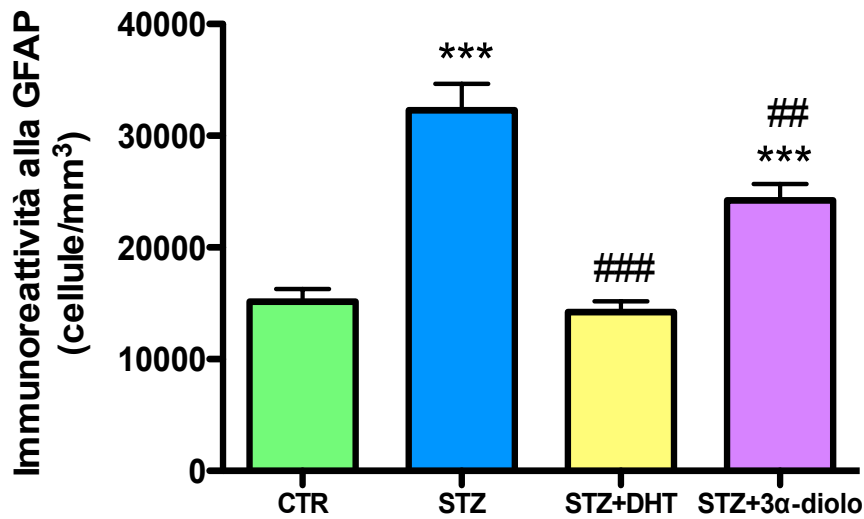
L'aumento di espressione di SP è stato osservato anche nelle colture cellulari primarie di DRG trattate con solo glucosio. Il trattamento con  $3\alpha$ -diolo e con muscimolo (agonista selettivo del recettore GABA-A) è in grado di opporsi a tale aumento, mentre il trattamento con bicucullina (antagonista del recettore GABA-A) sembra bloccare l'azione inibitoria del  $3\alpha$ -diolo sull'espressione della SP, facendo quindi ipotizzare che l'inibizione dell'espressione della SP sia mediata dall'attivazione specifica e selettiva del recettore GABA-A.

Nessun effetto, infatti, è stato osservato in seguito al trattamento delle cellule con DHT (Fig. 34)



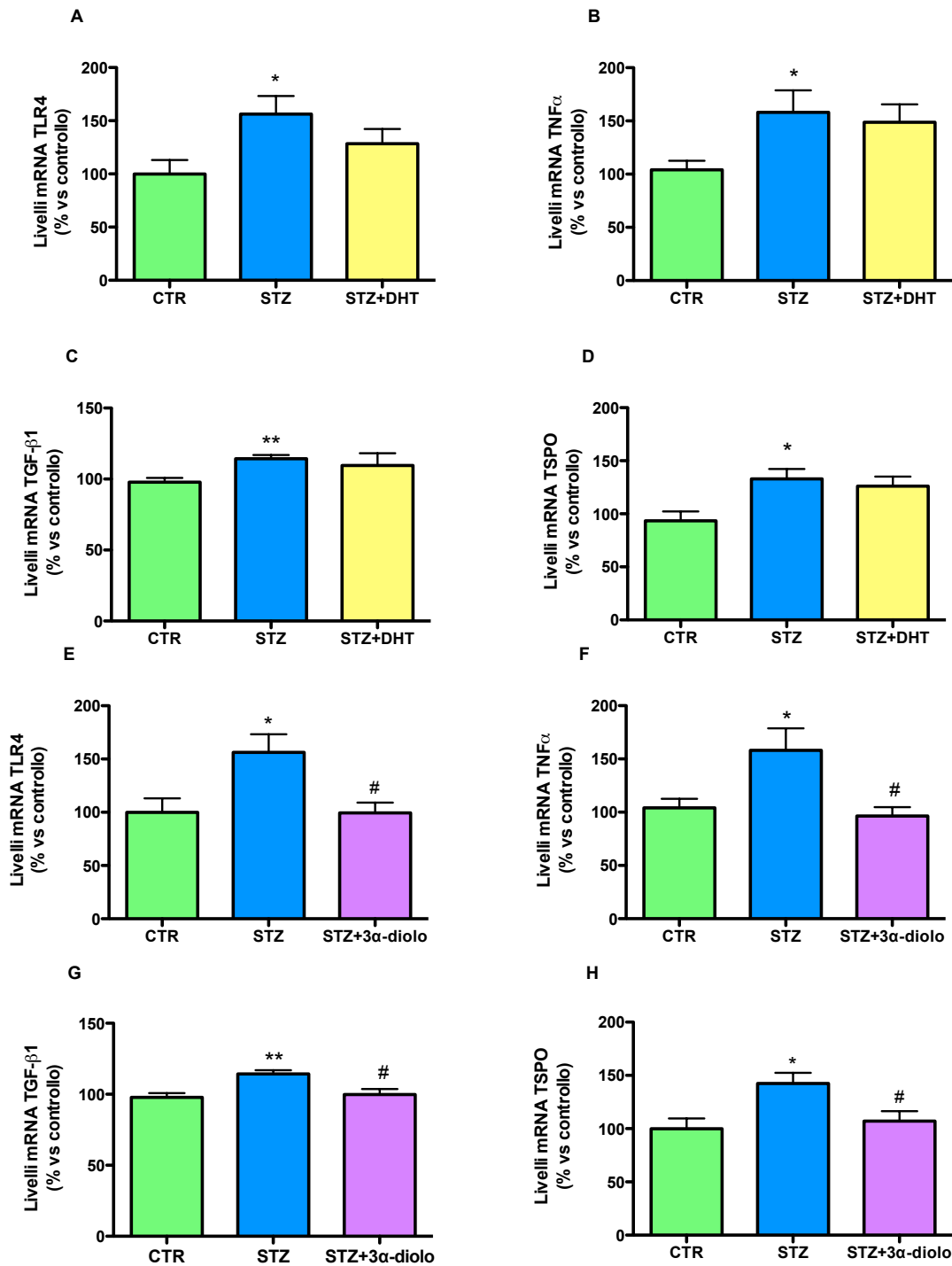
**Figura 30.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT o 3α-diolo sui livelli di espressione dell'mRNA della SP nei DRG. I livelli di mRNA della SP sono stati valutati nei DRG del gruppo non diabetico (CTR), diabetico (STZ), diabetico trattato con DHT (STZ+DHT) e diabetico trattato con 3α-diolo (STZ+3α-diolo). Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media ± SEM \* $p < 0.05$  vs CTR; ### $p < 0.001$  vs STZ (n=6 per CTR e STZ; n=7 per 3α-diolo).



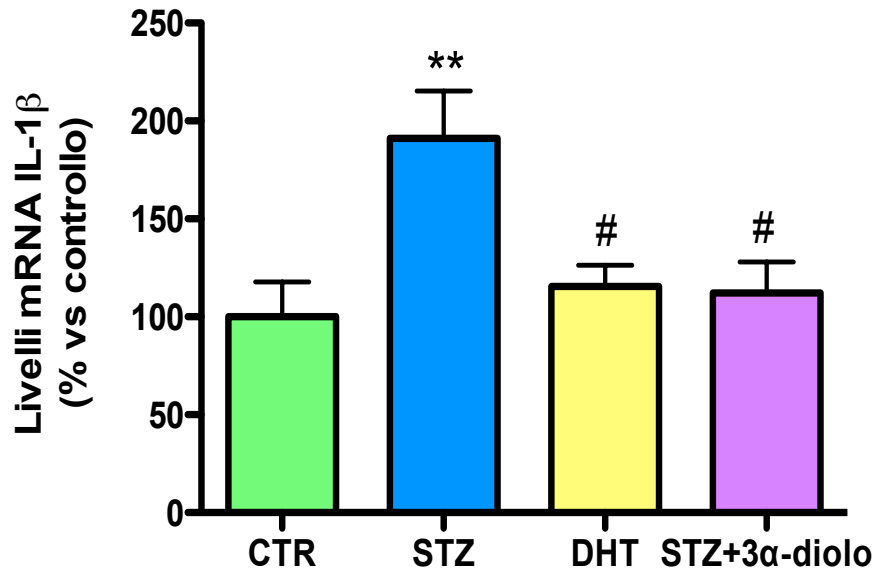


**Figura 31.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT o 3 $\alpha$ -diolo sul numero degli astrociti immunoreattivi alla GFAP nelle corna dorsali del midollo spinale. Immagine rappresentativa delle corna dorsali del midollo spinale immunoreattive alla GFAP: (A,B), animali controllo; (C,D), animali diabetici; (E,F), animali diabetici trattati con DHT; (G,H), animali diabetici trattati con 3 $\alpha$ -diolo. A, C, E e G, vista panoramica. B,D,F e H, ingrandimento della lamina I-III. Scala: 100  $\mu$ m (A,C,E e G) e 30  $\mu$ m (B,D,F e H). Pannello inferiore: numero delle cellule immunoreattive alla GFAP per mm<sup>3</sup> nel gruppo CTR, STZ, STZ+DHT e STZ+3 $\alpha$ -diolo. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \*\*\* $p$  < 0.001 vs CTR; ## $p$  < 0.01, ### $p$  < 0.001 vs STZ (n=8 per CTR; n=7 per STZ; n=10 per DHT e 3 $\alpha$ -diolo).

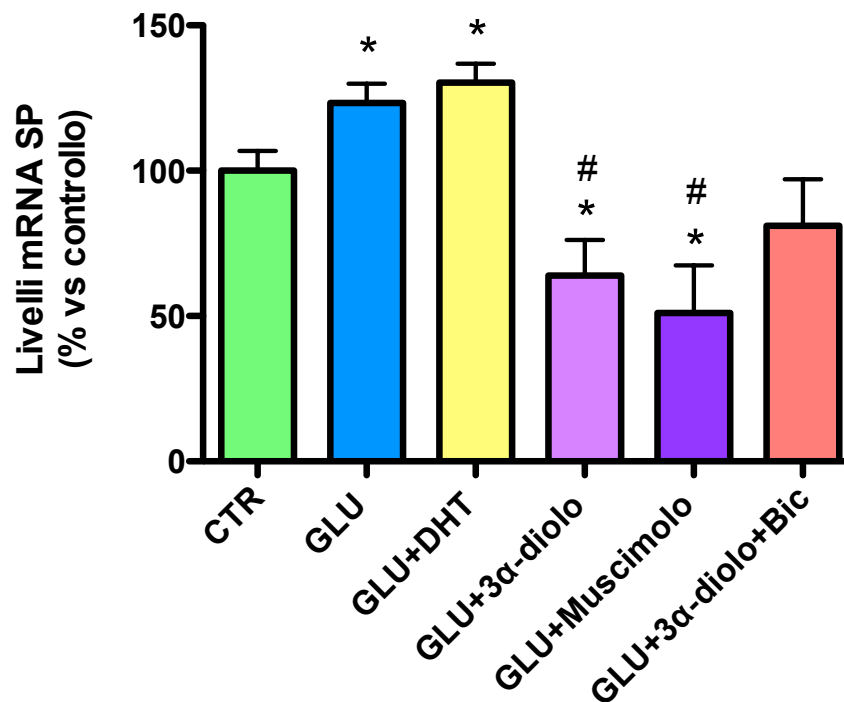




**Figura 32.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT e 3 $\alpha$ -diolo sui livelli di mRNA di TLR4, TNF- $\alpha$ , TGF $\beta$ -1 e TSPO nelle corna dorsali del midollo spinale. I livelli di mRNA di TLR4 (A, E), TNF- $\alpha$  (B, F), TGF $\beta$ -1 (C, G) e TSPO (D, H) sono stati misurati nelle corna dorsali del midollo spinale degli animali non diabetici (CTR), diabetici (STZ) e diabetici trattati con DHT (STZ+DHT) o con 3 $\alpha$ -diolo (STZ+3 $\alpha$ -diolo). Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 vs CTR; # $p$  < 0.05 vs STZ ( $n$ =6 per ogni gruppo).



**Figura 33.** Effetto del diabete in presenza o assenza del trattamento con DHT o 3 $\alpha$ -diolo sui livelli di mRNA di IL-1 $\beta$  nelle corna dorsali del midollo spinale. I livelli di mRNA di IL-1 $\beta$  sono stati misurati nelle corna dorsali del midollo spinale degli animali non diabetici (CTR), diabetici (STZ), diabetici trattati con DHT e diabetici trattati con 3 $\alpha$ -diolo. Per l'analisi statistica è stata eseguita un'analisi della varianza ad una via (One-Way ANOVA) seguita dal post-test Tukey-Kramer. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \*\* $p < 0.01$  vs CTR; # $p < 0.05$  vs STZ ( $n=6$  per ogni gruppo).



**Figura 34.** Effetto del glucosio in presenza o assenza del trattamento con DHT, 3 $\alpha$ -diolo, muscimolo, bicucullina sui livelli di espressione dell'mRNA della SP nelle colture cellulari primarie di DRG. I livelli di mRNA della SP sono stati valutati nelle colture cellulari primarie di DRG in presenza di glucosio (GLU), glucosio e DHT (GLU+DHT), glucosio e 3 $\alpha$ -diolo (GLU+3 $\alpha$ -diolo), glucosio e muscimolo (GLU+Muscimolo), glucosio, 3 $\alpha$ -diolo e bicucullina (GLU+3 $\alpha$ -diolo+Bic). Per l'analisi statistica è stata eseguito il t test di Student. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM \* $p$ < 0.05 vs CTR; # $p$ < 0.05 vs GLU (n=6 per ogni gruppo).

## 5. DISCUSSIONE

I nostri studi condotti in ratti resi diabetici mediante una singola iniezione intraperitoneale di STZ indicano che un mese di diabete induce una diminuzione statisticamente significativa della soglia di nocicezione meccanica e di allodinia tattile. Questi cambiamenti funzionali sono associati a modificazioni delle componenti pre- e post-sinaptiche osservate nelle corna dorsali del midollo spinale. Infatti, abbiamo rilevato un aumento significativo dei livelli delle proteine pre-sinaptiche Sinapsina-1 e Sintaxina-1 nelle corna dorsali degli animali diabetici, che correla con un aumento del rilascio di glutammato sia basale che stimolato. Questi risultati sono in accordo con l'osservazione che la delezione genica di Sinapsina porta ad una diminuzione del rilascio di glutammato e del numero delle vescicole sinaptiche nelle corna dorsali del midollo spinale di topo (Bogen et al., 2006) e causa una riduzione del dolore neuropatico in un modello sperimentale di danno al nervo (Schmidtke et al., 2008). Per questo motivo è ipotizzabile che l'aumento dell'espressione di Sinapsina-1 osservata nelle corna dorsali degli animali diabetici possa essere correlata con la diminuzione della soglia di nocicezione meccanica e di allodinia tattile osservata in questi animali.

Al contrario di quanto accade nel compartimento pre-sinaptico, non viene osservato alcun effetto del diabete sull'espressione delle principali proteine post-sinaptiche, come PSD-95, GluN1, GluN2A e GluN2B nella frazione insolubile al Triton (TIF) ottenuta dalle corna dorsali del midollo spinale, indicando quindi che la conformazione morfo-strutturale della post-sinapsi e la densità recettoriale NMDA non viene influenzata dalla PDN. Comunque nella post-sinapsi l'analisi della fosforilazione attivante Src-dipendente di GluN2B in tirosina 1472 (pGluN2B) ha rilevato un effetto del diabete: gli animali trattati con STZ mostrano un significativo aumento dei livelli di pGluN2B rispetto al gruppo controllo. È noto che la fosforilazione Src-dipendente potenzia la funzione dei recettori NMDA aumentando il tempo di apertura del canale e le probabilità di legare la glicina e il glutammato, portando così ad un aumento delle correnti depolarizzanti (Lavezzari et al., 2003; Nakazawa et al., 2001; Prybylowski et al., 2005). Inoltre, l'aumentata fosforilazione di GluN2B sembra essere associata ad infiammazione e a dolore neuropatico come dimostrato da diversi studi (Gogas, 2006; Liu et al., 2008; Qiu et al., 2011; Yang et al.,

2011). Per questo motivo l'aumento dei livelli di pGluN2B osservato nelle corna dorsali degli animali del gruppo STZ potrebbe essere correlato sia con una diminuzione della soglia di nocicezione meccanica e di allodinia tattile sia con l'aumento della trasmissione glutammatergica osservata in questo modello (Calcutt et al., 1997; Malcangio et al., 1998; Tomiyama et al., 2005).

È stata anche analizzata la fosforilazione PKC-dipendente di GluN1 in serina 896 (pGluN1), poiché precedentemente è stato riportato che i livelli di pGluN1 risultano aumentati nel midollo spinale degli animali diabetici (Daulhac et al., 2011; Rondon et al., 2010). Tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali non è stato osservato alcun cambiamento significativo dei livelli di pGluN1. L'apparente discordanza rispetto ai risultati da noi ottenuti potrebbe essere dovuta al fatto che nel nostro lavoro sono state usate dosi più basse di STZ e che le nostre analisi sono state condotte limitatamente alla frazione post-sinaptica delle corna dorsali; quindi, non è possibile escludere che avvengano alterazioni a carico di pGluN1 in altre frazioni del midollo spinale come osservato da altri ricercatori.

Come ampiamente descritto nei vari dati presenti in letteratura è consolidata l'idea che ruolo chiave nella patofisiologia del dolore e nella neuroinfiammazione è svolto dalla SP, importante neuromodulatore della trasmissione nocicettiva (Lindsay C. et al., 2001).

La SP è sintetizzata nel corpo cellulare dei neuroni sensoriali localizzati nei gangli spinali e quando uno stimolo nocicettivo investe tali fibre la SP viene rilasciata nelle corna dorsali del midollo spinale dove esplicherà funzioni nocicettive e pro-infiammatorie stimolando sia il rilascio di glutammato sia l'attivazione astrogliale.

In accordo con questa osservazione, noi abbiamo dimostrato che l'espressione genica della SP aumenta nei DRG dopo un mese di diabete. Come riportato in diversi modelli sperimentali di dolore neuropatico, un aumento dell'espressione della SP è associato ad un aumento della reattività astrocitaria e al conseguente rilascio di citochine (Ji et al., 2013; Dauch et al., 2012; Milligan et al., 2009; Watkins et al., 2003). Infatti, nel nostro modello di PDN è stato osservato un aumento del numero degli astrociti immunoreattivi alla GFAP ed un aumento dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) ed anti-infiammatorie (TGF $\beta$ -1) nelle corna dorsali del midollo spinale degli animali diabetici. Uno dei possibili meccanismi coinvolti nella produzione di citochine è l'attivazione del recettore TLR4 (Akira et al., 2006; Janeway et al., 2002), che non solo

innesca una cascata di trasduzione di segnale con produzione finale di mediatori dell'infiammazione, ma svolge anche un ruolo chiave nel dolore neuropatico (Wei et al., 2013) in modelli sperimentali di diabete (Yan et al., 2012).

Inoltre, è importante sottolineare come la SP sia in grado di stimolare la via di trasduzione del segnale a valle di TLR4 (Tamizhselvi et al., 2011; Tancowny et al., 2010): l'espressione di TLR4 aumenta nelle corna dorsali dei ratti diabetici e tale evento correla con l'incremento dei livelli di SP nei DRG, con l'aumento di espressione genica delle citochine pro- e anti-infiammatorie e con il numero degli astrociti immunoreattivi alla GFAP nelle corna dorsali del midollo spinale.

L'aumento dell'espressione di TLR4 potrebbe avere conseguenze sulla steroidogenesi locale, poiché in un altro modello sperimentale di dolore neuropatico (ligazione del nervo spinale) è stata dimostrata che l'up-regolazione di TSPO viene contrastata bloccando farmacologicamente TLR4 (Wei et al., 2013). Anche nel nostro modello di PDN si osserva un aumento dell'espressione genica di TSPO che correla con l'aumento di espressione di TLR4, facendo ipotizzare un possibile aumento compensatorio della sintesi degli steroidi neuroattivi nel tessuto in esame.

Gli steroidi neuroattivi, infatti, esercitano molti effetti neuroprotettivi in diversi modelli sperimentali (Brinton, 2013; Brinton et al., 2006; Garcia-Segura et al., 2009; Giatti et al., 2012; Kipp et al., 2012; Melcangi et al., 2010; Melcangi et al., 2011; Panzica et al., 2012; Schumacher et al., 2012), inclusa la neuropatia diabetica (Leonelli et al., 2007; Pesaresi et al., 2010a; Pesaresi et al., 2011; Roglio et al., 2007). Altri studi hanno dimostrato che queste molecole sono efficaci nella modulazione del dolore neuropatico (Goodchild et al., 2000; Jevtovic-Todorovic et al., 2009; Mensah-Nyagan et al., 2009; Patte-Mensah et al., 2013; Todorovic et al., 2004; Winter et al., 2003). Finora, a parte alcune eccezioni (Edinger et al., 2004; Kibaly et al., 2008; Mensah-Nyagan et al., 2008) l'effetto del testosterone e dei suoi metaboliti, DHT) e  $3\alpha$ -diolo, sul dolore neuropatico è stato poco studiato. In questo lavoro noi abbiamo osservato ad un mese dall'induzione del diabete con STZ una riduzione di DHT nel midollo spinale, in accordo con risultati di altri studi che mostrano una riduzione significativa dei livelli di DHT e  $3\alpha$ -diolo nel midollo spinale di ratti maschi a 3 mesi dall'induzione del diabete (Pesaresi et al., 2010b). Per quanto riguarda il  $3\alpha$ -diolo i nostri risultati indicano che ad un mese di diabete la sua concentrazione nel midollo spinale tende solo a diminuire senza raggiungere la

significatività statistica.

I risultati ottenuti dai test comportamentali eseguiti in questo lavoro indicano che il DHT e il 3 $\alpha$ -diolo esercitano attività analgesiche sulla PDN con meccanismi diversi. Il DHT è in grado di contrastare gli effetti esercitati dal diabete sulla soglia di nocicezione meccanica mentre il 3 $\alpha$ -diolo è efficace sull'allodinia tattile. Una simile dicotomia di effetti è stata osservata anche su altri parametri. Infatti, la somministrazione del DHT, a differenza del 3 $\alpha$ -diolo, contrasta negli animali diabetici l'aumento dell'espressione delle proteine pre-sinaptiche (Sinapsina-1 e Sintaxina-1) e della fosforilazione attivante della subunità GluN2B del recettore NMDA, come anche il rilascio di glutammato, sia basale che evocato. Questi effetti sono anche associati ad una diminuzione del numero degli astrociti immunoreattivi alla GFAP e dell'espressione di IL-1 $\beta$ . L'effetto del DHT sulla reattività astrogliale potrebbe essere dovuto ad una duplice azione: *i*) un effetto indiretto sul rilascio di glutammato. Infatti, l'attività principale delle cellule astrogliali è la captazione dell'eccesso di glutammato intersinaptico che potrebbe causare eccitotossicità e neurodegenerazione neuronale (Milligan et al., 2009; Watkins et al., 2003). Quindi l'aumentato rilascio di glutammato basale da noi osservato negli animali diabetici potrebbe causare un aumento della attività di queste cellule deputate alla difesa del tessuto nervoso e il trattamento con il DHT, diminuendone il rilascio, potrebbe determinare uno spegnimento dell'astroglisi; *ii*) un'azione diretta sugli astrociti che sono in grado di esprimere AR (Garcia-Segura et al., 2006). È interessante notare che, anche se non ci sono evidenze in letteratura che riguardano il sistema nervoso, l'interazione del DHT con AR è in grado di diminuire l'espressione di IL-1 $\beta$  nei tessuti periferici (Angele et al., 1999; Beauregard et al., 2004; Khalkhali-Ellis et al., 2002; Xu et al., 2011); è quindi ipotizzabile che la diminuzione dell'espressione di tale citochina possa essere dovuta ad una azione diretta del DHT sulle cellule del sistema nervoso.

Viviani e collaboratori (Viviani et al., 2003) hanno dimostrato che l'IL-1 $\beta$  è coinvolta nella fosforilazione Src-dipendente della subunità GluN2B in colture primarie neuronali ippocampali di ratto; in accordo con quanto da loro osservato, abbiamo riscontrato negli animali diabetici un aumento di espressione genica di tale citochina che correla con un aumento di espressione proteica della subunità pGluN2B.

Diversamente dal DHT il trattamento con 3 $\alpha$ -diolo è in grado di diminuire l'espressione della SP nei DRG degli animali diabetici.

Il rilascio di glutammato e di SP sono strettamente interconnessi. Alcuni ricercatori hanno supposto che nel terminale pre-sinaptico delle afferenze sensoriali primarie siano localizzati dei recettori NMDA, la cui attivazione da parte del glutammato, stimoli il rilascio di SP. Questa è invece in grado di inibire il suo stesso rilascio, in seguito all'interazione con il proprio recettore NK-1 a livello pre-sinaptico, innescando così un meccanismo a feedback negativo. L'attivazione del recettore NMDA, al contrario, favorisce l'internalizzazione di questi recettori NK-1, opponendosi così al feedback negativo e quindi stimolando un continuo rilascio della SP dai DRG ([Malcangio et al., 1998](#)); il rilascio di glutammato dalle corna dorsali del midollo spinale è inoltre stimolato dalla azione diretta della stessa SP mediata da NK-1 (Kangrga et al., 1990), innescando così un meccanismo di amplificazione della trasmissione dolorifica. È quindi ipotizzabile che il  $3\alpha$ -diolo sia in grado di inibire questo processo di auto-alimentazione agendo direttamente sui gangli delle radici dorsali ed influenzando così indirettamente il rilascio di glutammato SP-mediato.

Come il DHT, anche il  $3\alpha$ -diolo è anche in grado di ridurre il numero delle cellule immunoreattive alla GFAP e l'espressione non solo di IL- $1\beta$ , ma di TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 e TSPO.

Complessivamente questi risultati suggeriscono che il DHT e il  $3\alpha$ -diolo utilizzano diversi meccanismi d'azione per esercitare il loro effetto analgesico nella PDN. A questo riguardo, è importante ricordare che il  $3\alpha$ -diolo diversamente dal DHT non interagisce con il recettore AR (Roselli et al., 1987), ma interagisce con il recettore degli estrogeni (ER- $\beta$ ) o con recettori steroidei non classici tra cui il recettore GABA-A (Frye et al., 1996; Gee et al., 1998). Come ampiamente dimostrato, tutti questi recettori sono espressi sia a livello neuronale che astrocitario (Garcia-Segura et al., 2006; Panzica et al., 2012). Per questo motivo una possibile ipotesi sulla dicotomia degli effetti da noi osservati è che siano dovuti all'interazione con AR nel caso del DHT e con ER- $\beta$  e/o GABA-A nel caso del  $3\alpha$ -diolo.

A supporto di questa ipotesi alcuni studi condotti nel nostro laboratorio su colture cellulari primarie di DRG isolati da ratti maschi adulti di ceppo Sprague Dawley e trattati con glucosio per mimare la condizione iperglicemica del diabete hanno dimostrato un'azione inibitoria specifica mediata dal recettore GABA-A sull'espressione genica della SP. In particolare, è stato da noi osservato un aumento dell'espressione della SP nelle cellule trattate con glucosio, aumento che il trattamento con  $3\alpha$ -diolo e muscimolo è in grado di



contrastare. In seguito al trattamento con DHT, invece, non è stato osservato alcun effetto sull'espressione genica della SP, suggerendo che l'attivazione del recettore AR non sembra essere coinvolto nella regolazione dell'espressione di questo gene; al contrario, il trattamento con bicucullina combinato con il 3 $\alpha$ -diolo sembra in grado inibire l'azione di quest'ultimo, dimostrando quindi un'azione specifica sull'inibizione dell'espressione della SP mediata dall'attivazione del recettore GABA-A.

Poiché il 3 $\alpha$ -diolo può essere retroconvertito in DHT (Melcangi et al., 2008) e poiché la somministrazione di 3 $\alpha$ -diolo aumenta significativamente i livelli di DHT nel midollo spinale, l'azione del 3 $\alpha$ -diolo potrebbe essere in parte mediata dal suo precursore. Ma, sebbene il 3 $\alpha$ -diolo aumenti i livelli di DHT nel midollo spinale, non è in grado di mimare pienamente gli effetti di quest'ultimo. Tutto ciò suggerisce che l'attivazione di ER- $\beta$  e/o del recettore GABA-A da parte del 3 $\alpha$ -diolo potrebbe inibire alcune delle azioni del DHT. Una possibile ipotesi potrebbe essere una down-regolazione dell'espressione di AR; infatti è stato osservato, sebbene in un modello cellulare, una diminuzione dell'espressione di AR in seguito all'attivazione di ER- $\beta$  (Bektic et al., 2004). Esperimenti futuri con i ligandi di ER- $\beta$  o del recettore GABA-A saranno necessari per chiarire il loro coinvolgimento nel dolore neuropatico.

In conclusione, i nostri risultati indicano che il DHT e il 3 $\alpha$ -diolo attraverso differenti meccanismi esplicano attività analgesiche sulla PDN. Questi risultati suggeriscono che, almeno per quanto riguarda i pazienti maschi, i metaboliti del testosterone sono dei validi candidati per il trattamento della PDN.

# 6. BIBLIOGRAFIA

- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
- Akwa Y, Sananes N, Guezou M, Robel P, Baulieu EE, Le Goascogne C (1993) Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnenolone and dehydroepiandrosterone. Regulation by cell density. *The Journal of cell biology* 121:135-143.
- Aloisi AM, Bonifazi M (2006) Sex hormones, central nervous system and pain. *Hormones and behavior* 50:1-7.
- Amann R, Schuligoi R, Herzeg G, Donnerer J (1996) Intraplantar injection of nerve growth factor into the rat hind paw: local edema and effects on thermal nociceptive threshold. *Pain* 64:323-329.
- Amthor KF, Dahl-Jorgensen K, Berg TJ, Heier MS, Sandvik L, Aagenaes O, Hanssen KF (1994) The effect of 8 years of strict glycaemic control on peripheral nerve function in IDDM patients: the Oslo Study. *Diabetologia* 37:579-584.
- Angele MK, Knoferl MW, Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. 1999. Sex steroids regulate pro- and anti-inflammatory cytokine release by macrophages after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 277:C35-42.
- Aouad M, Charlet A, Rodeau JL, Poisbeau P (2009) Reduction and prevention of vincristine-induced neuropathic pain symptoms by the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine are mediated by 3alpha-reduced neurosteroids. *Pain* 147:54-59.
- Archer AG, Watkins PJ, Thomas PK, Sharma AK, Payan J (1983) The natural history of acute painful neuropathy in diabetes mellitus. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 46:491-499.
- Arikawa E, Ma RC, Isshiki K, Luptak I, He Z, Yasuda Y, Maeno Y, Patti ME, Weir GC, Harris RA, Zammit VA, Tian R, King GL (2007) Effects of insulin replacements, inhibitors of angiotensin, and PKCbeta's actions to normalize cardiac gene expression and fuel metabolism in diabetic rats. *Diabetes* 56:1410-1420.
- Baranauskas G, Nistri A (1998) Sensitization of pain pathways in the spinal cord: cellular mechanisms. *Progress in neurobiology* 54:349-365.
- Bard L, Groc L. 2011. Glutamate receptor dynamics and protein interaction: lessons from the NMDA receptor. *Mol Cell Neurosci* 48:298-307.
- Barnes PJ (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical science* 94:557-572.
- Baron R (2000) Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *The Clinical journal of pain* 16:S12-20.
- Barreto G, Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM, Garcia-Ovejero D (2007) Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone. *The European journal of neuroscience* 25:3039-3046.
- Baulieu (1999) *Contemporary Endocrinology* Humana Press.
- Baulieu EE (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23:963-987.

- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC. 2002. Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* 295:2282-2285.
- Beauregard C, Brandt P. (2004). Down regulation of interleukin-1 $\beta$ -induced nitric oxide production in lacrimal gland acinar cells by sex steroids. *Curr Eye Res* 29:59-66.
- Belanger B, Belanger A, Labrie F, Dupont A, Cusan L, Monfette G (1989) Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men. *Journal of steroid biochemistry* 32:695-698.
- Belelli D, Lambert JJ (2005) Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nature reviews Neuroscience* 6:565-575.
- Belvisi MG, Hele DJ (2003) Soft steroids: a new approach to the treatment of inflammatory airways diseases. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 16:321-325.
- Benmessahel Y, Troadec JD, Cadepond F, Guennoun R, Hales DB, Schumacher M, Groyer G. (2004). Downregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene expression by cyclic AMP in cultured Schwann cells. *Glia* 45:213-228.
- Bernard JF, Dallel R, Raboisson P, Villanueva L, Le Bars D (1995) Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat. *The Journal of comparative neurology* 353:480-505.
- Berry EM (1997) Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *The American journal of clinical nutrition* 66:991S-997S.
- Bhisitkul RB, Kocsis JD, Gordon TR, Waxman SG (1990) Trophic influence of the distal nerve segment on GABA $\text{A}$  receptor expression in axotomized adult sensory neurons. *Experimental neurology* 109:273-278.
- Bierhaus A et al. (2004) Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of clinical investigation* 114:1741-1751.
- Bierhaus A, Haslbeck KM, Humpert PM, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, Sayed AA, Andrassy M, Schiekofer S, Schneider JG, Schulz JB, Heuss D, Neundorfer B, Dierl S, Huber J, Tritschler H, Schmidt AM, Schwaninger M, Haering HU, Schleicher E, Kasper M, Stern DM, Arnold B, Nawroth PP. (2004). Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest* 114:1741-1751.
- Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP. (2001). Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Diabetes* 50:2792-2808.
- Biessels GJ, Deary IJ, Ryan CM (2008) Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet neurology* 7:184-190.
- Biessels GJ, van der Heide LP, Kamal A, Bley RL, Gispen WH (2002) Ageing and diabetes: implications for brain function. *European journal of pharmacology* 441:1-14.
- Blanco AM, Guerri C (2007) Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. *Frontiers in bioscience : a journal*

- and virtual library 12:2616-2630.
- Bloch CA, Clemons P, Sperling MA. (1987). Puberty decreases insulin sensitivity. *J Pediatr* 110:481-487.
- Bogen IL, Boulland JL, Mariussen E, Wright MS, Fonnum F, Kao HT, Walaas SI. (2006). Absence of synapsin I and II is accompanied by decreases in vesicular transport of specific neurotransmitters. *J Neurochem* 96:1458-1466.
- Boulton AJ (1998) Lowering the risk of neuropathy, foot ulcers and amputations. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 15 Suppl 4:S57-59.
- Boulton AJ, Armstrong WD, Scarpello JH, Ward JD. (1983). The natural history of painful diabetic neuropathy--a 4-year study. *Postgrad Med J* 59:556-559.
- Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D, American Diabetes A (2005) Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care* 28:956-962.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Frontiers in neuroendocrinology* 29:313-339.
- Brinton RD, Wang JM (2006) Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Current Alzheimer research* 3:185-190.
- Brownlee M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54:1615-1625.
- Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL (2012) Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet neurology* 11:521-534.
- Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S (2001) Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 44:1973-1988.
- Cao L, DeLeo JA (2008) CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain. *European journal of immunology* 38:448-458.
- Caruso D, D'Intino G, Giatti S, Maschi O, Pesaresi M, Calabrese D, Garcia-Segura LM, Calza L, Melcangi RC (2010) Sex-dimorphic changes in neuroactive steroid levels after chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neurochemistry* 114:921-932.
- Caruso D, Scurati S, Maschi O, De Angelis L, Roglio I, Giatti S, Garcia-Segura LM, Melcangi RC (2008) Evaluation of neuroactive steroid levels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in central and peripheral nervous system: effect of diabetes. *Neurochemistry international* 52:560-568.
- Cavenagh J, Good P, Ravenscroft P (2006) Neuropathic pain: are we out of the woods yet? *Internal medicine journal* 36:251-255.
- Ceccarelli I, Fiorenzani P, Massafra C, Aloisi AM (2003) Long-term ovariectomy changes formalin-induced licking in female rats: the role of estrogens. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 1:24.
- Celotti F (2013) *Patologia generale e fisiopatologia*: Edises.
- Charlet A, Lasbennes F, Darbon P, Poisbeau P (2008) Fast non-genomic effects of progesterone-derived neurosteroids on nociceptive thresholds and pain symptoms. *Pain* 139:603-609.
- Cheng C, Zochodne DW (2003) Sensory neurons with activated caspase-3 survive long-term experimental diabetes. *Diabetes* 52:2363-2371.

- Chong MS, Bajwa ZH. (2001). Diagnosis and treatment of neuropathic pain. *J. Pain Symptom Manage* 429.
- Ciriza I, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2004) Reduced progesterone metabolites protect rat hippocampal neurones from kainic acid excitotoxicity in vivo. *Journal of neuroendocrinology* 16:58-63.
- Ciriza I, Carrero P, Frye CA, Garcia-Segura LM (2006) Reduced metabolites mediate neuroprotective effects of progesterone in the adult rat hippocampus. The synthetic progestin medroxyprogesterone acetate (Provera) is not neuroprotective. *Journal of neurobiology* 66:916-928.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19:323-362.
- Cortright RN, Azevedo JL, Jr., Zhou Q, Sinha M, Pories WJ, Itani SI, Dohm GL. (2000). Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E553-562.
- Craft RM, Mogil JS, Aloisi AM (2004) Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *European journal of pain* 8:397-411.
- D'Astous M, Morissette M, Tanguay B, Callier S, Di Paolo T (2003) Dehydroepiandrosterone (DHEA) such as 17beta-estradiol prevents MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse* 47:10-14.
- Dalla Valle L, Belvedere P, Simontacchi C, Colombo L (1992) Extraglandular hormonal steroidogenesis in aged rats. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 43:1095-1098.
- Daousi C, Benbow SJ, Woodward A, MacFarlane IA (2006) The natural history of chronic painful peripheral neuropathy in a community diabetes population. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 23:1021-1024.
- Das Evcimen N, King GL. (2007). The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 55:498-510.
- Dasu MR, Devaraj S, Zhao L, Hwang DH, Jialal I (2008) High glucose induces toll-like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation. *Diabetes* 57:3090-3098.
- Daulhac L, Maffre V, Mallet C, Etienne M, Privat AM, Kowalski-Chauvel A, Seva C, Fialip J, Eschalier A. (2011). Phosphorylation of spinal N-methyl-d-aspartate receptor NR1 subunits by extracellular signal-regulated kinase in dorsal horn neurons and microglia contributes to diabetes-induced painful neuropathy. *Eur J Pain* 15:169 e161-169 e112.
- Dickenson AH (1994) Neurophysiology of opioid poorly responsive pain. *Cancer surveys* 21:5-16.
- Dickenson AH, Chapman V, Green GM (1997) The pharmacology of excitatory and inhibitory amino acid-mediated events in the transmission and modulation of pain in the spinal cord. *General pharmacology* 28:633-638.
- Dickinson T, Mitchell R, Robberecht P, Fleetwood-Walker SM (1999) The role of VIP/PACAP receptor subtypes in spinal somatosensory processing in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Neuropharmacology* 38:167-180.
- Djebaili M, Hoffman SW, Stein DG (2004) Allopregnanolone and progesterone decrease cell death and cognitive deficits after a contusion of the rat pre-frontal cortex. *Neuroscience* 123:349-359.
- Draisci G, Kajander KC, Dubner R, Bennett GJ, Iadarola MJ (1991) Up-regulation of

- opioid gene expression in spinal cord evoked by experimental nerve injuries and inflammation. *Brain research* 560:186-192.
- Dubrovsky B (2006) Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 84:644-655.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS (2007) Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132:237-251.
- Dyck PJ, Peroutka S, Rask C, Burton E, Baker MK, Lehman KA, Gillen DA, Hokanson JL, O'Brien PC (1997) Intradermal recombinant human nerve growth factor induces pressure allodynia and lowered heat-pain threshold in humans. *Neurology* 48:501-505.
- Edinger KL, Frye CA (2005) Testosterone's anti-anxiety and analgesic effects may be due in part to actions of its 5alpha-reduced metabolites in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology* 30:418-430.
- Eser D, Baghai TC, Schule C, Nothdurfter C, Rupprecht R (2008) Neuroactive steroids as endogenous modulators of anxiety. *Current pharmaceutical design* 14:3525-3533.
- Falchi M, Ferrara F, Gharib C, Dib B. (2001). Hyperalgesic effect of intrathecally administered interleukin-1 in rats. *Drugs Exp Clin Res* 27:97-101.
- Feldman EL, Stevens MJ, Greene DA. (1997). Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin Neurosci* 4:365-370.
- Fillingim RB (2000) Sex, gender, and pain: women and men really are different. *Current review of pain* 4:24-30.
- Fillingim RB, Gear RW. (2004). Sex differences in opioid analgesia: clinical and experimental findings. *Eur J Pain* 8:413-425.
- Frye CA, Van Keuren KR, Erskine MS (1996) Behavioral effects of 3 alpha-androstanediol. I: Modulation of sexual receptivity and promotion of GABA-stimulated chloride flux. *Behavioural brain research* 79:109-118.
- Galer BS, Ganas A, Jensen MP (2000) Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes research and clinical practice* 47:123-128.
- Galli CL, Corsini E, Marinovich M (2008) *Tossicologia: Piccin*.
- Garay L, Deniselle MC, Meyer M, Costa JJ, Lima A, Roig P, De nicola AF. (2009). Protective effects of progesterone administration on axonal pathology in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 1283:177-185.
- Garay L, Gonzalez Deniselle MC, Gierman L, Meyer M, Lima A, Roig P, De Nicola AF. (2008). Steroid protection in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 15:76-83.
- Garcia-Estrada J, Del Rio JA, Luquin S, Soriano E, Garcia-Segura LM (1993) Gonadal hormones down-regulate reactive gliosis and astrocyte proliferation after a penetrating brain injury. *Brain research* 628:271-278.
- Garcia-Ovejero D, Veiga S, Garcia-Segura LM, Doncarlos LL (2002) Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. *The Journal of comparative neurology* 450:256-271.
- Garcia-Segura LM, Balthazart J. (2009). Steroids and neuroprotection: New advances. *Front Neuroendocrinol* 30:v-ix.
- Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F. (1994). Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*

- 44:279-307.
- Garcia-Segura LM, Melcangi RC (2006) Steroids and glial cell function. *Glia* 54:485-498.
- Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I (2003) Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Progress in neurobiology* 71:31-41.
- Gardoni F, Bellone C, Cattabeni F, Di Luca M. (2001). Protein kinase C activation modulates alpha-calmodulin kinase II binding to NR2A subunit of N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J Biol Chem* 276:7609-7613.
- Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM (1994) GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Experimental neurology* 129:237-243.
- Gaumond I, Arsenault P, Marchand S (2002) The role of sex hormones on formalin-induced nociceptive responses. *Brain research* 958:139-145.
- Gaumond I, Arsenault P, Marchand S (2005) Specificity of female and male sex hormones on excitatory and inhibitory phases of formalin-induced nociceptive responses. *Brain research* 1052:105-111.
- Gaumond I, Spooner MF, Marchand S (2007) Sex differences in opioid-mediated pain inhibitory mechanisms during the interphase in the formalin test. *Neuroscience* 146:366-374.
- Gauriau C, Bernard JF (2004) A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *The Journal of comparative neurology* 468:24-56.
- Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, Weizman A (1999) Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacological reviews* 51:629-650.
- Gee KW, Bolger MB, Brinton RE, Coirini H, McEwen BS (1988) Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 246:803-812.
- Ghoumari AM, Ibanez C, El-Etr M, Leclerc P, Eycheche B, O'Malley BW, Baulieu EE, Schumacher M (2003) Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *Journal of neurochemistry* 86:848-859.
- Giachino C, Galbiati M, Fasolo A, Peretto P, Melcangi R (2003) Neurogenesis in the subependymal layer of the adult rat: a role for neuroactive derivatives of progesterone. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1007:335-339.
- Giachino C, Galbiati M, Fasolo A, Peretto P, Melcangi RC (2004) Effects of progesterone derivatives, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the subependymal layer of the adult rat. *Journal of neurobiology* 58:493-502.
- Giatti S, Boraso M, Melcangi RC, Viviani B (2012) Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *Journal of molecular endocrinology* 49:R125-134.
- Giatti S, D'Intino G, Maschi O, Pesaresi M, Garcia-Segura LM, Calza L, Caruso D, Melcangi RC (2010) Acute experimental autoimmune encephalomyelitis induces sex dimorphic changes in neuroactive steroid levels. *Neurochemistry international* 56:118-127.
- Gispén WH, Biessels GJ (2000) Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in neurosciences* 23:542-549.
- Gordh T, Chu H, Sharma HS (2006) Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier

- function and activates astrocytes in the rat. *Pain* 124:211-221.
- Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. 2003. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. *Diabetes Care* 26:1790-1795.
- Gore M, Dukes E, Rowbotham DJ, Tai KS, Leslie D. (2007). Clinical characteristics and pain management among patients with painful peripheral neuropathic disorders in general practice settings. *Eur J Pain* 11:652-664.
- Gottfried-Blackmore A, Sierra A, Jellinck PH, McEwen BS, Bulloch K (2008) Brain microglia express steroid-converting enzymes in the mouse. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109:96-107.
- Greene DA, Lattimer SA, Sima AA (1987) Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *The New England journal of medicine* 316:599-606.
- Greenspan, Gardner, Shoback (2009) *Endocrinologia generale e clinica di Greenspan: Piccin.*
- Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, Wei F, Dubner R, Ren K (2007) Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:6006-6018.
- Guo W, Wei F, Zou S, Robbins MT, Sugiyo S, Ikeda T, Tu JC, Worley PF, Dubner R, Ren K. (2004). Group I metabotropic glutamate receptor NMDA receptor coupling and signaling cascade mediate spinal dorsal horn NMDA receptor 2B tyrosine phosphorylation associated with inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 24:9161-9173.
- Ha HC, Hester LD, Snyder SH (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:3270-3275.
- Harmar A, Keen P (1982) Synthesis, and central and peripheral axonal transport of substance P in a dorsal root ganglion-nerve preparation in vitro. *Brain research* 231:379-385.
- Hatton WJ, von Bartheld CS (1999) Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *The Journal of comparative neurology* 409:169-186.
- Hau M, Dominguez OA, Evrard HC (2004) Testosterone reduces responsiveness to nociceptive stimuli in a wild bird. *Hormones and behavior* 46:165-170.
- Helgren ME, Cliffer KD, Torrento K, Cavnor C, Curtis R, DiStefano PS, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997) Neurotrophin-3 administration attenuates deficits of pyridoxine-induced large-fiber sensory neuropathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:372-382.
- Heppenstall PA, Lewin GR (2001) BDNF but not NT-4 is required for normal flexion reflex plasticity and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8107-8112.
- Hirade M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Kikkawa R, Kitasato H (1999) Tetrodotoxin-resistant sodium channels of dorsal root ganglion neurons are readily activated in diabetic rats. *Neuroscience* 90:933-939.
- Holguin A, O'Connor KA, Biedenkapp J, Campisi J, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Hansen MK, Spataro L, Maksimova E, Bravmann C, Martin D, Fleshner M, Maier SF, Watkins LR (2004) HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-



- mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS). *Pain* 110:517-530.
- Holzbauer M (1976) Proceedings: Physiological aspects of the hypnotic properties of steroid hormones. *British journal of pharmacology* 56:382P-382P.
- Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444:486-489.
- Howard, Redd (1998) *Unbiased Stereology. Three Dimensional Measurement in Microscopy*: Bios Scientific Publishers.
- Hu ZY, Bourreau E, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE (1987) Neurosteroids: oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:8215-8219.
- Hylden JL, Anton F, Nahin RL (1989) Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience* 28:27-37.
- Ilnytska O, Lyzogubov VV, Stevens MJ, Drel VR, Mashtalir N, Pacher P, Yorek MA, Obrosova IG (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy. *Diabetes* 55:1686-1694.
- Inkster ME, Cotter MA, Cameron NE. (2007). Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 561:63-71.
- Inoue K, Tsuda M. (2009). Microglia and neuropathic pain. *Glia* 57:1469-1479.
- Jacobson AM, Samson JA, Weinger K, Ryan CM (2002) Diabetes, the brain, and behavior: is there a biological mechanism underlying the association between diabetes and depression? *International review of neurobiology* 51:455-479.
- Jaiprakash RP, Vilas KM. (1995). Role of testosterone on pain threshold in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 39(4):423-424.
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20:197-216.
- Jellinck PH, Kaufmann M, Gottfried-Blackmore A, Croft G, Byford V, McEwen BS, Jones G, Bulloch K (2006) Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in the brain: identification by liquid chromatography/mass spectrometry of the delta-4-isomer of DHEA and related steroids formed from androstenedione by mouse BV2 microglia. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 98:41-47.
- Jellinck PH, Kaufmann M, Gottfried-Blackmore A, McEwen BS, Jones G, Bulloch K (2007) Selective conversion by microglia of dehydroepiandrosterone to 5-androstenediol-A steroid with inherent estrogenic properties. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 107:156-162.
- Jermendy G, Toth L, Voros P, Koltai MZ, Pogatsa G (1991) Cardiac autonomic neuropathy and QT interval length. A follow-up study in diabetic patients. *Acta cardiologica* 46:189-200.
- Jevtovic-Todorovic V, Covey DF, Todorovic SM (2009) Are neuroactive steroids promising therapeutic agents in the management of acute and chronic pain? *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S178-185.
- Jiang C, Cui K, Wang J, He Y (2011) Microglia and cyclooxygenase-2: possible therapeutic targets of progesterone for stroke. *International immunopharmacology* 11:1925-1931.
- Julien N, Goffaux P, Arsenault P, Marchand S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain* 114:295-302.

- Jung-Testas I, Do Thi A, Koenig H, Desarnaud F, Shazand K, Schumacher M, Baulieu EE (1999) Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69:97-107.
- Kaasik A, Kalda A, Jaako K, Zharkovsky A (2001) Dehydroepiandrosterone sulphate prevents oxygen-glucose deprivation-induced injury in cerebellar granule cell culture. *Neuroscience* 102:427-432.
- Kangrga I., Randic M. (1990) Tachykinins and Calcitonin Gene-Related Peptide Enhance Release of Endogenous Glutamate and Aspartate from the Rat Spinal Dorsal Horn Slice. *The Journal of Neuroscience* 10(6): 2026-2038
- Kapur D (2003) Neuropathic pain and diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews* 19 Suppl 1:S9-15.
- Kellogg AP, Pop-Busui R (2005) Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 7:1521-1529.
- Kellogg AP, Wiggin TD, Larkin DD, Hayes JM, Stevens MJ, Pop-Busui R (2007) Protective effects of cyclooxygenase-2 gene inactivation against peripheral nerve dysfunction and intraepidermal nerve fiber loss in experimental diabetes. *Diabetes* 56:2997-3005.
- Kibaly C, Meyer L, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2008) Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:93-104.
- Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2005) Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *Journal of neurochemistry* 93:1220-1230.
- Kidd BL, Urban LA. 2001. Mechanisms of inflammatory pain. *Br J Anaesth* 87:3-11.
- Kipp M, Amor S, Krauth R, Beyer C (2012) Multiple sclerosis: neuroprotective alliance of estrogen-progesterone and gender. *Frontiers in neuroendocrinology* 33:1-16.
- Kodl CT, Seaquist ER (2008) Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine reviews* 29:494-511.
- Kraulis I, Foldes G, Traikov H, Dubrovsky B, Birmingham (1975) Distribution, metabolism and biological activity of deoxycorticosterone in the central nervous system. *Brain research* 88:1-14.
- Labombarda F, Pianos A, Liere P, Eychenne B, Gonzalez S, Cambourg A, De Nicola AF, Schumacher M, Guennoun R (2006) Injury elicited increase in spinal cord neurosteroid content analyzed by gas chromatography mass spectrometry. *Endocrinology* 147:1847-1859.
- Lacapere JJ, Papadopoulos V (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* 68:569-585.
- Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA (2003) Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Progress in neurobiology* 71:67-80.
- Lau BY, Foldes AE, Alieva NO, Oliphint PA, Busch DJ, Morgan JR. (2011). Increased synapsin expression and neurite sprouting in lamprey brain after spinal cord injury. *Exp Neurol* 228:283-293.
- Lau CG, Zukin RS. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:413-426.

- Lavaque E, Sierra A, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2006) Steroidogenic acute regulatory protein in the brain. *Neuroscience* 138:741-747.
- Lavezzari G, McCallum J, Lee R, Roche KW. (2003). Differential binding of the AP-2 adaptor complex and PSD-95 to the C-terminus of the NMDA receptor subunit NR2B regulates surface expression. *Neuropharmacology* 45:729-737.
- Lee M, Schwab C, McGeer PL (2011) Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia* 59:152-165.
- Lembeck F, Holzer P (1979) Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 310:175-183.
- Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC. (2007). Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience* 144:1293-1304.
- Lephart ED. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev* 22:1-26.
- Levy D, Zochodne DW (2004) NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain* 4:11-18.
- Lewin GR, Rueff A, Mendell LM (1994) Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *The European journal of neuroscience* 6:1903-1912.
- Li F, Drel VR, Szabo C, Stevens MJ, Obrosova IG (2005) Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes* 54:1514-1522.
- Li JQ, Chen SR, Chen H, Cai YQ, Pan HL. (2010). Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain. *J Neurochem* 112:162-172.
- Lima D, Coimbra A (1988) The spinothalamic system of the rat: structural types of retrogradely labelled neurons in the marginal zone (lamina I). *Neuroscience* 27:215-230.
- Lindsay C. D. (2001) Substance P: A New Era, a New Role. *Pharmacotherapy* 21(9).
- Lo SS, Tun RY, Leslie RD. 1991. Non-genetic factors causing type 1 diabetes. *Diabet Med* 8:609-618.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Majewska MD (1992) Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Progress in neurobiology* 38:379-395.
- Malayev A, Gibbs TT, Farb DH (2002) Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *British journal of pharmacology* 135:901-909.
- Malcangio M, Fernandes K, Tomlinson DR (1998) NMDA receptor activation modulates evoked release of substance P from rat spinal cord. *British journal of pharmacology* 125:1625-1626.
- Mao X, Barger SW (1998) Neuroprotection by dehydroepiandrosterone-sulfate: role of an NFkappaB-like factor. *Neuroreport* 9:759-763.
- Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F (1994) Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus

- monkey. *Molecular and cellular endocrinology* 104:103-111.
- McCall AL (2002) Diabetes mellitus and the central nervous system. *International review of neurobiology* 51:415-453.
- McDonald DS, Cheng C, Martinez JA, Zochodne DW (2007) Regenerative arrest of inflamed peripheral nerves: role of nitric oxide. *Neuroreport* 18:1635-1640.
- Melcangi RC, Celotti F, Ballabio M, Poletti A, Martini L. (1990). Testosterone metabolism in peripheral nerves: presence of the 5 alpha-reductase-3 alpha-hydroxysteroid-dehydrogenase enzymatic system in the sciatic nerve of adult and aged rats. *J Steroid Biochem* 35:145-148.
- Melcangi RC, Garcia-Segura LM (2006) Therapeutic approaches to peripheral neuropathy based on neuroactive steroids. *Expert review of neurotherapeutics* 6:1121-1125.
- Melcangi RC, Garcia-Segura LM, Mensah-Nyagan AG (2008) Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65:777-797.
- Melcangi RC, Giatti S, Pesaresi M, Calabrese D, Mitro N, Caruso D, Garcia-Segura LM (2011) Role of neuroactive steroids in the peripheral nervous system. *Frontiers in endocrinology* 2:104.
- Melcangi RC, Magnaghi V, Galbiati M, Martini L (2001) Glial cells: a target for steroid hormones. *Progress in brain research* 132:31-40.
- Melcangi RC, Panzica GC (2006) Neuroactive steroids: old players in a new game. *Neuroscience* 138:733-739.
- Mellon SH, Griffin LD, Compagnone NA. (2001). Biosynthesis and action of neurosteroids. *Brain Res Brain Res Rev* 37:3-12.
- Mensah-Nyagan AG, Kibaly C, Schaeffer V, Venard C, Meyer L, Patte-Mensah C (2008) Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 109:286-293.
- Mensah-Nyagan AG, Meyer L, Schaeffer V, Kibaly C, Patte-Mensah C. (2009). Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1:S169-177.
- Merighi A, Polak JM, Theodosis DT (1991) Ultrastructural visualization of glutamate and aspartate immunoreactivities in the rat dorsal horn, with special reference to the colocalization of glutamate, substance P and calcitonin-gene related peptide. *Neuroscience* 40:67-80.
- Meyer L, Venard C, Schaeffer V, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG (2008) The biological activity of 3alpha-hydroxysteroid oxido-reductase in the spinal cord regulates thermal and mechanical pain thresholds after sciatic nerve injury. *Neurobiology of disease* 30:30-41.
- Milanese M, Zappettini S, Onofri F, Musazzi L, Tardito D, Bonifacino T, Messa M, Racagni G, Usai C, Benfenati F, Popoli M, Bonanno G (2011) Abnormal exocytotic release of glutamate in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neurochemistry* 116:1028-1042.
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Progress in neurobiology* 57:1-164.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Progress in neurobiology* 66:355-474.
- Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, Holguin A, Martin D, Maier SF, Watkins LR. (2001). Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord

- proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 21:2808-2819.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23:1026-1040.
- Milligan ED, Watkins LR (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nature reviews Neuroscience* 10:23-36.
- Minchenko AG, Stevens MJ, White L, Abatan OI, Komjati K, Pacher P, Szabo C, Obrosova IG (2003) Diabetes-induced overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the rat renal cortex is mediated via poly(ADP-ribose) polymerase activation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:1514-1516.
- Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain research reviews* 51:240-264.
- Molinaro P, Cantile M, Cuomo O, Secondo A, Pannaccione A, Ambrosino P, Pignataro G, Fiorino F, Severino B, Gatta E, Sisalli MJ, Milanese M, Scorziello A, Bonanno G, Robello M, Santagada V, Caliendo G, Di Renzo G, Annunziato L (2013) Neurounina-1, a novel compound that increases Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger activity, effectively protects against stroke damage. *Molecular pharmacology* 83:142-156.
- Morissette M, Di Paolo T. (2009). Effect of estradiol on striatal dopamine activity of female hemiparkinsonian monkeys. *J Neurosci Res* 87:1634-1644.
- Murphy AZ, Berkley KJ, Holdcroft A. (2009). *Pain: Sex/Gender Differences*. Elsevier Inc.
- Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, Low PA. (1995). Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 18:1160-1167.
- Nakamura J, Kato K, Hamada Y, Nakayama M, Chaya S, Nakashima E, Naruse K, Kasuya Y, Mizubayashi R, Miwa K, Yasuda Y, Kamiya H, Ienaga K, Sakakibara F, Koh N, Hotta N (1999) A protein kinase C-beta-selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 48:2090-2095.
- Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha SW, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JR, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, King GL. (2006). Activation of vascular protein kinase C-beta inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 55:691-698.
- Natarajan R, Nadler JL (2003) Lipoxygenases and lipid signaling in vascular cells in diabetes. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8:s783-795.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *The Journal of biological chemistry* 267:14998-15004.
- Obrosova IG, Drel VR, Oltman CL, Mashtalir N, Tibrewala J, Groves JT, Yorek MA (2007) Role of nitrosative stress in early neuropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 293:E1645-1655.
- Obrosova IG, Drel VR, Pacher P, Ilynska O, Wang ZQ, Stevens MJ, Yorek MA (2005) Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. *Diabetes* 54:3435-3441.
- Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA (2001) Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction

- injury model of neuropathic pain. *Experimental neurology* 169:386-391.
- Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JG, Szabo E, Szabo C (2002) The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes. *Diabetes* 51:514-521.
- Pak TR, Chung WC, Lund TD, Hinds LR, Clay CM, Handa RJ (2005) The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinology* 146:147-155.
- Paller CJ, Campbell CM, Edwards RR, Dobs AS (2009) Sex-based differences in pain perception and treatment. *Pain medicine* 10:289-299.
- Panzica GC, Balthazart J, Frye CA, Garcia-Segura LM, Herbison AE, Mensah-Nyagan AG, McCarthy MM, Melcangi RC (2012) Milestones on Steroids and the Nervous System: 10 years of basic and translational research. *Journal of neuroendocrinology* 24:1-15.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in pharmacological sciences* 27:402-409.
- Pathirathna S, Brimelow BC, Jagodic MM, Krishnan K, Jiang X, Zorumski CF, Mennerick S, Covey DF, Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V (2005) New evidence that both T-type calcium channels and GABAA channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5alpha-reduced neuroactive steroids. *Pain* 114:429-443.
- Patte-Mensah C, Kappes V, Freund-Mercier MJ, Tsutsui K, Mensah-Nyagan AG (2003) Cellular distribution and bioactivity of the key steroidogenic enzyme, cytochrome P450side chain cleavage, in sensory neural pathways. *Journal of neurochemistry* 86:1233-1246.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Boudard D, Schaeffer V, Begle A, Saredi S, Meyer L, Mensah-Nyagan AG (2006) Neurogenic pain and steroid synthesis in the spinal cord. *Journal of molecular neuroscience : MN* 28:17-31.
- Patte-Mensah C, Kibaly C, Mensah-Nyagan AG (2005) Substance P inhibits progesterone conversion to neuroactive metabolites in spinal sensory circuit: a potential component of nociception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9044-9049.
- Patte-Mensah C, Li S, Mensah-Nyagan AG (2004) Impact of neuropathic pain on the gene expression and activity of cytochrome P450side-chain-cleavage in sensory neural networks. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 61:2274-2284.
- Paul SM, Purdy RH (1992) Neuroactive steroids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6:2311-2322.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Pesaresi M, Giatti S, Calabrese D, Maschi O, Caruso D, Melcangi RC (2010) Dihydroprogesterone increases the gene expression of myelin basic protein in spinal cord of diabetic rats. *Journal of molecular neuroscience : MN* 42:135-139.
- Pesaresi M, Maschi O, Giatti S, Garcia-Segura LM, Caruso D, Melcangi RC. (2010). Sex differences in neuroactive steroid levels in the nervous system of diabetic and non-diabetic rats. *Horm Behav* 57:46-55.

- Plassart-Schiess E, Baulieu EE. (2001). Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 37:133-140.
- Pop-Busui R, Marinescu V, Van Huysen C, Li F, Sullivan K, Greene DA, Larkin D, Stevens MJ (2002) Dissection of metabolic, vascular, and nerve conduction interrelationships in experimental diabetic neuropathy by cyclooxygenase inhibition and acetyl-L-carnitine administration. *Diabetes* 51:2619-2628.
- Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM (2002) International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacological reviews* 54:233-246.
- Prybylowski K, Chang K, Sans N, Kan L, Vicini S, Wenthold RJ. (2005). The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. *Neuron* 47:845-857.
- Purdy RH, Morrow AL, Moore PH, Jr., Paul SM (1991) Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:4553-4557.
- Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA (2004) Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *The European journal of neuroscience* 20:467-473.
- Raiteri M, Bonanno G, Marchi M, Maura G (1984) Is there a functional linkage between neurotransmitter uptake mechanisms and presynaptic receptors? *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 231:671-677.
- Reeve AJ, Patel S, Fox A, Walker K, Urban L. (2000). Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* 4:247-257.
- Reilly KB, Srinivasan S, Hatley ME, Patricia MK, Lannigan J, Bolick DT, Vandenhoff G, Pei H, Natarajan R, Nadler JL, Hedrick CC (2004) 12/15-Lipoxygenase activity mediates inflammatory monocyte/endothelial interactions and atherosclerosis in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279:9440-9450.
- Ren K, Dubner R (2008) Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Current opinion in anaesthesiology* 21:570-579.
- Rey C, Mauduit C, Naureils O, Benahmed M, Louisot P, Gasnier F (2000) Up-regulation of mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor expression by tumor necrosis factor alpha in testicular leydig cells. Possible involvement in cell survival. *Biochemical pharmacology* 60:1639-1646.
- Ribeiro-da-Silva A, Hokfelt T (2000) Neuroanatomical localisation of Substance P in the CNS and sensory neurons. *Neuropeptides* 34:256-271.
- Roglio I, Bianchi R, Giatti S, Cavaletti G, Caruso D, Scurati S, Crippa D, Garcia-Segura LM, Camozzi F, Lauria G, Melcangi RC. (2007). Testosterone derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 64:1158-1168.
- Roselli CE, Horton LE, Resko JA (1987) Time-course and steroid specificity of aromatase induction in rat hypothalamus-preoptic area. *Biology of reproduction* 37:628-633.
- Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, Baghai TC, Fan J, Akula N, Groyer G, Adams D, Schumacher M (2010) Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews Drug discovery* 9:971-988.

- Satoh T, Takayama K, Sawada Y, Yokozeki H, Nishioka K (2003) Chronic nodular prurigo associated with nummular eczema: possible involvement of odontogenic infection. *Acta dermato-venereologica* 83:376-377.
- Scadding JW (1981) Development of ongoing activity, mechanosensitivity, and adrenaline sensitivity in severed peripheral nerve axons. *Experimental neurology* 73:345-364.
- Schmidtko A, Luo C, Gao W, Geisslinger G, Kuner R, Tegeder I. (2008). Genetic deletion of synapsin II reduces neuropathic pain due to reduced glutamate but increased GABA in the spinal cord dorsal horn. *Pain* 139:632-643.
- Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghoumari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Frontiers in neuroscience* 6:10.
- Selye H, Masson G (1942) Additional Steroids with Luteoid Activity. *Science* 96:358.
- Sheng M, Hoogenraad CC. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76:823-847.
- Shu XQ, Llinas A, Mendell LM (1999) Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. *Pain* 80:463-470.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore A, Milner TA, McEwen BS, Bulloch K (2008) Steroid hormone receptor expression and function in microglia. *Glia* 56:659-674.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K (2007) Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia* 55:412-424.
- Sierra A, Lavaque E, Perez-Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia-Segura LM (2003) Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *The European journal of neuroscience* 18:1458-1467.
- Snider WD, McMahon SB (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20:629-632.
- Sommer C, Kress M (2004) Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neuroscience letters* 361:184-187.
- Sommer C, Schmidt C, George A (1998) Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Experimental neurology* 151:138-142.
- Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR (1997) Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience* 81:255-262.
- Spike RC, Puskar Z, Andrew D, Todd AJ (2003) A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *The European journal of neuroscience* 18:2433-2448.
- Stanfa LC, Dickenson AH. (1999). The role of non-N-methyl-D-aspartate ionotropic glutamate receptors in the spinal transmission of nociception in normal animals and animals with carrageenan inflammation. *Neuroscience* 93:1391-1398.
- Stellwagen D, Malenka RC. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature* 440:1054-1059.
- Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 321:405-412.
- Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA (2000) Diabetic neuropathy--a continuing enigma. *Diabetes/metabolism research and reviews* 16:408-433.



- Sugimoto K, Yasyjima M, Yagihashi S. (2008). Role of Advanced Glucation End Products in Diabetic Neuropathy. *Current Pharmaceutical Design* 14:953-961.
- Sun S, Cao H, Han M, Li TT, Pan HL, Zhao ZQ, Zhang YQ (2007) New evidence for the involvement of spinal fractalkine receptor in pain facilitation and spinal glial activation in rat model of monoarthritis. *Pain* 129:64-75.
- Suzuki T, Sekido H, Kato N, Nakayama Y, Yabe-Nishimura C (2004) Neurotrophin-3-induced production of nerve growth factor is suppressed in Schwann cells exposed to high glucose: involvement of the polyol pathway. *Journal of neurochemistry* 91:1430-1438.
- Svendsen F, Tjolsen A, Hole K. (1998). AMPA and NMDA receptor-dependent spinal LTP after nociceptive tetanic stimulation. *Neuroreport* 9:1185-1190.
- Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA. (2001). Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 103:529-539.
- Tadano T, Namioka M, Nakagawasai O, Tan-No K, Matsushima K, Endo Y, Kisara K. (1999). Induction of nociceptive responses by intrathecal injection of interleukin-1 in mice. *Life Sci* 65:255-261.
- Tapia-Gonzalez S, Carrero P, Pernia O, Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y. (2008). Selective oestrogen receptor (ER) modulators reduce microglia reactivity in vivo after peripheral inflammation: potential role of microglial ERs. *J Endocrinol* 198:219-230.
- Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, Nuber A, Pozza G, Ward JD (1996) Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 39:1377-1384.
- Theodosiou M, Rush RA, Zhou XF, Hu D, Walker JS, Tracey DJ (1999) Hyperalgesia due to nerve damage: role of nerve growth factor. *Pain* 81:245-255.
- Thomas PK (1997) Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes* 46 Suppl 2:S54-57.
- Thornalley PJ. (2002). Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* 50:37-57.
- Todd AJ, McGill MM, Shehab SA (2000) Neurokinin 1 receptor expression by neurons in laminae I, III and IV of the rat spinal dorsal horn that project to the brainstem. *The European journal of neuroscience* 12:689-700.
- Todd AJ, Spike RC (1993) The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Progress in neurobiology* 41:609-645.
- Todd AJ. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 11:823-836.
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, Olney JW, Zorumski CF (2001) Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31:75-85.
- Todorovic SM, Lingle CJ (1998) Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *Journal of neurophysiology* 79:240-252.
- Tsutsui N, Taneike I, Ohara T, Goshi S, Kojio S, Iwakura N, Matsumaru H, Wakisaka-Saito N, Zhang HM, Yamamoto T (2000) A novel action of the proton pump inhibitor rabeprazole and its thioether derivative against the motility of

- Helicobacter pylori*. Antimicrobial agents and chemotherapy 44:3069-3073.
- Vajda FJ. (2002). Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* 9:4-8.
- Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R (2010) The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain* 10:167-184.
- Veiga S, Azcoitia I, Garcia-Segura LM (2005) Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, reduces reactive gliosis and protects hippocampal hilar neurons from kainic acid excitotoxicity. *Journal of neuroscience research* 80:129-137.
- Veiga S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I (2003) Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. *Journal of neurobiology* 56:398-406.
- Verge VM, Richardson PM, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T (1995) Differential influence of nerve growth factor on neuropeptide expression in vivo: a novel role in peptide suppression in adult sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:2081-2096.
- Veves A, King GL. (2001). Can VEGF reverse diabetic neuropathy in human subjects? *J Clin Invest* 107:1215-1218.
- Vileikyte L, Peyrot M, Bundy C, Rubin RR, Leventhal H, Mora P, Shaw JE, Baker P, Boulton AJ (2003) The development and validation of a neuropathy- and foot ulcer-specific quality of life instrument. *Diabetes care* 26:2549-2555.
- Villalba M, Hott M, Martin C, Aguila B, Valdivia S, Quezada C, Zambrano A, Concha MI, Otth C (2012) Herpes simplex virus type 1 induces simultaneous activation of Toll-like receptors 2 and 4 and expression of the endogenous ligand serum amyloid A in astrocytes. *Medical microbiology and immunology* 201:371-379.
- Vincent AM, Feldman EL. (2004). New insights into the mechanisms of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 5:227-236.
- Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL (2000) Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 43:957-973.
- Viviani B, Bartesaghi S, Gardoni F, Vezzani A, Behrens MM, Bartfai T, Binaglia M, Corsini E, Di Luca M, Galli CL, Marinovich M. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J Neurosci* 23:8692-8700.
- Wada R, Yagihashi S. (2005). Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1043:598-604.
- Wagner R, Myers RR (1996) Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* 7:2897-2901.
- Wang C, Dehghani B, Li Y, Kaler LJ, Vandenberg AA, Offner H. (2009). Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. *Immunology* 126:329-335.
- Wang X, Shaw S, Amiri F, Eaton DC, Marrero MB (2002) Inhibition of the Jak/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in tgfbeta and fibronectin synthesis in mesangial cells. *Diabetes* 51:3505-3509.
- Watkins LR, Maier SF (2003) Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nature reviews Drug discovery* 2:973-985.
- Wei XH, Wei X, Chen FY, Zang Y, Xin WJ, Pang RP, Chen Y, Wang J, Li YY, Shen KF, Zhou LJ, Liu XG (2013) The upregulation of translocator protein (18 kDa) promotes recovery from neuropathic pain in rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33:1540-1551.

- Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:5138-5143.
- Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR (2005) Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neuro-Signals* 14:166-174.
- Willis WD, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* 14:2-31.
- Wilson, Wright (2011) Inflammatory Mediators in Diabetic Neuropathy. *Diabetes and Metabolism*.
- Woolf CJ (2004) Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life sciences* 74:2605-2610.
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959-1964.
- Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.
- Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings J, Doubell T, Coggeshall RE (1995) Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *The Journal of comparative neurology* 360:121-134.
- Woolf CJ. (2004). Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci* 74:2605-2610.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH (1991) Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Molecular pharmacology* 40:333-336.
- Xia P, Kramer RM, King GL. (1995). Identification of the mechanism for the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J Clin Invest* 96:733-740.
- Xu J, Itoh Y, Hayashi H, Takii T, Miyazawa K, Onozaki K. (2011). Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1alpha or tumor necrosis factor alpha-induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biol Pharm Bull* 34:1724-1730.
- Yamagishi S, Uehara K, Otsuki S, Yagihashi S. (2003). Differential influence of increased polyol pathway on protein kinase C expressions between endoneurial and epineurial tissues in diabetic mice. *J Neurochem* 87:497-507.
- Yamakawa I, Kojima H, Terashima T, Katagi M, Oi J, Urabe H, Sanada M, Kawai H, Chan L, Yasuda H, Maegawa H, Kimura H (2011) Inactivation of TNF-alpha ameliorates diabetic neuropathy in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 301:E844-852.
- Yang HB, Yang X, Cao J, Li S, Liu YN, Suo ZW, Cui HB, Guo Z, Hu XD. (2011). cAMP-dependent protein kinase activated Fyn in spinal dorsal horn to regulate NMDA receptor function during inflammatory pain. *J Neurochem* 116:93-104.
- Young RJ, Ewing DJ, Clarke BF. (1988). Chronic and remitting painful diabetic polyneuropathy. Correlations with clinical features and subsequent changes in neurophysiology. *Diabetes Care* 11:34-40.
- Zatechka DS, Jr., Kador PF, Garcia-Castineiras S, Lou MF (2003) Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. *Diabetes* 52:1014-1022.

- Zhou XF, Chie ET, Deng YS, Zhong JH, Xue Q, Rush RA, Xian CJ (1999) Injured primary sensory neurons switch phenotype for brain-derived neurotrophic factor in the rat. *Neuroscience* 92:841-853.
- Zhou XF, Deng YS, Xian CJ, Zhong JH (2000) Neurotrophins from dorsal root ganglia trigger allodynia after spinal nerve injury in rats. *The European journal of neuroscience* 12:100-105.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:2237-2242.
- Ziegler D (2009) Painful diabetic neuropathy: advantage of novel drugs over old drugs? *Diabetes care* 32 Suppl 2:S414-419.
- Zimmermann M (2001) Pathobiology of neuropathic pain. *European journal of pharmacology* 429:23-37.
- Zochodne DW, Levy D (2005) Nitric oxide in damage, disease and repair of the peripheral nervous system. *Cellular and molecular biology* 51:255-267.
- Zwain IH, Yen SS (1999) Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-3852.