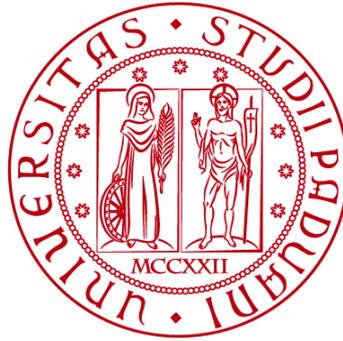


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE E DELLA FUNZIONALITÀ
DEI RECETTORI OPIOIDI NELLE CELLULE DI SCHWANN**

Relatore: Dott. Davide Malfacini
Dipartimento di Scienze del Farmaco

Correlatore: Dott.ssa Katharina Simon
Dipartimento di Scienze del Farmaco

Laureando: Riccardo Nardello

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

Abstract	5
1 Introduzione	7
1.1 Epidemiologia	7
1.2 Eziologia.....	8
1.3 Quadro clinico dell'emicrania	10
1.4 Criteri di diagnosi	12
1.5 Terapie attuali per l'emicrania.....	15
1.5.1 Trattamento in acuto	16
1.5.2 Trattamento dell'emicrania cronica e terapia preventiva.....	18
1.6 Fisiopatologia dell'emicrania.....	20
1.7 Ruolo delle cellule di Schwann	25
1.8 Ruolo dei recettori oppioidi.....	27
2 Scopo dello studio	29
3 Materiali e Metodi	30
3.1 Colture cellulari.....	30
3.2 Protocolli sperimentali	30
3.3 Studio dell'espressione dei recettori oppioidi.....	32
3.3.1 Procedura di estrazione dell'RNA dalle hSC.....	32
3.3.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA estratto	33
3.3.3 Reazione di retro-trascrizione a cDNA	33
3.3.4 Preparazione dei campioni per qPCR	33
3.3.5 PCR in tempo reale con Primers dei geni oppioidi per ricerca RNA estratto da hSC	34
3.3.6 Elaborazione dei dati raccolti con qPCR	36
3.4 Studio dell'attività funzionale dei recettori oppioidi nelle hSC.....	36
3.4.1 Preparazione delle cellule.....	38
3.4.2 Analisi e valutazione dei dati.....	39
3.5 Studio tramite Microscopia Confocale	40
3.5.1 Test preliminari con ligandi ATTO su cellule CHO e su HEK293	40
3.5.2 Studio della fluorescenza al Microscopio Confocale.....	41
4 Risultati	42
4.1 Livelli di trascritto per i recettori oppioidi.....	42
4.2 Esperimenti di bioimpedenza	42
4.3 Valutazione degli effetti di CGRP e confronto con EGF.....	43
4.4 Valutazione degli effetti di agonisti selettivi NOP/OP e confronto con EGF.....	44
4.5 Studio preliminare di microscopia confocale per valutare le proprietà di ligandi oppioidi fluorescenti.....	45

5	<i>Discussione</i>	50
6	<i>Bibliografia</i>	53

Abstract

Le cellule di Schwann (SC) sembrano essere coinvolte nei meccanismi di sviluppo dell'emicrania in quanto studi precedenti hanno dimostrato l'espressione del recettore per il Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), ligando responsabile dell'attacco emicranico, nelle SC. È importante notare come il CGRP sia già un bersaglio per alcuni farmaci antiemicranici che antagonizzano la sua attività. Il recettore del CGRP è un recettore accoppiato a proteina G che segnala attraverso l'aumento dei livelli di AMP ciclico (cAMP). Pertanto, stimolando recettori accoppiati a proteina G in grado di diminuire la concentrazione di cAMP, si potrebbe ottenere un effetto antiemicranico attraverso un antagonismo funzionale in grado di bloccare il segnale del CGRP. In questo studio abbiamo cercato di determinare se i quattro membri della famiglia dei recettori oppioidi sono espressi e funzionali nelle SC applicando i saggi: RT-qPCR, Label-Free e microscopia confocale. Complessivamente, non abbiamo misurato un'espressione robusta dei quattro recettori oppioidi a livello di mRNA. Negli esperimenti funzionali, la stimolazione selettiva dei recettori oppioidi ha generato risposte variabili, analogamente al CGRP. Infine, abbiamo avviato valutazioni preliminari con i ligandi selettivi marcati con fluorescenza in cellule ricombinanti per valutare, in prospettiva, l'espressione dei recettori oppioidi nelle SC a livello di membrana.

Schwann cells (SCs) appear to be involved in the mechanisms of migraine development as previous studies have demonstrated the expression of the receptor for Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), the ligand responsible for the migraine attack, in SCs. Importantly, CGRP is already a target for some anti-migraine drugs that antagonise its activity.

The CGRP receptor is a G protein-coupled receptor that signals by increasing levels of cyclic AMP (cAMP). Therefore, by stimulating G-protein-coupled receptors capable of decreasing the concentration of cAMP, an anti-migraine effect could be achieved through functional antagonism capable of blocking CGRP signalling.

In this study we tried to determine whether the four members of the opioid receptor family are expressed and functional in SCs by applying RT-qPCR, Label-Free and confocal microscopy assays.

Overall, we did not measure robust expression of the four opioid receptors at the mRNA level. In functional experiments, selective stimulation of opioid receptors generated variable responses, similar to CGRP. Finally, we started preliminary evaluations with fluorescence-labelled selective ligands in recombinant cells to prospectively assess the expression of opioid receptors in SCs at the membrane level.

1 Introduzione

L'emicrania è considerata una malattia neurovascolare che determina un disturbo cefalico primario. Rappresenta un fattore di disabilità e di ridotta capacità lavorativa ma soprattutto un fattore di riduzione del benessere psico-fisico dell'individuo. Secondo i dati dell'organizzazione mondiale della sanità (OMS), appare tra i disturbi cronici come la terza patologia più frequente e nella maggior parte dei casi è disabilitante per gli individui che ne sono affetti.

1.1 Epidemiologia

L'emicrania predilige in modo netto il sesso femminile (rapporto donna/uomo pari a 3:1). Nelle donne compare in modo preponderante soprattutto dopo il menarca ed ha la prevalenza massima nella quarta e nella quinta decade di vita. Secondo i dati dell'OMS, all'interno della popolazione mondiale l'emicrania ha una prevalenza del 14%, se viene preso in considerazione però solo il periodo compreso tra pubertà e menopausa circa il 27% delle donne ne è affetto (1). L'età media si colloca nella fascia tra i 25 ed i 55 anni. Globalmente la prevalenza dell'emicrania varia a seconda del paese in cui ci si trova; a titolo esemplificativo, secondo gli studi Europei ed Americani la prevalenza annuale di emicrania è stimata attorno al 10-15% degli adulti. Studi condotti all'interno di una comunità in Africa riportano cifre del 2,9-7,2% sugli adulti mentre in Giappone la prevalenza è dell'8,4%. Quello che si verifica in tutte le situazioni prese in considerazione, però, è che le donne soffrono maggiormente di emicrania rispetto al sesso maschile, con un rapporto pari a 3:1.

Sulla base della frequenza è possibile distinguere l'emicrania in:

- forma episodica (da 1 a 14 giorni al mese);
- forma cronica (> 15 giorni al mese per almeno 3 mesi).

Il 2,5% dei soggetti emicranici con insorgenza episodica evolve ogni anno nella forma cronica. Tale percentuale però è di gran lunga incrementata (pari al 30%) se vengono considerati i pazienti emicranici ad insorgenza episodica con elevata frequenza di attacchi di emicrania (più di 8 al mese). L'emicrania cronica ha una prevalenza del 2% all'interno della popolazione mondiale.

I fattori di cronicizzazione sono suddivisibili in:

- fattori modificabili: trattamento inadeguato dell'attacco emicranico, iperuso di analgesici (almeno 15 giorni al mese), ansia, depressione,

percezione di dolore al semplice tatto (allodinia meccanica) con concomitanti obesità e scorretto stile di vita;

- fattori non modificabili: età maggiore di 40 anni, eventi con alto livello di stress e traumi cranici/cervicali.

L'emicrania cronica con cronicizzazione dovuta ad iperuso di analgesici si verifica con un maggior tasso di prevalenza (ancora più netto) nella donna rispetto all'uomo (6:1).

1.2 Eziologia

Le cause attribuibili alla comparsa di emicrania in un soggetto, ad oggi, si avvalgono di diverse teorie che vanno dalla componente genetica, alla componente vascolare (che coinvolge la vasodilatazione delle meningi) alla componente neuro-infiammatoria (rilascio di citochine infiammatorie a livello del nervo trigemino). Ciò che è probabile è che la patologia si sviluppi a partire dall'insieme di queste concause.

Studi presenti in letteratura hanno riportato che i fattori genetici svolgono un ruolo importante nel definire la suscettibilità di un individuo all'emicrania (2). Una predisposizione e la presenza della componente ereditaria è stata rinvenuta nel 30-60% dei casi. La mappatura del linkage dei biomarcatori genetici, associata al sequenziamento dei geni di interesse, ha evidenziato molti dei geni che potrebbero essere associati all'emicrania.

La componente genetica può essere relativa ad una predisposizione ereditaria familiare, con disordini pre-esistenti quale l'emicrania emiplegica familiare (FHM). La FHM ha un modello di ereditarietà autosomica dominante. Gli studi di linkage hanno identificato tre principali geni responsabili di tale condizione: CACNA1A, ATP1A2 e SCN1A.

Il primo gene identificato nella FHM è stato CACNA1A. Questo gene di solito codifica la subunità $\alpha 1$ formante pori del canale neuronale Cav2.1 voltaggio-dipendente. Inoltre, uno studio ha riportato che diversi fenotipi di emicrania sono associati alla delezione del gene CACNA1A (3). Il secondo gene identificato come agente causale della FHM è ATP1A2. Questo particolare gene codifica il dominio catalitico della pompa di trasporto ionico Na^+/K^+ -ATPasi (isoforma $\alpha 2$). Questo dominio è responsabile del mantenimento dei gradienti elettrochimici nelle cellule muscolari lisce presenti nel cuore, nel muscolo scheletrico e nel sistema nervoso centrale (SNC). La terza mutazione associata ad FHM è SCN1A. Si

tratta di una variante rara rispetto alle altre due. SCN1A codifica la proteina Nav1.1 del canale del sodio voltaggio-dipendente, responsabile del mantenimento della permeabilità delle membrane eccitabili presenti nel SNC.

Disorder	Causal gene	Mechanism of mutation
Familial hemiplegic Migraine (FHM)	<i>CACNA1A</i>	Missense mutation, gain of function
	<i>ATP1A2</i>	Missense mutation, partial to complete loss of functionality
	<i>SCN1A</i>	Rare and highly complex mutation; mechanism unclear

Figura 1. Disturbi neurologici monogenici associati all'emicrania e loro geni causali e mutazioni (2,3).

La maggior parte dei fattori scatenanti associati all'emicrania riguardano disturbi metabolici.

L'associazione tra ipoglicemia ed emicrania, ad esempio, è nota da quasi un secolo.

Qualsiasi stress psicologico o fisiologico può essere considerato inoltre un fattore scatenante, in quanto riguardano tutti una situazione di stress ossidativo. È stato anche riportato che l'ipossia può aumentare la prevalenza di mal di testa, poiché le persone che vivono a maggiori altitudini mostrano una maggiore incidenza di emicrania. Per quanto riguarda gli alimenti, quelli più comunemente segnalati come fattori scatenanti sono cioccolato, cibi grassi e fritti, caffeina, glutammato monosodico, aspartame e bevande alcoliche. Altri fattori inerenti all'innesco dell'attacco emicranico possono essere la disidratazione, assenza di sonno, mestruazioni. Talvolta il meccanismo emicranico è innescato dall'illuminotecnica locale.

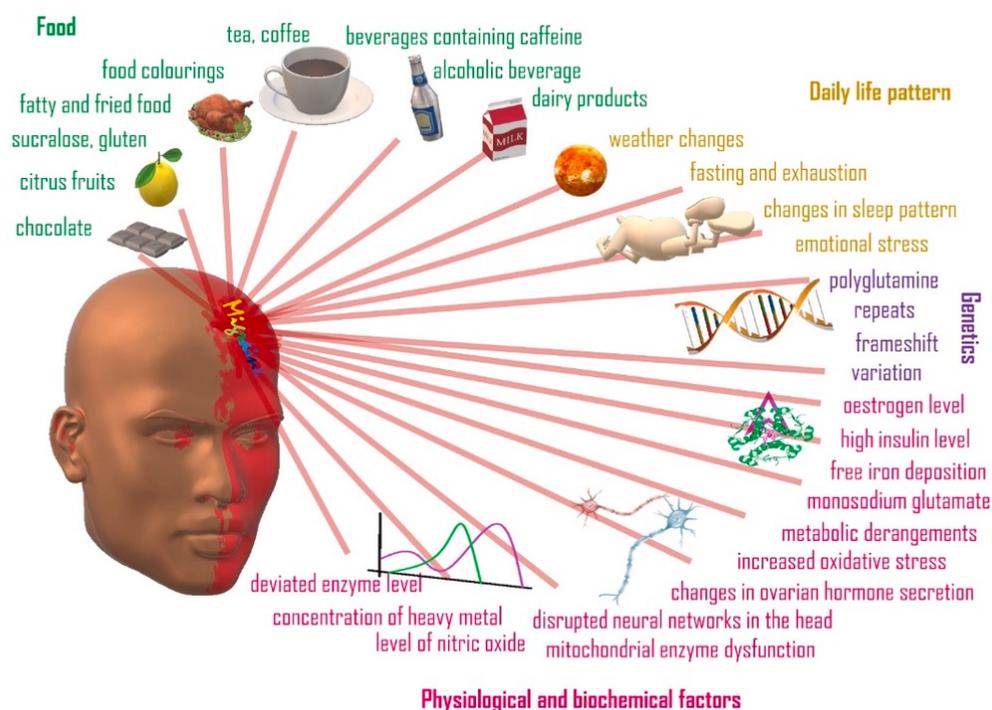


Figura 2. Fattori che innescano l'attacco emicranico (2)

1.3 Quadro clinico dell'emicrania

La recente comprensione della fisiopatologia dell'emicrania si è orientata verso la descrizione del fenomeno come un attacco costituito da quattro possibili fasi: prodromo, aura, cefalea e postdromo (4). Questo modello descrive più da vicino l'evoluzione dell'attacco in un paziente ed offre una comprensione più approfondita di come e in che modo l'emicrania possa iniziare e progredire. Le quattro possibili fasi, descritte meglio nel loro dettaglio, sono:

3. Il *prodromo*, il quale inizia 72 ore prima del tipico attacco emicranico. Nella maggior parte dei casi, i sintomi che caratterizzano il prodromo vengono trascurati. I sintomi prodromici includono irritabilità, fame, sbalzi d'umore, affaticamento, torcicollo e fono/fotosensibilità e disosmia, diarrea e disturbi del sonno.
3. L'*aura*, che precede l'emicrania, è una manifestazione transitoria focale che cresce gradualmente ed è associata a diversi tipi di sintomi, tra cui quelli visivi (gli scotomi), quelli sensitivi (con alterazione della percezione spaziale), talvolta vertigini e disturbi motori e del linguaggio. Meno spesso sono presenti anche sintomi

vocali quali la disartria e la disfasia. Il ruolo della CSD (cortical spreading depression) come meccanismo alla base dell'aura è stato supportato da un ampio numero di studi (5). La CSD è un'intensa onda di depolarizzazione neuronale che si propaga lentamente nella materia grigia. In seguito a questa onda di depolarizzazione, viene incrementata la concentrazione extracellulare di K^+ oltre la soglia critica. Predisposizioni genetiche e fattori ambientali possono modulare la suscettibilità individuale alla CSD. L'aura prevede a sua volta 4 sottotipi.

- *Aura tipica*: i sintomi più comuni sono visivi, tra i quali lampi di luce intensa, sfarfallio della luce, fosfeni (piccoli punti luminosi), visione annebbiata, scotoma e illusione di onde di acqua. Questi sintomi precedono disturbi sensitivi (parestesie) e disfasie del linguaggio.
 - *Aura del tronco encefalico*: sintomi tipici sono vertigini, disartria, acufene, iperacusia, diplopia, atassia o diminuzione del livello di coscienza, tutti associati ad aura tipica.
 - *Aura retinale*: l'emicrania con aura retinica è definita come ripetuti e reversibili sintomi visivi monoculari positivi o negativi ed è associata a cefalea.
 - *Aura emiplegica*: è una tipologia di aura motoria prolungata associata a sintomi visivi, sensitivi o del linguaggio, con attacchi gravi che causano debolezza motoria estesa. Una recente meta-analisi ha suggerito che i polimorfismi del gene MTHFR, che si prevede determinino iperomocisteinemia, possono essere rilevanti nell'emicrania con aura emiplegica (oltre ai geni sopracitati coinvolti nella FHM).
3. La *fase del dolore*, caratterizzata da un dolore unilaterale, pulsante, di gravità da moderata a estrema, con senso di nausea, stordimento, rigidità del collo, fono/fotofobia. Questo dolore può essere spiegato alla teoria neurovascolare in cui avviene l'attivazione del sistema trigemino-vascolare. Le fibre nocicettive, che innervano l'apporto vascolare della dura madre e originano dal ganglio trigemino, sono sensibilizzate e rilasciano mediatori

come il peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP). Questi mediatori avviano il signaling lungo la via trigemino-vascolare.

3. Il *postdromo*, il quale rappresenta una fase distinta o una evoluzione dell'attacco emicranico. Durante questa fase i soggetti potrebbero accusare sintomi come stanchezza, debolezza muscolare, cambiamenti dell'umore, difficoltà di concentrazione e riduzione dell'appetito.

Migraine aura		Prodromal state
~ 33% of migraine patients	Prevalence	Unknown (wide estimates of 9%–88%) ¹
Within 60 min of, or accompanying headache phase	Timing	Hours to 1–2 days before headache phase
5–60 min (for each individual aura symptom)	Duration	Hours to 1–2 days
Typical aura: visual, sensory, language	Symptoms	Homeostatic: food craving, thirst, frequent yawning or urination, pallor, sleep disturbance
Complex aura: brainstem, retinal, motor		Fatigue/cognitive symptoms: difficulty concentrating, irritability, elation, depression
		Sensory sensitivities: neck stiffness, photophobia, phonophobia, osmophobia
Cortical or cortical-subcortical interactions	Localization	Hypothalamus, limbic cortex, brainstem

Figura 3. Caratteristiche dell'aura emicranica rispetto allo stato prodromico (2).

Al tempo stesso, non tutti gli attacchi emicranici presentano in ogni occasione tutte e quattro le fasi sopra elencate.

1.4 Criteri di diagnosi

Secondo le linee guida della International Headache Society, osservando i dati relativi all'ICHD3 (International Classification of Headache Disorders 3) (6), si può definire emicrania una cefalea che si presenta con almeno 5 attacchi (2 sono sufficienti per la diagnosi) che durano per almeno 4-72h. Uno o più attacchi emicranici possono non essere facilmente distinguibili da episodi di cefalea simil-emicranica sintomatica. Inoltre, la natura di un singolo attacco o di pochi attacchi può essere difficile da comprendere. Pertanto, è richiesta la presenza di almeno cinque attacchi.

I criteri diagnostici per quanto riguarda l'emicrania e tutti i suoi sottotipi previsti dalla ICHD3 sono riportati di seguito.

1. Emicrania senza aura

- A. Almeno 5 attacchi che soddisfino i criteri B e D
- B. La cefalea dura 4-72 ore (non trattata o trattata senza successo)
- C. La cefalea presenta almeno due tra le seguenti caratteristiche:
 - 1. Localizzazione unilaterale
 - 2. Dolore di tipo pulsante
 - 3. Dolore con intensità media o forte
 - 4. Aggravata da o/ che limiti le attività fisiche di routine
- D. Alla cefalea si associa almeno una delle seguenti condizioni:
 - 1. Presenza di nausea e/o vomito
 - 2. Presenza di fotofobia e fonofobia
- E. Non meglio inquadrabile in un'altra diagnosi ICHD3.

2. Emicrania con aura

- A. Almeno 2 attacchi che soddisfino i criteri B e C
- B. Uno o più dei seguenti sintomi dell'aura reversibili:
 - 1. visivi
 - 2. sensitivi
 - 3. linguaggio
 - 4. motori
 - 5. del tronco encefalico
 - 6. retinici
- C. Almeno tre delle sei seguenti caratteristiche:
 - 1. almeno un sintomo dell'aura si sviluppa in più di 5 minuti
 - 2. 2 o più sintomi dell'aura si manifestano in successione
 - 3. ogni singolo sintomo dura tra i 5 ed i 60 minuti
 - 4. almeno un sintomo dell'aura è unilaterale
 - 5. almeno un sintomo è positivo (scintille o formicolii)
 - 6. l'aura è accompagnata, o seguita entro un'ora, da cefalea
- D. Non meglio inquadrabile in un'altra diagnosi ICHD3.

L'aura visiva è il tipo più comune di aura, che si verifica in oltre il 90% dei pazienti con emicrania con aura. Si presenta spesso come uno spettro di fortificazione: una immagine a zig-zag vicino al punto di fissazione che può diffondersi gradualmente verso destra o sinistra, lasciando nella sua scia lo scotoma relativo. Seguono in frequenza i disturbi sensoriali, mentre sono meno frequenti i disturbi del linguaggio, di solito afasici ma spesso difficili da categorizzare. Tutti questi sintomi neurologici caratteristici dell'aura di solito si verificano prima della cefalea, ma possono anche cominciare dopo l'inizio della fase di cefalea o continuare nella fase stessa. In altri casi, l'aura emicranica può verificarsi senza cefalea.

3. Emicrania con aura troncoencefalica

- A. Attacchi che soddisfino i criteri per emicrania con aura ed il seguente criterio B
- B. Aura con entrambi i seguenti:
 - 1. almeno due dei seguenti sintomi troncoencefalici reversibili:
 - a. disartria
 - b. vertigini
 - c. tinnito
 - d. ipoacusia
 - e. diplopia
 - f. atassia non attribuibile a deficit sensoriale
 - g. ridotto livello di coscienza
 - 2. assenza di sintomi motori o retinici.

Per quanto riguarda l'*emicrania emiplegica familiare* (FHM), è un tipo di emicrania che comprende debolezza motoria (reversibile) e il criterio da soddisfare perché possa essere considerata di tipo familiare è che almeno un familiare di primo o secondo grado ha avuto attacchi che riguardino l'emicrania emiplegica (ovvero sintomatologia oltre che motoria di tipo visivo, sensitivo e con problematiche riguardanti il linguaggio). La FHM può essere scambiata per epilessia e trattata senza successo come tale. Attacchi di FHM possono essere innescati da un lieve trauma cranico. I criteri diagnostici dell'*emicrania retinica*, invece, si riferiscono alla ricerca di sintomi visivi monoculari positivi e/o negativi completamente reversibili, che riguardano fosfeni, scotomi, cecità confermati durante un attacco.

4. Emicrania cronica

- A. Cefalea per più di 15 giorni al mese da più di 3 mesi
- B. Cefalea che si manifesta in un paziente che abbia almeno 5 attacchi che soddisfino i criteri B e D per l'emicrania senza aura e/o i criteri B e C per l'emicrania con aura
- C. Cefalea che soddisfi per più di 8 giorni al mese e per più di 3 mesi qualsiasi tra i seguenti criteri:
 - 1. criteri C e D per emicrania senza aura
 - 2. criteri B e C per emicrania con aura
- D. Non meglio inquadrata da altra diagnosi ICHD3.

La causa più comune di sintomi suggestivi di emicrania cronica è l'uso eccessivo di farmaci.

1.5 Terapie attuali per l'emicrania

Ad oggi, per il trattamento dell'emicrania vengono prese in considerazione diverse tipologie di terapia, in primis in base al paziente ed al grado di emicrania. In prima linea, viene suggerito l'utilizzo di NSAID e antiemetici qualora si presentassero sintomi quali nausea e vomito, oppure paracetamolo se NSAID sono controindicati. Dopo risposta insufficiente, si può considerare l'utilizzo di triptani e con naprossene se non sufficienti in monoterapia. Qualora la risposta sia ancora insufficiente si può passare all'utilizzo di ditan o gepant. Come trattamento preventivo si possono considerare anti-ipertensivi, antidepressivi, calcio-antagonisti o diversi approcci farmacologici come anticorpi monoclonali anti-CGRP e/o Onabotulinum (per l'emicrania cronica).

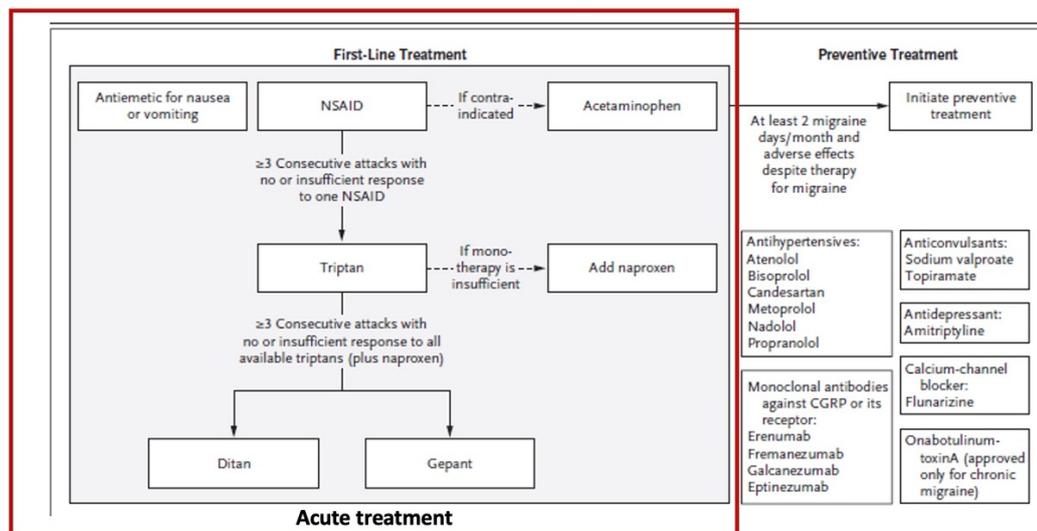


Figura 4. Strategia di trattamento acuto e preventivo proposto per l'emicrania da Ashina et al (7).

1.5.1 Trattamento in acuto

L'obiettivo principale del trattamento dell'emicrania è quello di ridurre la gravità e la durata dell'attacco di emicrania. Altri obiettivi includono il ripristino delle capacità funzionali, la riduzione di farmaci e una gestione complessiva degli attacchi con effetti collaterali nulli o minimi. Secondo dei recenti studi (8), per il trattamento in acuto dell'emicrania possono essere utilizzati gli NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drug, appartengono alla categoria dei FANS) oppure, in caso di contro-indicazioni, possono essere utilizzati altri farmaci analgesici come l'acetaminofene (paracetamolo). Se compaiono nausea e vomito nella sintomatologia durante l'attacco, vengono associati a questa strategia di trattamento i farmaci anti-emetici. Questi ultimi sono antagonisti della dopamina ed i più utilizzati in questo trattamento sono la proclorperazina (antiemetico principale), il droperidolo e metoclopramide. Sono somministrati per via parenterale.

Tra i FANS più utilizzati, troviamo:

- Ibuprofene: ha effetti analgesici, antipiretici ed antinfiammatori per il trattamento dell'emicrania. Inibisce la COX-1 e la COX-2, che svolgono un ruolo importante nella sintesi delle prostaglandine.
- Aspirina: è più utilizzata per il trattamento dell'emicrania cronica, inibisce le COX.
- Paracetamolo: è utilizzato in combinazione con la caffeina, in quanto con questa associazione il suddetto FANS ha una maggior efficacia.

Nel caso in cui gli attacchi consecutivi siano più di 3, con insufficiente risposta agli NSAID, si procede con l'utilizzo di triptani (agonisti selettivi dei recettori serotoninergici 5HT_{1B} e D).

Il legame dei triptani ai recettori della serotonina produce vasocostrizione, inibisce il rilascio di sostanza P, CGRP ed inibisce i nocicettori legati al dolore negli attacchi emicranici.

L'utilizzo di triptani è quasi sempre necessario nel trattamento dell'emicrania di grado da moderato a grave (9). I triptani condividono un meccanismo di azione comune ma differiscono per vie di somministrazione, costi e farmacocinetica, consentendo di personalizzare la scelta del farmaco specifico. I triptani principalmente utilizzati in questo trattamento sono almotriptan, elerriptan, rizatriptan, naratriptan e sumatriptan. Ad eccezione di almotriptan, la maggior parte dei triptani è stata associata ad affaticamento (sono controindicati nella cardiopatia ischemica), vertigini, fastidio al torace e sonnolenza. Se si rivelano insufficienti in monoterapia, all'utilizzo dei triptani può essere associato il naprossene o l'ibuprofene.

In situazioni in cui anche la risposta ai triptani è assente o insufficiente, si può procedere con l'utilizzo di Ditan o Gepant. I Ditani (Lasmiditan) agiscono come agonisti selettivi del recettore della serotonina 5-HT_{1F}. I Gepanti, quali Rimegepant, Ubrogapant e Zavegepant, agiscono come antagonisti del recettore del CGRP o contro il CGRP stesso.

Precedentemente a questa terapia di prima linea, era principalmente utilizzata la diidroergotamina. Questo farmaco è un derivato dell'ergot ed agisce come agonista non selettivo del recettore 5HT₁, producendo un effetto vasocostrittorio a livello dei vasi intracranici extracerebrali. Questo farmaco è sempre meno utilizzato nel trattamento dell'emicrania a causa delle numerose controindicazioni: può causare crampi alle gambe, formicolio alle estremità, non può essere utilizzato in gravidanza. È inoltre controindicato nei soggetti anziani, ipertesi e coronopatici che assumono già vasocostrittori, in favore delle nuove terapie di prima linea.

È stato notato anche un possibile ruolo dei recettori CB₁ e 2 nel dolore dell'emicrania (10). In modelli animali si è verificato come un agonista cannabinoide, come la metanandamide, moduli il rilascio di CGRP agendo sul recettore CB₁ ed inibisca la degranolazione dei mastociti (a livello durale) attraverso i recettori CB₂.

1.5.2 Trattamento dell'emicrania cronica e terapia preventiva

Per quanto riguarda l'attuale terapia dell'emicrania in forma cronica (con diversi attacchi in una singola settimana), è prevista una terapia denominata "preventiva" o "profilattica", che prevede l'utilizzo delle seguenti tipologie di farmaci:

- beta bloccanti (Propranololo e Metoprololo fanno parte della terapia di prima scelta), che sono capaci di ridurre il numero di attacchi mensili di circa il 50%, ma sono controindicati in pazienti con diabete e con patologie cardiache e polmonari
- bloccanti del canale del calcio (Flunarizina, Verapamil), controindicati in pazienti con depressione e morbo di Parkinson
- antiepilettici (Topiramato, Acido valproico), che sono efficaci quanto i beta bloccanti nel ridurre la frequenza degli attacchi di emicrania ma sono meno utilizzati perché hanno un maggior numero di effetti avversi (stanchezza, parestesie, anoressia)
- antidepressivi triciclici (Amitriptilina e Imipramina), che vengono utilizzati in caso di fallimento delle terapie sopra descritte, sono antagonisti dei recettori della serotonina con effetti anche antistaminici
- OnobotulinToxinA (solo per il trattamento dell'emicrania cronica)
- agenti Anti-CGRP, che possono essere sottoforma di:
 - anticorpi monoclonali: bloccano l'azione del peptide correlato al gene della calcitonina (CGRP), tra questi Erenumab che è un anticorpo diretto contro il recettore del CGRP, Fremanezumab per la prevenzione delle forme frequenti, Galcanezumab per la prevenzione delle forme episodiche, Eptinezumab per la profilassi della forme episodiche però molto frequenti; questi anticorpi sono indicati in pazienti che hanno almeno 4 giorni di emicrania al mese e che non hanno risposto a precedenti terapie;
 - Gepants: sono small molecules antagoniste del CGRP (Rimegepant, Zavegepant, Ubrogepant), alcuni dei quali utilizzabili anche per il trattamento in acuto, hanno un basso profilo di tossicità;
 - Ditans: sono antagonisti del recettore serotoninergico 5HT_{1F} (Lasmiditan).

Per quanto riguarda gli anticorpi monoclonali contro il CGRP (o contro il suo recettore), sono principalmente una terapia profilattica, mirata a ridurre frequenza, intensità e durata degli attacchi emicranici nel corso del tempo. La

loro somministrazione va effettuata una volta ogni 28 giorni tramite iniezione sottocute. Possiedono una notevole rapidità d'azione ed elevati livelli di sicurezza e tollerabilità. Questi farmaci si sono rivelati efficaci in moltissimi pazienti. Gli mAB anti-CGRP agiscono in modo centripeto, desensibilizzando i nocicettori periferici del trigemino. Questo meccanismo diventa clinicamente evidente entro 12 settimane, in media, in quasi il 60% dei pazienti. In uno studio osservazionale è stata però dimostrata, l'esistenza di una percentuale significativa di pazienti, altrimenti considerati *non responder*, che in realtà rispondono al trattamento con anticorpi anti-CGRP solo dopo 24 settimane (11). Il 91,3% dei pazienti affetti da emicrania diventa *responder* entro 48 settimane, con solo una piccola percentuale (8,7%) che rimane non responsiva. Questi risultati spingono a riconsiderare la durata della profilassi dell'emicrania, attualmente valutata dopo 2-6 mesi di trattamento.

Le risposte tardive ed ultra-tardive ai farmaci preventivi per l'emicrania hanno implicazioni significative per la corretta gestione clinica della malattia. In primo luogo, spingono a posticipare la valutazione dell'efficacia della profilassi dell'emicrania, solitamente fissata a 12 settimane, ad almeno 24 settimane. In secondo luogo, incoraggiano la considerazione di estendere il trattamento con mAb anti-CGRP oltre i 6 mesi nei pazienti con una risposta maggiore o uguale al 30% alla settimana 12.

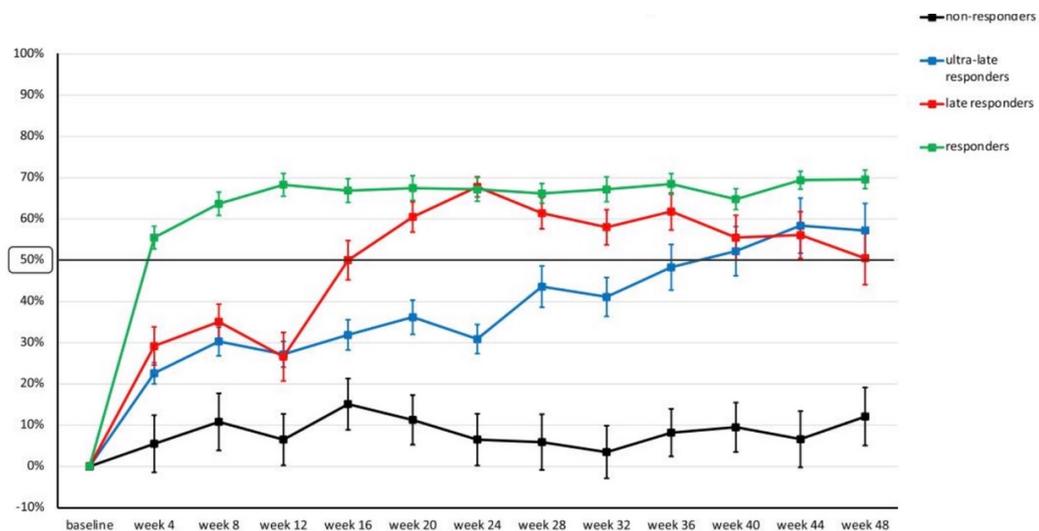


Figura 5. Riduzione media dei giorni mensili di emicrania nei responder (< 12 settimane), nei responder tardivi (> 12 settimane), nei responder ultra-tardivi (> 24 settimane) e nei non responder durante le settimane di trattamento (max 48) (11).

Inoltre, nelle forme trigemino-vascolari con dolore a partenza periferica, la presenza della membrana ematoencefalica rende tuttavia parzialmente inefficace l'uso di mAb, suggerendo un sito di azione periferico agente sul CGRP, motivo per il quale sono stati effettuati studi più approfonditi in merito alla segnalazione periferica del dolore e le cellule in essa implicate.

1.6 Fisiopatologia dell'emicrania

Le teorie alla base dei meccanismi fisiopatologici dell'emicrania e del dolore che ne consegue sono state negli anni e sono in continua evoluzione. L'origine del dolore emicranico è stata storicamente associata alla vasodilatazione delle strutture vascolari del distretto cranico, secondo la teoria puramente vascolare inizialmente proposta da Wolff e colleghi. Più in generale, evidenze cliniche e pre-cliniche suggeriscono che il dolore emicranico origini dalla stimolazione e attivazione di nocicettori meningei, in particolare in corrispondenza del decorso delle arterie meningei (12). In supporto a questa teoria, c'è anche lo studio di Micheal A. Moskowitz (1979), che ipotizzò che l'infiammazione neurogena fosse mediata dalla sostanza P rilasciata dal V nervo cranico, fattore che avrebbe causato edema ed extravasazione plasmatica a livello della dura madre. Tramite questi dati, si evidenziò come il dolore dell'emicrania origini dunque dalla stimolazione dei nocicettori a livello delle arterie meningei, affiancando poi la teoria vascolare, già in luce, a quella dell'infiammazione neurogena. Questa infiammazione neurogena si ipotizzò avesse come principali attori la sostanza P ed il CGRP. Il ruolo della vasodilatazione è stato poi ridimensionato nel tempo, come anche dimostrato dall'osservazione che non tutti i vasodilatatori siano in grado di scatenare un attacco simil-emicranico.

Secondo l'evoluzione di questi studi, durante attacchi emicranici provocati da somministrazione di CGRP esogeno, si è osservato che il dolore dell'emicrania è associato in questo caso alla vasodilatazione dell'arteria meningea media e dell'arteria cerebrale media. Di conseguenza, il dolore emicranico sarebbe associato a vasodilatazione arteriosa a livello durale. Oltre alla componente vasodilatatoria, è stato riconosciuto il ruolo attribuito all'infiammazione neurogena e ad una aumentata sensibilizzazione del sistema nervoso centrale. Nella patogenesi dell'emicrania, la trasmissione del dolore ha origine dall'attivazione e dalla sensibilizzazione dei neuroni di primo ordine, i cui corpi cellulari si trovano nel ganglio trigemino e le loro fibre afferenti innervano le meningi e i corrispondenti vasi.

Dopo la scoperta del CGRP (1982), sono stati condotti numerosi studi che riportano il ruolo che il CGRP ricopre nella patogenesi dell'emicrania. Il CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) è un peptide di 37 amminoacidi presente, nello specifico, nel sistema nervoso centrale e periferico.

Il CGRP viene prodotto in seguito a splicing alternativo del gene che codifica per la calcitonina. In uno studio condotto da Susanne G. Amara, sono stati prodotti i cDNA a partire dagli mRNA di calcitonina e CGRP (pCal e pCGRP) (13). La sequenza del clone pCGRP rivela l'intera regione codificante per il CGRP con un reading frame di 384 nucleotidi in grado di codificare un prodotto primario di traduzione di 128 amminoacidi. Le sequenze in 5' di pCal e di pCGRP sono identiche dal primo nucleotide al nucleotide 228 delle regioni codificanti di entrambi i cDNA. Confrontando le sequenze, quindi, è stato osservato che i primi 76 amminoacidi dei loro prodotti di traduzione devono essere identici. Oltre il nucleotide 228, i due mRNA non condividono alcuna omologia e codificano sequenze amminoacidiche diverse.

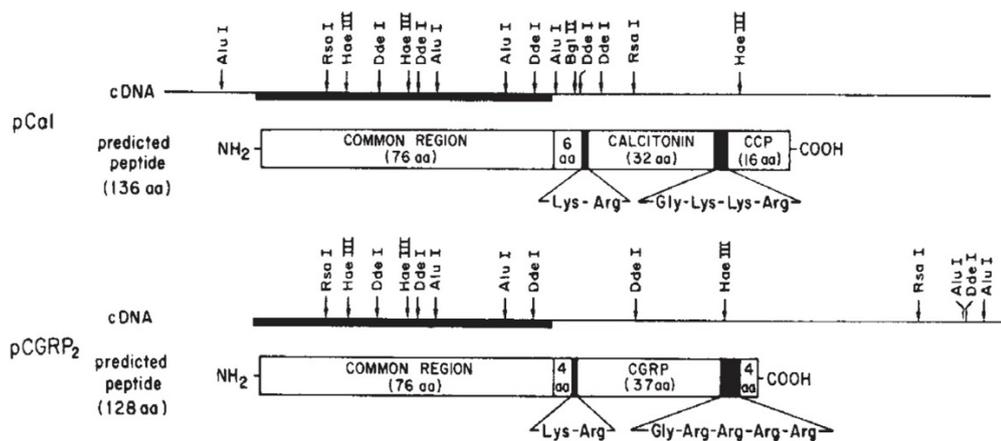


Figura 6. Sono raffigurate le due diverse sequenze proteiche in aa derivanti da splicing alternativo del gene della calcitonina (Susanne G. Amara, 13).

Il CGRP viene rilasciato dal corpo cellulare dei neuroni del ganglio del trigemino (e dai gangli gastrointestinali). Esistono due forme principali di CGRP:

- α -CGRP, espressa nei neuroni sensoriali primari del ganglio del trigemino, è la forma principalmente coinvolta nella patogenesi dell'emicrania;
- β -CGRP, espressa nei neuroni enterici del ganglio gastrointestinale.

Il CGRP, prevalentemente espresso nei neuroni sensoriali primari (gangli), quando viene rilasciato dalle sinapsi periferiche dei nocicettori provoca la vasodilatazione arteriolare ed allodinia meccanica. È un neuropeptide vasoattivo

ampiamente espresso sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico. Determina una vasodilatazione indipendente dall'ossido nitrico (NO) attraverso un'azione diretta sulle cellule muscolari lisce, ma può anche stimolare il rilascio da parte dell'endotelio di NO, contribuendo alla vasodilatazione attraverso due diversi pathway. Il CGRP, inoltre, aumenta la sensibilità all'input sensoriale, sia a livello del SNC che del SNP, aumentando la percezione del dolore.

1. Vasodilatazione: il CGRP agisce direttamente sulle cellule muscolari lisce per stimolare l'attivazione dell'adenilato ciclasi, con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di AMP ciclico. Questo incremento causa l'attivazione della PKA (protein chinasi A), la quale fosforila e permette l'apertura dei canali del potassio, permettendo il rilassamento della muscolatura liscia a livello dei vasi meningei. Il CGRP permette un secondo meccanismo di vasodilatazione, che prevede l'interazione con recettori presenti sulle cellule endoteliali con la conseguente attivazione di NO.

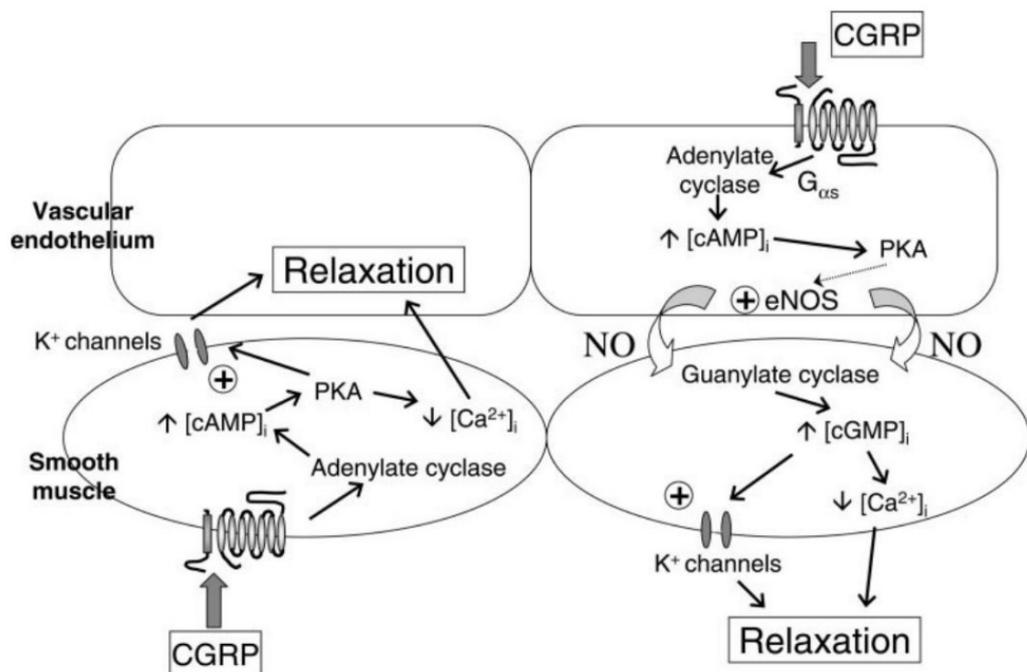


Figura 7. Meccanismi di vasodilatazione mediati dall'interazione del CGRP con il suo recettore (14).

2. Infiammazione neurogena: in seguito ad interazione del CGRP con il suo complesso recettoriale si ha la fosforilazione del fattore ERK, che promuove l'espressione di citochine pro-infiammatorie quali la IL-1, la IL-6 e alcune prostaglandine. Queste sono poi responsabili dell'infiammazione neurogena a livello del trigemino.

- Sensibilizzazione: nel nucleo trigeminale, il rilascio di CGRP dai terminali centrali del nervo trigemino può modulare i neuroni nocicettivi di secondo ordine del nucleo caudale del trigemino (TNC) del tronco encefalico. I neuroni del TNC proiettano al talamo, dove l'input ascendente viene integrato e trasmesso alle aree corticali superiori. Inoltre, le citochine che vengono prodotte in seguito ad interazione con il CGRP vengono rilasciate nel trigemino causando infiammazione neurogena ed aumentando l'eccitabilità neuronale.

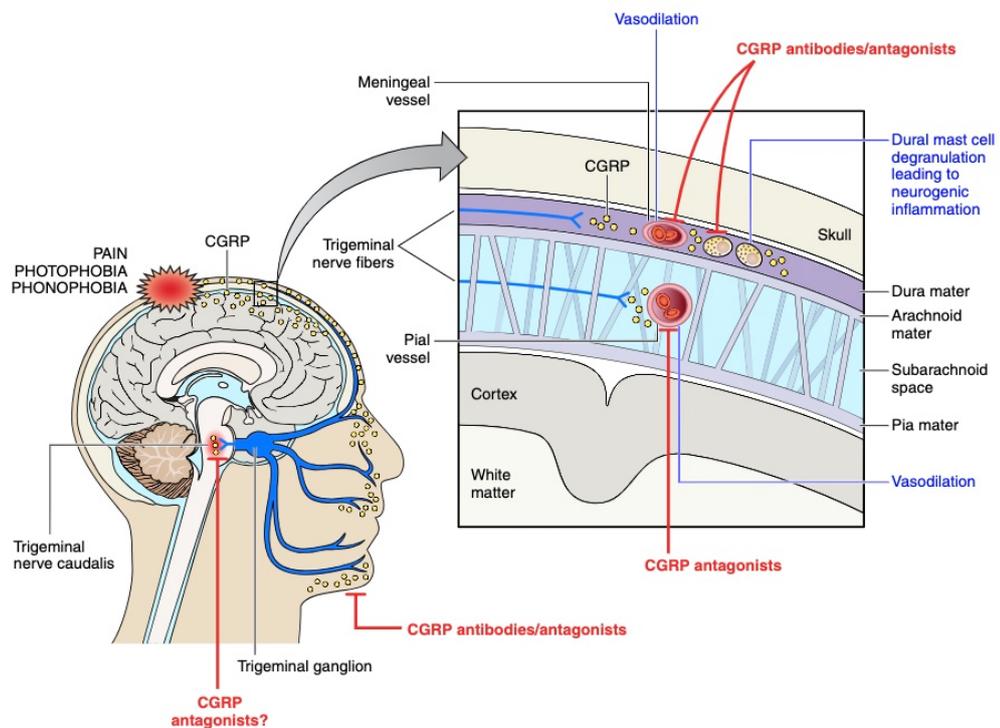


Figura 8. Il CGRP è coinvolto nella fisiopatologia dell'emicrania. È rilasciato dalle fibre afferenti del nervo trigemino durante l'attacco emicranico e causa vasodilatazione ed infiammazione neurogena (14).

Il CGRP viene rilasciato a livello delle fibre sensoriali. Uno tra i meccanismi ben conosciuti che portano al rilascio di CGRP dai nervi periferici è quello mediato dalla capsaicina. La capsaicina agisce tramite l'attivazione del TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), presente sulle fibre sensoriali (fibre C), il quale aumenta la permeabilità ai cationi. Diversi agenti endogeni portano al rilascio di CGRP, quali la metanandamide, che è un agonista cannabinoide che agisce sui

recettori CB1 e modula il rilascio del ligando endogeno, l'ossido nitrico (NO), le prostaglandine e alcune chinine.

Un ulteriore studio di L.H. Lassen testimonia come il CGRP ricopra un ruolo chiave nella patogenesi dell'emicrania.

Nella seguente figura è rappresentato graficamente uno studio effettuato su 12 pazienti affetti da emicrania senza aura che hanno ricevuto in modo randomizzato una somministrazione endovenosa di human CGRP (2 µg/min) o di placebo (0,9% NaCl) (15). 5 pazienti hanno iniziato con il placebo, mentre gli altri 7 pazienti con hCGRP. L'intensità della cefalea è stata misurata in una scala da 1 a 10, in cui:

- Valori pari a 0 significano assenza di cefalea
- Valori da 1 a 4 significano la sensazione di un "pre-dolore" ma non la presenza di cefalea
- Valori da 5 a 9 significano cefalea di medio grado
- Valori pari a 10 significano cefalea di grado grave.

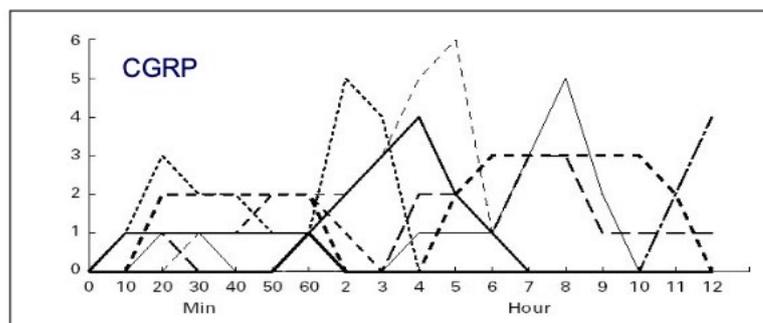
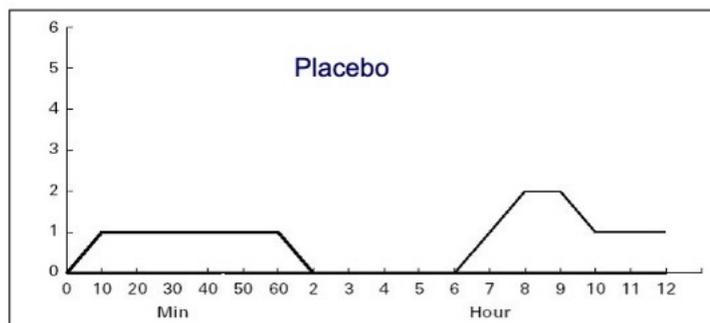


Figura 9. Risultati individuali (di 12 pazienti) riguardanti l'intensità della cefalea nei primi 60 minuti dopo l'infusione (cefalea immediata) e nelle seguenti 11 ore in pazienti a cui è stato somministrato il placebo (sopra) e in pazienti a cui è stata effettuata una somministrazione endovenosa di hCGRP (sotto) (15) .

Come è stato possibile osservare dal confronto tra la prima e la seconda tabella della Fig. 9, il CGRP ha provocato cefalea in quasi tutti i soggetti affetti da emicrania senza aurea, mentre il placebo non l'ha provocata. Dopo una media di 5 ore, in tutti i soggetti (a cui è stato somministrato il CGRP) si è sviluppata una cefalea. Questa cefalea presentava la maggior parte delle caratteristiche dell'emicrania e in tre tra questi soggetti ha soddisfatto i criteri diagnostici dell'International Headache Society per l'emicrania senza aurea.

1.7 Ruolo delle cellule di Schwann

Le cellule di Schwann (CS) sono cellule situate a livello del sistema nervoso periferico ed appartengono alla famiglia delle cellule della glia. Le CS rivestono gli assoni dei neuroni, circondandoli ed avvolgendoli più volte attorno all'assone con uno strato di mielina nella porzione più interna. La membrana cellulare delle CS si dispone attorno ad un unico assone, andando a formare una struttura a doppia membrana denominata mesassone, che si avvolge a spirale attorno all'assone in strati concentrici. Tra queste strutture, viene mantenuto verso l'esterno solo il citoplasma delle CS. Le CS forniscono i segnali necessari per la rigenerazione assonale e strutturale dei neuroni danneggiati in quanto funzionalmente possono essere attivate in seguito a lesioni dei nervi periferici. Inoltre, le CS si sono dimostrate importanti effettori per la trasmissione nocicettiva e confinano le fibre sensitive, al fine di trasmettere la nocicezione, ricoprendo il ruolo di fatto di cellule meccanosensibili. Quello che è noto, quindi, è che le cellule nocicettive di Schwann contribuiscono fisiologicamente alla percezione di stimoli meccanici. Inoltre, le cellule di Schwann svolgono un ruolo chiave nello studio del dolore neuropatico, in cui intervengono in diverse condizioni; ad esempio, citochine e chemochine responsabili del meccanismo del dolore neuropatico sono secrete dalle cellule di Schwann.

Nel modello di studio con l'utilizzo di etanolo si è verificato che il recettore del CGRP e del TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1 channels) nelle cellule di Schwann, provocassero l'attivazione dell'allodinia periorbitaria (16).

Secondo lo studio di De Logu et al., 2017, è stato dimostrato che il TRPA1 media l'ipersensibilità meccanica in diversi tipi di dolore neuropatico. Si è scoperto che TRPA1 è espresso sia nelle cellule di Schwann in coltura sia che nel tronco del nervo sciatico. Lo stesso studio ha permesso di evidenziare che il silenziamento di TRPA1 nei nocicettori attenuava l'allodinia meccanica, mentre il silenziamento di TRPA1 nelle cellule di Schwann riduceva sia l'allodinia meccanica che la neuroinfiammazione. Questo tipo di studi sta portando a dare un'importanza di rilievo alle CS nei meccanismi che riguardano la trasmissione del dolore.

Il CGRP, noto peptide vasodilatatore e importante trasmettitore del segnale doloroso, una volta rilasciato, ha come bersaglio il complesso recettoriale CLR/RAMP1, che è espresso dalle cellule di Schwann, e andrà poi ad evocare allodinia meccanica periorbitale.. Questo complesso recettoriale svolge la sua azione tramite una proteina $G\alpha_s$ ed è formato da 3 proteine:

1. Calcitonine-like receptor (CLR)
2. Receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1)
3. Receptor component protein (RCP)

Il dominio CLR, che è una proteina a 7 segmenti transmembrana, è accoppiato a proteina G di tipo stimolatorio, cioè in grado di aumentare i livelli di cAMP all'interno delle cellule. La proteina RAMP1 è anch'essa transmembrana (costituita da un solo segmento) ed è una proteina formante oligomeri con CLR, deputata al legame con CGRP dal lato extracellulare. La terza subunità, RCP, è una proteina intracellulare essenziale per stabilizzare l'interazione tra complesso recettoriale e proteina G.

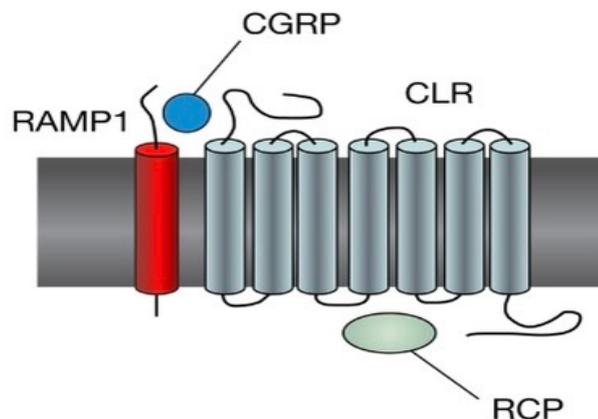


Figura 10. Recettore del CGRP e relativi domini (14).

Il CGRP lega sul lato extracellulare il complesso CLR/RAMP1 e, essendo CLR accoppiato a proteina G di tipo stimolatorio, provoca l'attivazione dell'adenilato ciclasi, promuovendo la sintesi di cAMP. In seguito ad aumento intracellulare di cAMP, si ha l'attivazione della protein chinasi A (PKA). La PKA attiva l'enzima nitrossido sintetasi (NOS) che stimola la sintesi di ossido nitrico (NO), inducendo vasodilatazione a livello delle cellule muscolari lisce dei vasi meningei, tramite l'attivazione della guanilato ciclasi e della fosfodiesterasi. Inoltre, l'interazione del CGRP con il suo recettore induce fosforilazione del fattore ERK (extracellular signal-regulated kinases), che promuove l'espressione di citochine pro-

infiammatorie a livello dei domini CREB (cAMP response elements), come IL-1 β e IL-6. Tali citochine vengono rilasciate a livello del trigemino, aumentando l'eccitabilità neuronale. L'ossido nitrico (NO), una volta sintetizzato, attiva a sua volta i canali TRPA1 sulle cellule di Schwann. Il canale TRPA1 attivato promuove la sintesi di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ed amplifica il segnale per l'allodinia tramite un percorso feed-forward (17). Da un lato i ROS agiscono su NOX1 all'interno delle cellule di Schwann, continuando il segnale con TRPA1 ed amplificando la neuroinfiammazione, dall'altro agiscono direttamente su TRPA1 neuronale, sostenendo l'allodinia meccanica.

1.8 Ruolo dei recettori oppioidi

I farmaci oppioidi agiscono legandosi a recettori presenti in diverse zone (a livello del SNC, SNP, tessuto nervoso gastrointestinale ed in cellule non neuronali, quali la microglia periferica e centrale, gli astrociti, i macrofagi). Modulano la percezione dolorifica ed agiscono come fattori trascrizionali. Più nel particolare, agiscono a livello limbico, alterando la componente in relazione al dolore ed agli aspetti emotivi dell'individuo.

Espressione e ruolo dei recettori oppioidi nella glia è ancora oggetto di attiva ricerca. Quello che è stato osservato è che, utilizzando la qPCR, sono stati trovati livelli molto bassi di mRNA del recettore MOP nella microglia isolata dal nucleo accumbens dei ratti. La presenza, inoltre, del recettore MOP nell'apparato di Golgi suggerisce che i recettori potrebbero essere sintetizzati dalla microglia. Solo pochi studi hanno valutato i recettori DOP, KOP e NOP nel contesto delle cellule gliali. Ciò che è stato rilevato è una scarsa quantità di mRNA del recettore DOP e bassissimi livelli del recettore KOP, mentre l'mRNA del recettore NOP non è stato rilevato nella microglia e negli astrociti di cervello di ratto adulto alla terza settimana post-natale. Le proteine espresse dei recettori NOP, KOP, e DOP sono state, invece, rinvenute negli astrociti e negli oligodendrociti nel cervello di ratto adulto e nel feto umano, mediante ibridazione in situ per l'mRNA del recettore NOP con colorazione immunofluorescente (18).

Il recettore NOP è un recettore di membrana accoppiato a proteina *G α i/o*. Questa proteina è in grado di modulare la via di segnalazione mediata dal cAMP: la G-protein associata al recettore riduce i livelli intracellulari di cAMP. In studi presenti in letteratura, il sistema recettoriale nocicettina/orfanina FQ (N/OFQ) – NOP condivide con i sistemi oppioidi elevate somiglianze strutturali e trasduzionali e, tra le altre, la capacità di modulare le risposte al dolore. Le prove provenienti da studi sui roditori e su umani, hanno dimostrato che i recettori per la N/OFQ sono espressi nelle strutture trigeminali (19). Il composto Ro 65-6570 è

stato utilizzato per studiare il potenziale degli agonisti selettivi del NOP nel controllo del dolore trigeminale (19). Quello che è stato osservato è che nel test con somministrazione orofacciale di formalina nei topi, il RO 65-6570 (agonista selettivo per il recettore NOP) produce effetti anti-nocicettivi dose-dipendente. Inoltre, la somministrazione di agonisti selettivi per il recettore NOP ha promosso effetti antinocicettivi senza effetti collaterali caratteristici dei farmaci oppioidi. Quello che è risultato da questo studio, infine, è che l'azione analgesica può derivare dall'attivazione simultanea dei recettori NOP e degli altri recettori oppioidi lungo diversi livelli delle vie nocicettive trigeminali, inclusi i nocicettori periferici.

In un altro studio, effettuato nei ratti, sono stati studiati gli effetti del recettore NOP con il suo ligando endogeno N/OFQ e la loro correlazione con la vasodilatazione durale neurogena. I risultati di questo studio mostrano come il ligando del recettore NOP, la N/OFQ, inibisce la vasodilatazione durale neurogena nei ratti. In seguito, invece, a somministrazione dell'antagonista del recettore, la vasodilatazione durale non viene inibita. Parallelamente, si è notato che N/OFQ inibisce le contrazioni della muscolatura liscia dell'arteria meningea media nel ratto (20).

Un altro recente studio ha trattato l'effetto della nitroglicerina (NTG) sull'espressione dei recettori DOP. I recettori DOP sono abbondantemente espressi nelle regioni del prosencefalo come l'ippocampo e la corteccia somatosensoriale. In questo studio, il trattamento cronico con nitroglicerina ha determinato una significativa allodinia basale/cronica nei topi. È stato considerato come agonista selettivo del recettore DOP il SNC80, che è in grado di alleviare l'allodinia meccanica indotta da NTG. Il trattamento con SNC80 ha bloccato lo sviluppo di allodinia sia cronica che acuta indotta da NTG. Questo dato suggerisce che i recettori DOP nei neuroni GABAergici del prosencefalo svolgono un ruolo critico negli effetti antiemicranici (21).

Questi studi testimoniano come gli agonisti selettivi del recettore NOP (N/OFQ, Ro 65-6570), del recettore DOP (SNC80) e degli altri recettori oppioidi, in generale, possano attenuare i sintomi simil-emicranici e suggeriscano che questi agonisti possano essere considerati per futuri studi sul trattamento dell'emicrania.

2 Scopo dello studio

Posta l'ipotesi sul ruolo eziopatologico delle cellule di Schwann nell'emicrania, l'idea è stata di andare a ricercare nuovi attori farmacologici e molecolari che possano andare a contrastare le vie di segnalazione attivate dall'AMP ciclico (cAMP), attraverso l'attivazione di proteine G di tipo inibitorio. Lo scopo di questo studio è stato quello di concentrarsi sulla presenza dei recettori oppioidi nelle cellule di Schwann in quanto recettori accoppiati a proteine G inibitorie, ad esempio il recettore NOP, anche da quanto già risulta in letteratura (20), potrebbe essere un buon candidato come target nel contesto dell'emicrania. Questo sarebbe possibile grazie alla capacità degli oppioidi di ridurre le concentrazioni intracellulari di cAMP che sono invece incrementate dall'internalizzazione del CGRP, la cui trasduzione del segnale causa, oltre alla vasodilatazione neurale, anche infiammazione neurogena e sensibilizzazione dei neuroni. Il ruolo dei recettori oppioidi sarebbe quindi in grado di garantire un antagonismo funzionale nei confronti del CGRP.

Lo studio si è svolto su colture di cellule di Schwann umane (hSC), andando a studiare l'espressione dei diversi recettori oppioidi (NOP, KOP, DOP e MOP), la capacità di diversi agonisti selettivi di attivare questi recettori da un punto di vista funzionale e, infine, sulla valutazione preliminare di ligandi fluorescenti per andare prossimamente a ricercare l'espressione di questi recettori a livello di membrana. Lo studio è mirato, inoltre, ad una migliore comprensione del sistema recettoriale delle cellule di Schwann e del segnale di trasduzione di sistemi di segnale importanti anche nell'emicrania.

3 Materiali e Metodi

3.1 Colture cellulari

In questo studio sono state utilizzate diverse linee cellulari:

- Linee cellulari CHO (cellule ovariche di criceto cinese) in microscopia confocale
- hSC (cellule di Schwann umane) per tutti gli altri esperimenti (qPCR e label free)
- Linee cellulari HEK (cellule di rene umano embrionale) in microscopia confocale

3.2 Protocolli sperimentali

CHO (KOP, MOP, DOP)

Le cellule CHO (wild type) sono cellule epiteliali dell'ovaio di criceto cinese. Queste cellule vengono fatte crescere in fiasche T75 contenenti 13 mL di terreno pre-riscaldato. Il terreno, specifico per questa linea cellulare, contiene una miscela 50:50 di DMEM e Ham's F12 con il 10% di FBS (fibronectine bovine serum, conservato a -20 °C), 1% di L-Glutamina (2mM), Pennicillina/Streptomicina (100 U/ML) e Sodio-Piruvato. Inoltre, per le cellule CHO ricombinanti (CHO-KOP, CHO-MOP e CHO-DOP), il terreno deve contenere anche lo 0,01% di G418, antibiotico di selezione.

Le cellule sono state poi collocate in incubatrice a 37°C con il 5% di CO₂ e sono state fatte crescere in fiasche da coltura mono-strato. Una volta raggiunto l'80% di confluenza, è stato rimosso il terreno di coltura, è stata lavata la fiasca con 5 mL di PBS sterile per rimuovere le cellule morte ed i detriti cellulari e le cellule sono state staccate utilizzando 2 mL di una soluzione di tripsina-EDTA. Sono state poi seminate in quantità 1:10 (o 1:20, in base all'esperimento da predisporre successivamente) in piastre diverse, con l'aggiunta di altro terreno pre-riscaldato per arrivare ai 13 mL necessari.

Cellule di Schwann

Per lo studio in vitro sono state utilizzate le hSC (cellule di Schwann umane) ottenute da nervi spinali umani (le cellule vengono utilizzate per circa 5-7 passaggi in coltura) e crioconservate a -80°C dalla ditta produttrice (Innoprot). Il Medium Kit delle cellule di Schwann che è stato utilizzato era provvisto di 500 mL

di Basal Medium, 20 mL di FBS, 5 mL di SCGS (Schwann cell Growth supplement, conservato a -20°C) e 5 mL di P/S (Pennicillin/Streptomycin a -20°C). Le cellule di Schwann, successivamente allo scongelamento, sono state poste in una fiasca con 13 mL di terreno pre-riscaldato e lasciate crescere in incubatrice a 37°C con il 5% di CO₂. Al raggiungimento dell'80% della confluenza, è stato eseguito lo split delle cellule in rapporto 1:4 (o 1:3), rimuovendo il terreno, eseguendo un lavaggio con 5 mL di PBS per rimuovere cellule morti e detriti cellulari e aggiungendo 2 mL di tripsina-EDTA per staccare le cellule. Per il successivo congelamento cellulare, è stato utilizzato un medium contenente il 90% di medium colturale e il 10% di DMSO.

HEK293-NOP

Le cellule HEK293-NOP (ricombinanti, esprimono il recettore NOP) sono cellule epiteliali dell'ovaio di criceto cinese. Queste cellule vengono fatte crescere in fiasche T75 contenenti 13 mL di terreno pre-riscaldato. Il terreno, specifico per questa linea cellulare, contiene una miscela di DMEM, il 10% di FBS (fibronectine bovine serum, conservato a -20 °C), 1% di L-Glutammina (2mM), Pennicillina/Streptomicina (100 U/ML), 0,02% di igromicina B. Le cellule sono state poi collocate in incubatrice a 37°C con il 5% di CO₂ e sono state fatte crescere in fiasche da coltura mono-strato. Una volta raggiunto l'80% di confluenza, è stato rimosso il terreno di coltura, è stata lavata la fiasca con 5 mL di PBS sterile per rimuovere le cellule morte ed i detriti cellulari e le cellule sono state staccate utilizzando 2 mL di una soluzione di tripsina-EDTA. Sono state poi seminate in quantità 1:10 (o 1:20, in base all'esperienza da predisporre successivamente) in piastre diverse, con l'aggiunta di altro terreno pre-riscaldato per arrivare ai 13 mL necessari.

Reagenti

Per lo svolgimento di questa tesi sperimentale sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Medium arricchito per HSC, l'SCGS (Schwann Cells Growth Solution), la FPB (fibronectina bovina) acquistati dalla Innoprot (Derio (Bizkaia), Spain).
- DMSO, kit per la retrotrascrizione e Luna© Universal RT-qPCR Master Mix, tripsina-EDTA, FBS, PBS, DMEM, Ham's F12, P/S 100X (ECB3001), Sodio Piruvato, L-Glutammina 100X 200nM ECB3000D, G418, igromicina B acquistati da Euroclone S.p.A. (Pero, MI, Italia).

- Cloroformio (Merck), etanolo (PanReac, Darmstadt), acqua per biologia molecolare e acqua MilliQ (PanReac).
- EuroGold Trifast (Euroclone®, Italia).
- Dermorphin, N/OAQ, DeltorphinC, Carbacolo e CGRP (acquistati da Med Chem Express) , [D-Pro10]DynA(1-11), Dermorphin_{ATTO488}, [D-Pro10]DynA(1-11)_{ATTO655}, Deltorphin_{CATTO390}, N/OAQ_{ATTO594} sintetizzati dal gruppo del Prof. Guerrini (22,23).

3.3 Studio dell'espressione dei recettori oppioidi

Le cellule di Schwann (hSC) sono state lisate con l'utilizzo della soluzione Trifast (soluzione contenente fenolo, guanidinio isotiocianato ed acqua) per ottenere l'RNA. Successivamente l'acido nucleico è stato quantificato tramite Nanodrop ed è stata sviluppata la sintesi del corrispondente cDNA tramite utilizzo del termociclatore. Il trattamento delle cellule è stato condotto come da protocollo sperimentale.

3.3.1 Procedura di estrazione dell'RNA dalle hSC

Le cellule sono state seminate in una piastra da 6 pozzetti con 1 mL di terreno. Le cellule sono state fatte crescere overnight all'interno dei pozzetti (100.000 c/w). Il Giorno successivo, le cellule sono state lisate mediante l'utilizzo di 0,5 mL di TRIFAST II (miscela formata da fenolo, guanidinio isotiocianato ed acqua). Il contenuto totale di ogni pozzetto è stato poi trasferito in delle eppendorf. In ognuna di queste eppendorf sono stati poi aggiunti 50 µl di cloroformio (utilizzato per separare le diverse fasi), sono state lasciate a 4 °C per 15 minuti e poi centrifugate sempre a 4 °C a 14000 rpm per 15 minuti.

In seguito a centrifugazione si sono formate 3 fasi distinte: una fase organica rossa contenente proteine e lipidi, una interfase contenente il DNA e una fase acquosa superiore trasparente contenente l'RNA. È stata successivamente prelevata la fase acquosa superiore (100 µl) e trasferita in nuove corrispondenti eppendorf. L'RNA prelevato è stato fatto precipitare mediante l'aggiunta di 150 µl di isopropanolo 100% (in alternativa per la precipitazione è possibile utilizzare etanolo al 96%). La miscela che si è formata è stata prima centrifugata, è stato poi rimosso il surnatante e sono stati aggiunti 300 µl di etanolo 70% ad ogni campione. È stata eseguita una ulteriore centrifugazione a 13000 rpm ed è stato ripetuto una seconda volta il lavaggio con etanolo 70%. L'etanolo che rimane è stato fatto asciugare a temperatura ambiente per 10 minuti e il precipitato è stato poi risospeso in 15 µl di acqua per biologia molecolare.

3.3.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA estratto

La quantificazione dell'RNA estratto è stata effettuata tramite lettura spettrofotometrica al NanoDrop™ 2000 alla lunghezza d'onda di 260 nm e la quantità rilevata di RNA viene espressa in ng/μl. L'indice di purezza dell'RNA totale viene valutato mediante due parametri:

1. Il rapporto 260/280, che è indicatore della contaminazione di molecole proteiche, che assorbono a 280 nm. Questo valore deve essere compreso tra 1.8 e 2.1, con tolleranza attorno ai valori di 1.7.
2. Il rapporto 260/230, che è indicatore della contaminazione di fenolo. Questo valore deve essere compreso tra 2 e 2.2, inferiormente al valore limite si possono avere contaminazioni.

Dai campioni contenenti l'RNA, è stato prelevato 1 μl da ciascuno e tramite NanoDrop™ 2000 sono state rilevate le concentrazioni finali di RNA in quantità valida per impostare in seguito la metodica qPCR.

3.3.3 Reazione di retro-trascrizione a cDNA

Per avere il cDNA corrispondente (DNA complementare a doppio filamento), abbiamo utilizzato la reazione di retrotrascrizione. Ciò è reso possibile grazie all'utilizzo del termociclatore e dell'enzima retrotrascrittasi, una DNA polimerasi RNA dipendente. La reazione è stata condotta seguendo il protocollo, che prevede 3 fasi:

- Legame dei primer al filamento di RNA del campione, che si svolge per 5 minuti a 25°C (reazione di priming)
- Reazione di retrotrascrizione, che dura 20 minuti a 46°C
- Termine della reazione in cui gli enzimi vengono denaturati (1 minuto a 95°C)

3.3.4 Preparazione dei campioni per qPCR

Ogni campione è stato conservato a -80 °C. A ciascuno è stato successivamente aggiunto un determinato volume di reagente MASTER-MIX 5X (Luna® Universal qPCR Master Mix Protocol (M3003)), che viene calcolato sulla base della concentrazione dell'RNA precedentemente estratto. Il Luna Universal qPCR Master Mix 5X è una miscela di reazioni 5x progettata per la quantificazione in tempo reale di sequenze di cDNA bersaglio utilizzando il canale SYBR/FAM. La suddetta soluzione contiene la DNA polimerasi Hot Start Taq ed è stata formulata in modo analogo al classico Sybr green. Sono stati poi suddivisi per lo studio di

diversi trascritti per i recettori andando ad aggiungere una specifica quantità di primer nei campioni più quantitativi. I primer forniti permettono l'amplificazione dei geni relativi alla sequenza primaria dei recettori oppioidi, con il confronto di due geni housekeeping di controllo, ovvero il GADPH e l'HPRT1. Ogni primer è stato progettato con un campione per la sequenza Forward e per la sequenza Reverse, per poter amplificare entrambi i sensi (3'-> 5' e 5'->3') del relativo filamento di DNA copia ricavato precedentemente con il termociclatore. Sono stati utilizzati i campioni con maggior purezza dell'RNA quantificato estratto e ad ogni campione, per ogni µl di RNA quantificato sono stati aggiunti 10 µl di H2O e 5 µl di Master Mix. Una volta preparati i campioni nelle soluzioni è stato predisposto il layout per le posizioni per l'amplificazione e la quantificazione in qPCR.

Le soluzioni primers utilizzate riguardano:

- **Primers recettori oppioidi:** NOP-F, NOP-R, MOP-F, MOP-R, DOP-F, DOP-R, KOP-F, KOP-R
- **Primers dei Controlli:** HPRT1-F, HPRT1-R, GADPH-F, GADPH-R

I primers dei controlli sono per il gene GADPH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi umana) e per il gene HPRT ed entrambi rappresentano geni housekeeping.

Piastratura per qPCR

- Elaborazione del layout per la ricerca dei recettori con qPCR
- Aggiunta di 10 µl sulla piastra per la qPCR secondo il layout di riferimento
- qPCR per assemblaggio cDNA
- Elaborazione con Primer e Fasi di riscaldamento per qPCR

3.3.5 PCR in tempo reale con Primers dei geni oppioidi per ricerca RNA estratto da hSC

La RT-PCR consente di quantificare il livello di espressione di uno specifico gene attraverso l'amplificazione della catena di DNA. Per quantificarne l'espressione, è stato utilizzato un colorante fluorescente (SYBR green), che è in grado di intercalarsi nel solco minore della catena di DNA. L'intensità di fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di DNA amplificato. Sono stati utilizzati i primer di interesse, specifici per 6 diversi geni, codificanti per NOP, DOP, MOP, KOP, GADPH ed HPRT. Per ciascun gene sono stati utilizzati i primer forward e reverse con le sequenze di seguito riportate.

Geni di Interesse	Forward	Reverse
hNOP	CCCAAGGAGGTTGCACACTA	GCGCCTGGTTGCAGAA
hMOP	CGGTTCCCTGGGTCAACTTGT	AGTCTTCATCTTGGTGTATCTGACA
hDOP	CGGCATCGTCCGGTACACTA	CTTGACAGGGTGGCAGGACAG
hKOP	AACAGCAGCGCCTGGTTTC	GTCTTCATCTTTGTGTATCGGATGA

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati nella ricerca in vitro dei recettori oppioidi mediante qPCR.

La reazione Real-Time prevede diverse fasi:

1. Inizializzazione, con attivazione della DNA polimerasi a 95 °C per 20 secondi;
2. Denaturazione, con la dissociazione dei due filamenti stampo, a 95 °C per 20 secondi;
3. Annealing, ovvero il legame del primer a ciascun filamento, a 64 °C per 20 secondi;
4. Estensione, in cui avviene il processo di allungamento delle catene, a 72 °C.

Gli ultimi 3 passaggi vengono ripetuti per 40 volte dal sistema.

Il Ct (Cycle threshold) identifica il numero di cicli di amplificazione necessari per ottenere una intensità luminosa sufficientemente alta da risultare superiore a quella che equivale al rumore di fondo. La curva ciclo-fluorescenza che possiamo ottenere consiste in tre fasi:

- La prima fase, in cui la fluorescenza rimane a livelli di fondo (rumore di fondo) e non c'è un suo aumento rilevabile (cicli 1-18);
- La seconda fase, che prevede un aumento esponenziale della fluorescenza (c'è aumento esponenziale del prodotto) e viene prodotto un segnale fluorescente rilevabile in quanto viene raggiunta e superata la soglia Ct;
- La terza fase, in cui si ottiene un appiattimento della curva, detta fase stazionaria.

3.3.6 Elaborazione dei dati raccolti con qPCR

L'elaborazione dei dati è stata effettuata apportando una normalizzazione, che viene fatta sul gene HPRT. Il risultato è infine espresso come $2^{-\Delta Ct}$. La potenza di 2 è dovuta al fatto che ad ogni ciclo di PCR si ha un raddoppio della quantità di DNA. Valori maggiori di 1 indicano un aumento del livello di espressione rispetto al controllo, al contrario valori minori di 1 indicano una minor espressione rispetto al controllo. Per la qPCR è stato utilizzato il macchinario Quan Studio 5 della ThermoFisher, esportando a fine processo i dati grezzi e quantificando con software excel su Windows.

I livelli di Ct risultanti sono inversamente proporzionali alla quantità di acido nucleico presente nel campione utilizzato, quindi minore risulta essere il Ct, maggiore è la quantità di acido nucleico nel campione. Valori di Ct minori di 29 indicano reazioni fortemente positive e un abbondante quantitativo di acido nucleico nel campione esaminato. Se il Ct è compreso in valori tra 30 e 37, le reazioni sono positive ed indicano una quantità moderata di acido nucleico nel campione. Con valori di Ct oltre 38 significa che con la reazione è stato rilevato un quantitativo di acido nucleico minimo. Non essendo stati effettuati trattamenti che coinvolgono l'espressione dell'mRNA, l'espressione dei recettori è stata determinata normalizzando il livello di espressione genica di interesse utilizzando l'equazione $2^{-\Delta Ct}$ (e non $2^{-\Delta\Delta Ct}$ in quanto non è stato utilizzato nessun campione precedentemente trattato per andare a modificarne l'espressione) (27).

$$\Delta Ct = Ct \text{ medio del GENE TARGET} - Ct \text{ medio del GENE HOUSEKEEPING}$$

Questa formula applicata permette la normalizzazione del campione.

3.4 Studio dell'attività funzionale dei recettori oppioidi nelle hSC

Per studiare l'attivazione dei recettori oppioidi nelle hSC e l'intensità della risposta intracellulare sono stati condotti diversi esperimenti Label Free su cellule intere. Per condurre esperimenti Label Free abbiamo utilizzato lo strumento XCELLigence (Agilent).

Lo strumento XCELLigence permette di monitorare in tempo reale diversi processi cellulari quali crescita cellulare, la proliferazione e l'adesione, contrattilità. Il cuore del sistema è rappresentato da piastre composte da 96 pozzetti. Queste piastre elettroniche (E-Plates) hanno sensori di microelettrodi integrati sul fondo dei pozzetti. I microelettrodi del sistema formano un condensatore, viene applicata una tensione e si misurano le correnti elettriche

risultanti. In base a queste correnti elettriche viene calcolata l'impedenza. Quindi, le cellule e gli elettrodi formano un circuito elettrico accoppiato ad un analizzatore di impedenza. L'analisi di questi dati fornisce misure quantitative dell'attivazione cellulare. L'analisi delle variazioni di bioimpedenza permettono l'elaborazione del Cell Index (CI), un parametro che fornisce informazioni quantitative riguardanti la risposta cellulare.

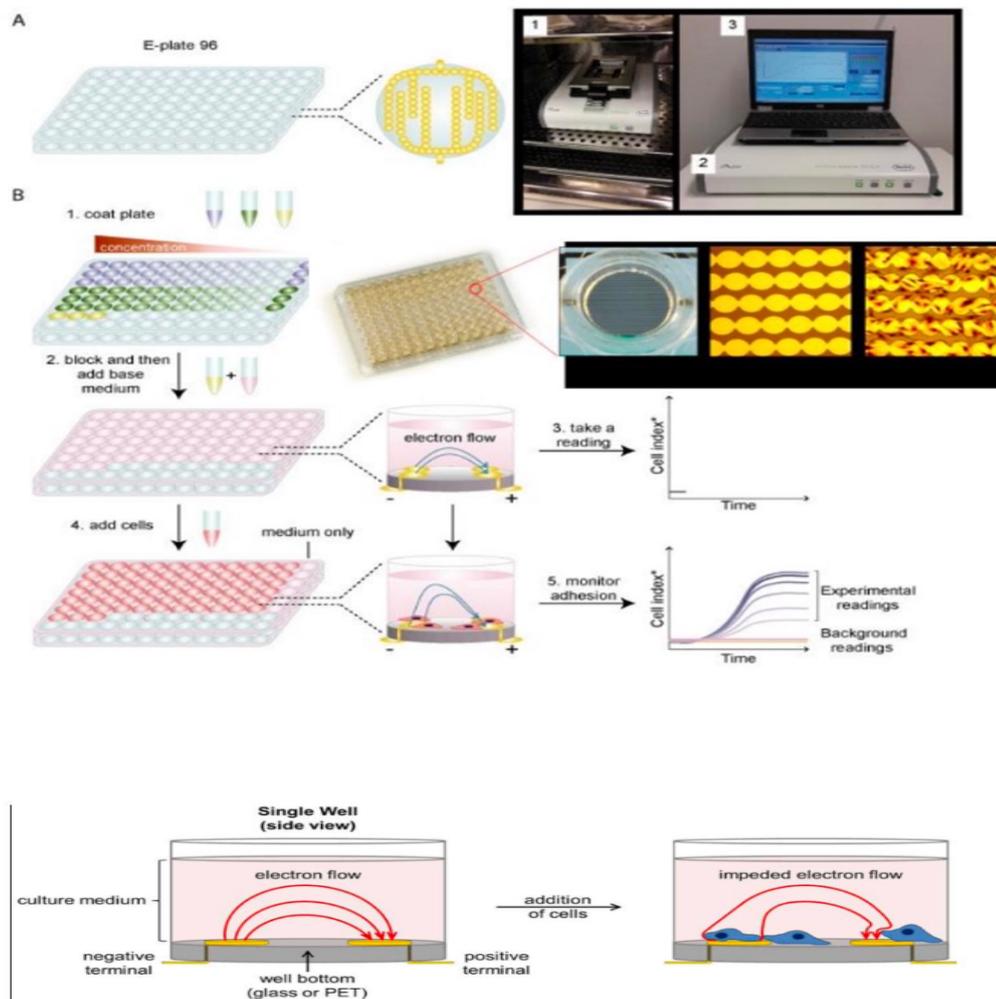


Figura 11. Rappresentazione del saggio label free basato sulla bioimpedenza, parametro valutato per rilevare la risposta cellulare.

3.4.1 Preparazione delle cellule

GIORNO 1

Per il suddetto esperimento è necessario fare il coating della piastra: sono stati aggiunti 80 µl di PDL (Poli-D-Lisina, 1:100 con PBS) per ogni pozzetto. La piastra è stata poi lasciata in incubatore per almeno 1 ora e successivamente, dopo aver rimosso il PDL, è stato effettuato un doppio lavaggio con 100 µl di PBS. Sono stati poi aggiunti 50 µl di terreno di coltura ed è stata effettuata con lo strumento la lettura del basale, con la presenza del solo terreno di coltura all'interno dei pozzetti della piastra. Per proseguire con l'esperimento, sono state staccate le hSC dalla flask e sono state sottoposte a centrifugazione per ottenere il solo pellet all'interno di una falcon predisposta. Le cellule sono poi state contate utilizzando il Cell Counter e sono state poi seminate in ciascun pozzetto della E-Plate. Per quanto riguarda il numero di cellule, nel corso dei diversi esperimenti è stato deciso di seminare un diverso numero di cellule in modo da poter confrontare nei diversi casi il diverso comportamento cellulare, una possibile relazione tra la diversa confluenza cellulare e la differente attivazione cellulare e quindi una maggior o minor risposta ai ligandi in base alla differente confluenza nei 96 pozzetti. Sono stati fatti esperimenti di prova a diverse densità tra 30.000 e 100.000 cellule per pozzetto ed alla fine si è optato per l'utilizzo di 30.000 cellule in 50 µl di terreno di coltura. Le cellule sono state poi lasciate aderire overnight alla piastra (all'interno dell'incubatore) e nel frattempo è stata registrata nuovamente l'impedenza senza l'aggiunta di ligandi.

GIORNO 2

Una volta lasciate le cellule overnight ad incubare, il terreno di coltura è stato rimosso. Una volta rimosso il terreno, in ciascun pozzetto è stato aggiunto il Buffer (composto da 45 mL di HBSS, 900 µl di HEPES conc 0,02M e 0,5mg di BSA 0,1%). Una volta aggiunto il buffer, è stata eseguita la starvation, che prevede il mantenimento della piastra in incubatore per 2 ore in modo che le cellule possano stabilizzarsi con il nuovo mezzo di coltura, in cui mancano i fattori di crescita. Durante la starvation, viene eseguita la preparazione della piastra dei ligandi, una seconda piastra in cui vengono preparati i composti da aggiungere per poi andare ad osservare una eventuale attivazione cellulare. I ligandi utilizzati per questo tipo di esperimento sono stati: DeltorphinC, N/OFQ, Dermorphin, CGRP, [D-Pro10]DynA(1-11) per studiare la risposta cellulare, poi EGF e Carbacolo utilizzati come controlli positivi. Nella piastra dei ligandi sono stati aggiunti, prima dei ligandi, 190 µl di buffer in ciascun pozzetto della prima riga e 180 µl di buffer in tutte le righe inferiori. Successivamente, sono stati aggiunti 10 µl di ogni

ligando nella prima riga (dove ogni ligando avrà la concentrazione più alta, diversa per ogni determinato ligando) per ottenere un volume totale di 200 μl in ciascun pozzetto della prima riga. Sono stati successivamente trasferiti 20 μl del contenuto dei pozzetti della prima riga nelle righe inferiori, ottenendo di volta in volta una diluizione 1:10 dei ligandi. L'ultima riga della piastra conterrà in alcuni pozzetti solo buffer mentre in 3 pozzetti 10 μl di ciascun diverso controllo.

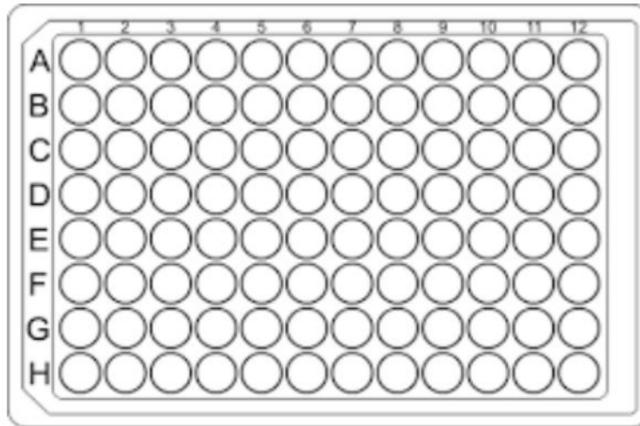


Figura 12. È qui rappresentata una piastra trasparente da 96 pozzetti su cui vengono caricati i ligandi con il buffer.

Una volta preparata la piastra dei ligandi, ai 100 μl del buffer presente nella E-Plate sono stati aggiunti 25 μl di ligando (i ligandi vengono preparati ad una concentrazione 5 volte superiore alla concentrazione finale) in ogni pozzetto (in duplicato, in modo che nelle prime due colonne della E-Plate venga aggiunto il primo ligando con le diverse concentrazioni nei diversi pozzetti, nella seconda e nella terza colonna il secondo ligando e così via). L'impedenza è stata poi misurata dallo strumento XCELLigence per almeno 100 minuti. I risultati sono stati poi elaborati e normalizzati.

3.4.2 Analisi e valutazione dei dati

Il software RTCA PRO è stato utilizzato per calcolare ed interpretare i dati ottenuti e per ottenere la normalizzazione rispetto al valore basale, cioè in situazione di presenza del solo buffer privo di qualsiasi ligando dell'indice cellulare (CI). La cinetica ottenuta con l'esperimento viene utilizzata per ottenere la AUC (area under curve) o l'effetto picco di ciascun ligando utilizzato con il programma GraphPad 8.0. I dati sono espressi come errore standard della media (SEM) di n esperimenti eseguiti in duplicato.

3.5 Studio tramite Microscopia Confocale

Per studiare l'espressione proteica dei recettori oppioidi K sulle cellule di Schwann è stato utilizzato il microscopio confocale.

La microscopia confocale è una tecnologia per l'osservazione ad alta risoluzione di campioni biologici vitali o fissati. Si tratta di una tipologia di microscopia che si avvale di un microscopio ottico capace di incrementare sensibilmente la risoluzione spaziale del campione, eliminando gli effetti della diffusione della luce.

Lo strumento opera nel campo convenzionale degli ingrandimenti della normale microscopia ottica ed è costituito (schematicamente) da un microscopio a trasmissione a cui viene sovrapposto un sistema in grado di illuminare e rilevare l'immagine di un campione con una scansione punto a punto. La metodica utilizzata per lo studio dell'espressione proteica è il CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope), che è un microscopio a fluorescenza che permette di focalizzare con elevata precisione un laser sul campione, aumentando la risoluzione e la profondità di campo. Questo tipo di microscopio è composto da una sorgente luminosa, laser ed ottica (è possibile utilizzare il contrasto di fase), un sistema di lenti convergenti (posizionati in modo da convogliare la luce su un determinato fascio assiale) ed un sistema di scansionatori.

In microscopia confocale la luce puntiforme è prodotta da un pinhole posto davanti alla sorgente, la luce viene poi focalizzata dal collettore e dal condensatore sul campione, per poi essere raccolta dall'obiettivo e focalizzata su un secondo pinhole. In corrispondenza di questo è presente anche il rilevatore d'immagine, che produce un segnale proporzionale all'intensità della luce che lo colpisce. I due pinhole appartengono a piani focali coniugati e si dicono dunque "confocali", da qui deriva il nome di questa particolare tecnica microscopica.

3.5.1 Test preliminari con ligandi ATTO su cellule CHO e su HEK293

Le molecole di ATTO (Prof. Guerrini) (22,23) sono composti fluorofori legati chimicamente ad uno specifico composto in grado di legarsi specificatamente ai recettori oppioidi, sulla base della specifica selettività per un determinato recettore oppioide. I composti sono:

- [D-Pro10]DynA(1-11)_{ATTO655}
- Deltorphin_{CATTO390}
- N/OFQ_{ATTO594}
- Dermorphin_{ATTO488}

Per la verifica dell'espressione dei recettori oppioidi sulle SC tramite saggi di fluorescenza, l'adeguatezza del ligando marcato con fluoroforo deve essere precedentemente validata. È stata effettuata la validazione del ligando marcato con la microscopia confocale, avvalendosi di cellule ovariche di criceto cinese ricombinanti (CHO) che esprimono il recettore KOP, il recettore DOP, il recettore MOP e di cellule di rene umano embrionale (HEK293) che esprimono il recettore NOP, per la verifica dell'espressione dei recettori oppioidi KOP, DOP, MOP e NOP in microscopia confocale direttamente in coltura (Lambert, Calò). Ci si è posti dunque l'obiettivo di svolgere l'esperimento come controllo positivo sulle cellule ricombinanti, al fine di validarne la metodica su CHO e HEK, prima di predisporre lo studio esplorativo sulle SC.

Il parametro principale che influenza la fluorescenza emessa dalle cellule è l'intensità del laser che le colpisce (Laser Intensity). Questo parametro viene impostato sulla base del background (fluorescenza basale emessa). Il background può essere maggiore o minore in base allo spettro di assorbimento del ligando che emette fluorescenza. Con una fluorescenza basale minore, l'intensità laser impostata per condurre l'esperimento sarà più potente di quella impostata quando osserviamo invece una fluorescenza basale maggiore. Nel caso delle CHO-NOP e delle CHO-KOP, è stata impostata un'intensità laser pari a 37% (il background osservato era poco potente), mentre per lo studio del recettore DOP è stata utilizzata un'intensità laser minore (15%, in quanto il background osservato era maggiore rispetto a quello degli altri recettori).

3.5.2 Studio della fluorescenza al Microscopio Confocale

Per cominciare con lo studio tramite microscopia confocale, dopo aver piastrato le cellule su ciascun pozzetto, viene rimosso il medium e vengono aggiunti 500 μ l di buffer contenente HBSS+Hepes+BSA. Prima di tutto, viene visualizzato il background, cioè la quantità di fluorescenza emessa senza l'aggiunta di ligando marcato. Successivamente il buffer predisposto viene rimosso e vengono aggiunti 250 μ l di medium contenente il ligando marcato ad una determinata concentrazione e si attende 5 minuti (per l'interazione tra ligando e recettore). Dopo i 5 minuti, si va a visualizzare il segnale nel pozzetto di interesse. Dopo la visualizzazione alla concentrazione maggiore di ligando viene aggiunto, in un diverso pozzetto, l'antagonista competitivo in modalità preventiva (Naloxone, Naltrindole oppure SB-612111, tutti alla concentrazione pari a 1 μ M), e si lascia incubare per 15 minuti prima dell'aggiunta del ligando marcato. Questa modalità è volta a confermare l'antagonismo di legame tra recettore e ligando marcato.

4 Risultati

4.1 Livelli di trascritto per i recettori oppioidi

I dati ottenuti attraverso la qPCR, a livello dei trascritti isolati da hSC, hanno evidenziato una bassa espressione dei recettori MOP, DOP e NOP, mentre il recettore KOP non è risultato espresso (Figura 13).

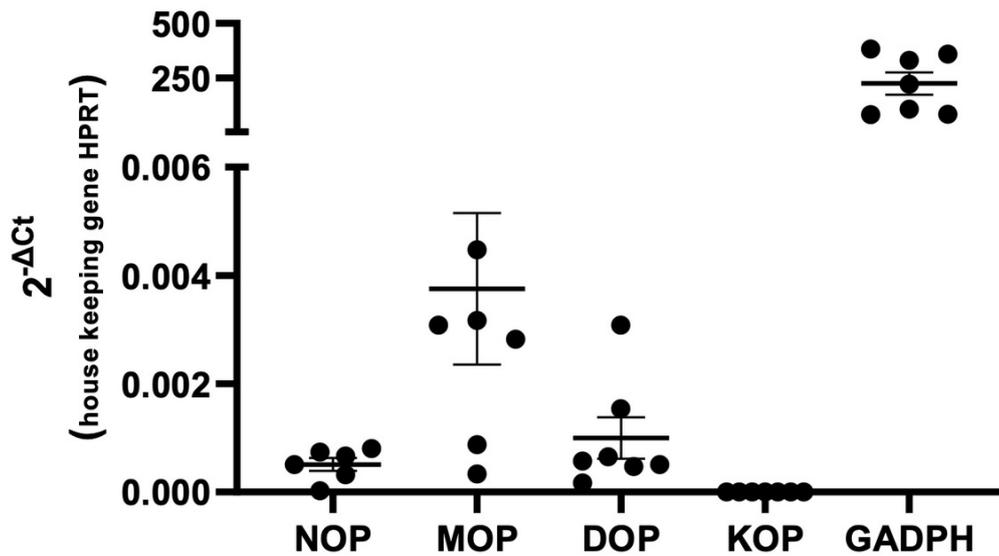


Figura 13. Quantificazione tramite qPCR dei trascritti dei geni OPR1 (NOP), OPRM1 (MOP), OPRD1 (DOP), OPRK1 (KOP) in hSC. I dati sono rappresentati come $2^{-\Delta Ct}$ media \pm sem (n = 5-7, N=2).

4.2 Esperimenti di bioimpedenza

Valutazione degli effetti dell'agonista muscarinico Carbacolo (CCh)

Nella seguente figura (Figura 14), sono evidenziati gli effetti di concentrazioni crescenti dell'agonista muscarinico CCh ottenuti dalle medie di n=7 esperimenti condotti in duplicato. CCh mostra una potenza (pEC_{50}) di circa 5 ed effetti massimi (E_{max}) di circa 0.5 Cl.

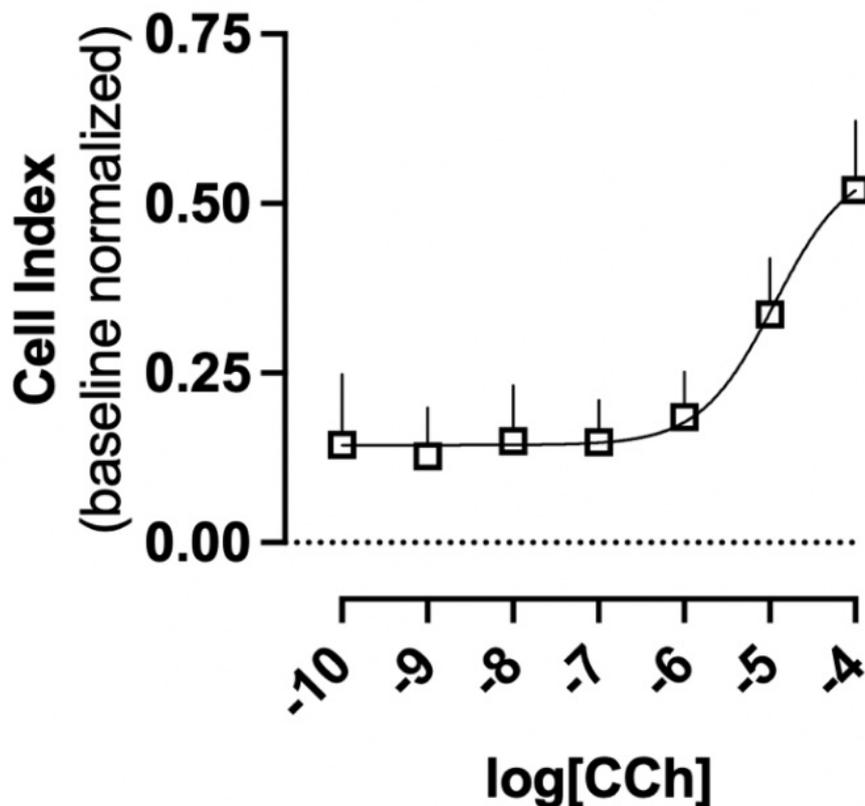


Figura 14. Effetti di CCh in hSC tramite saggio bioimpedenziometrico. Effetti di concentrazioni crescenti di CCh ottenuti dalle medie di 7 esperimenti condotti in duplicato. In ordinate è rappresentato il cell index normalizzato rispetto all'effetto del basale e nelle ascisse il Log_{10} di concentrazioni crescenti di CCh (100 pM – 100 μM).

4.3 Valutazione degli effetti di CGRP e confronto con EGF

Le curve normalizzate (Figura 15) mostrano l'effetto del CGRP sulle hSC alla sua concentrazione maggiore (1 μM) nel corso dei diversi esperimenti. Si sono osservati effetti molto variabili con differenze comprese tra 0 e 0,5 CI. È stato possibile, inoltre, correlare l'effetto massimo del CGRP con l'effetto massimo del ligando EGF all'interno del medesimo esperimento: quando l'effetto massimo evocato dall'EGF è basso, è molto modesta anche la risposta cellulare al CGRP. Osservando i valori di CI riguardanti l'EGF minori di 0,4, quello che è stato evidenziato è che il valore di CI riguardante il CGRP è molto vicino allo zero.

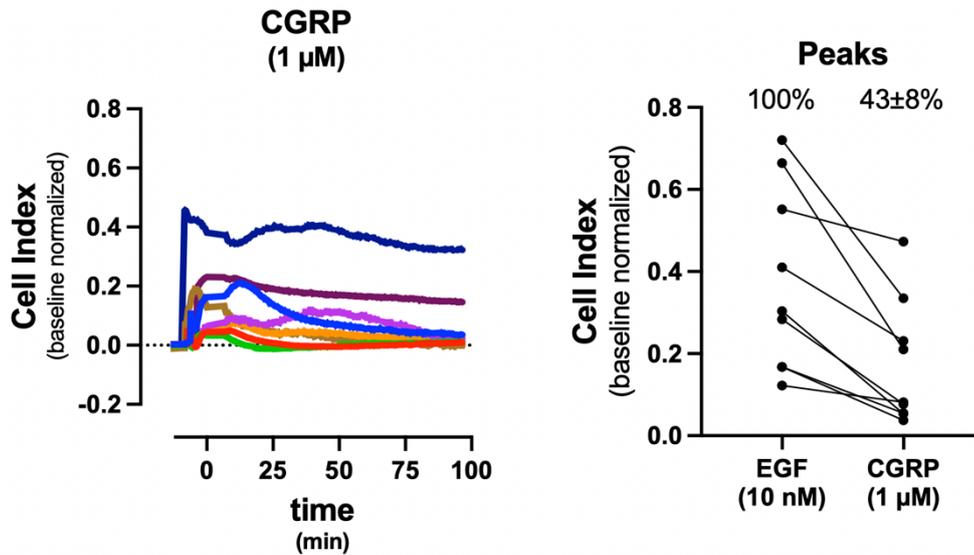


Figura 15. Effetti di CGRP in SC tramite saggio bioimpedenziometrico. Cinetiche di CGRP 1 μ M ottenute in 8 esperimenti separati (A). Picco degli effetti di EGF (10 nM) e CGRP (1 μ M) nei diversi esperimenti condotti, le percentuali rappresentano la frazione di picco \pm sem rispetto ad EGF in 8 esperimenti separati condotti in duplicato (B).

4.4 Valutazione degli effetti di agonisti selettivi NOP/OP e confronto con EGF

Nella figura seguente (Figura 16) sono stati riassunti gli effetti di due concentrazioni elevate (1 e 10 μ M) di agonisti selettivi per i recettori NOP (N/OFQ), MOP (dermorphin), DOP (deltorphin C), e KOP ([DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂). La selettività dei ligandi è stata oggetto di studi precedenti. Come è stato precedente osservato con il CGRP, le risposte cellulari ai diversi ligandi sono variabili nei diversi esperimenti. In questo studio si è osservata una modesta e variabile attivazione con i ligandi N/OFQ e [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂. È stata osservata, invece, una ancor minore stimolazione con Dermorphin e Deltorphin C.

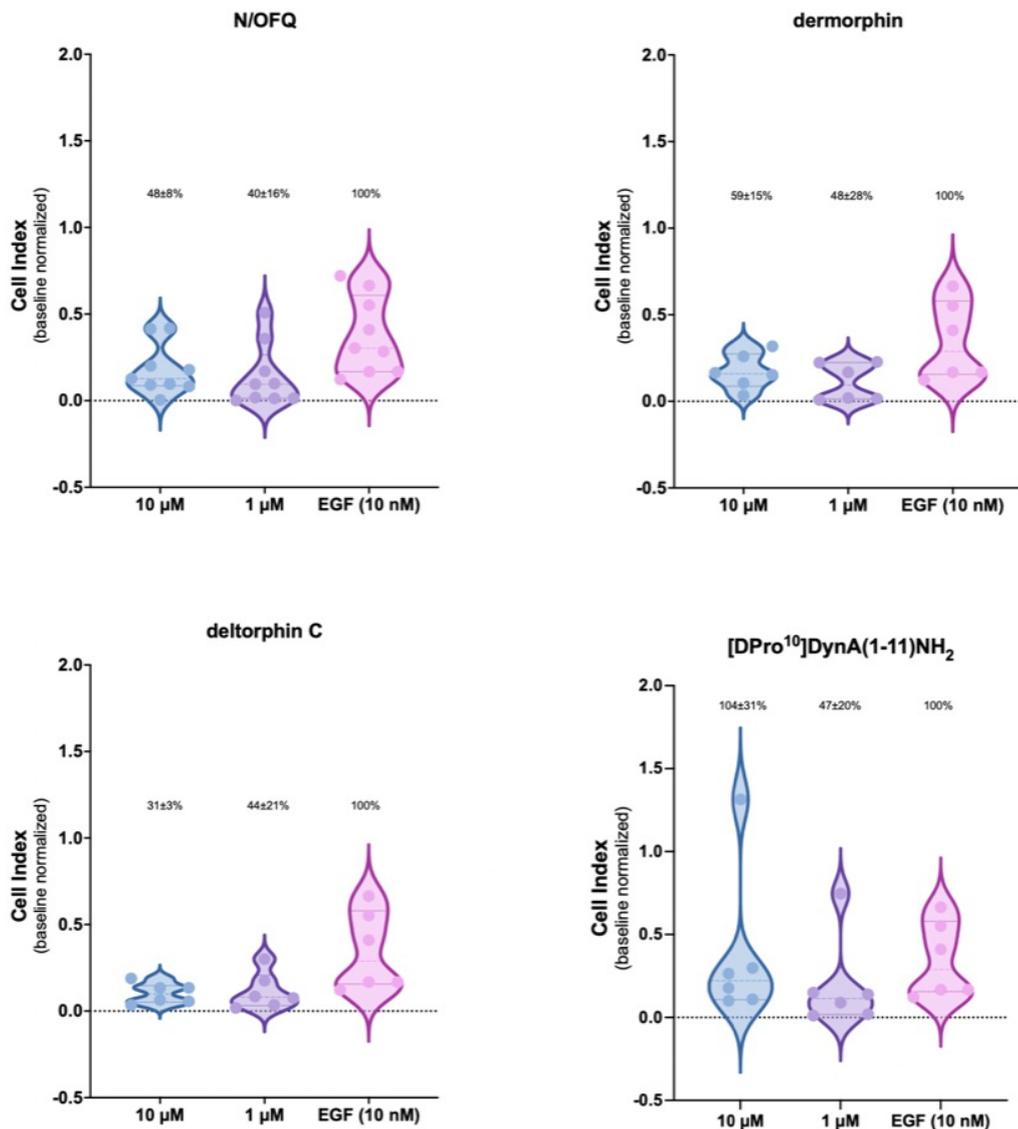


Figura 16. Effetti di N/OFQ, Dermorphin, Deltorpin C e [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ in SC tramite saggio bioimpedenziometrico. Picco degli effetti di N/OFQ (10 e 1 μM), Dermorphin (10 e 1 μM), Deltorpin C (10 e 1 μM) e [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ (10 e 1 μM) nei diversi esperimenti condotti – per confronto sono presentati gli effetti di EGF (10 nM). I dati rappresentano il picco degli effetti normalizzati sul basale di 6-8 esperimenti condotti in duplicato.

4.5 Studio preliminare di microscopia confocale per valutare le proprietà di ligandi oppioidi fluorescenti

I ligandi N/OFQ, Dermorphin, Deltorpin C e [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ sono stati coniugati a 4 differenti molecole fluorescenti (ATTO594, ATTO488, ATTO390, ATTO655), ottenendo i ligandi N/OFQ_{ATTO594}, Dermorphin_{ATTO488}, Deltorpin C_{ATTO390} e [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂_{ATTO655}.

Si sono utilizzate colture cellulari esprimenti stabilmente i recettori NOP, MOP, DOP e KOP.

N/O_{FQ}_{ATT0594} - Le immagini sotto riportate (Figura 17) sono rappresentative di esperimenti preliminari volti a validare il ligando N/O_{FQ}_{ATT0594} tramite la valutazione del legame con il recettore NOP in cellule HEK293 che esprimono stabilmente il recettore NOP. Le cellule non mostrano autofluorescenza (riquadro A), l'incubazione con N/O_{FQ}_{ATT0594} 100 nM consente di visualizzare la presenza di fluorescenza sulla membrana delle cellule (riquadro C, immagine scattata 5 minuti dopo l'aggiunta del ligando). Il pretrattamento con un antagonista selettivo e competitivo (preincubazione della durata di 15 minuti) per il recettore NOP, SB-612111 1 μ M, ha prevenuto in maniera quasi completa il legame di N/O_{FQ}_{ATT0594} 100 nM con le cellule (riquadro E) confermando la specificità di legame ligando – recettore.

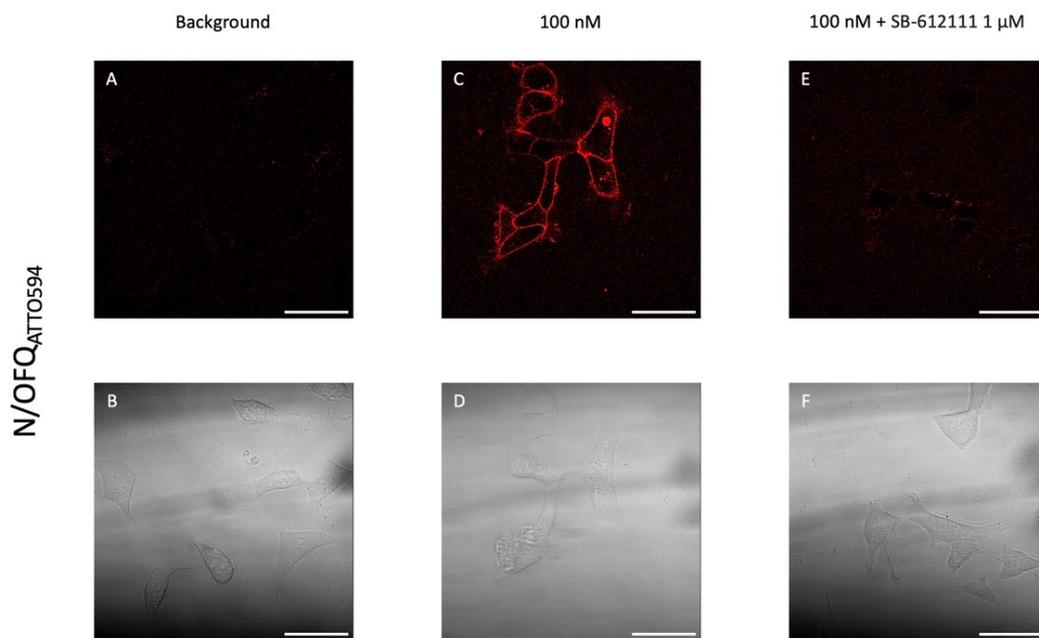


Figura 17. Valutazione del ligando fluorescente N/O_{FQ}_{ATT0594} in cellule esprimenti stabilmente il recettore NOP tramite microscopia confocale. Fluorescenza basale delle cellule HEK293_{NOP} (A) e rispettivo bright field (B), fluorescenza emessa da N/O_{FQ}_{ATT0594} (100nM, C) e rispettivo bright field (D), fluorescenza residua emessa da N/O_{FQ}_{ATT0594} (100nM, E) in presenza dell'antagonista SB-612111 (1 μ M) e rispettivo bright field (F).

[DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 - Le immagini sotto riportate (Figura 18) sono rappresentative di esperimenti preliminari volti a validare il ligando [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 tramite la valutazione del legame con il recettore KOP in cellule CHO che esprimono stabilmente il recettore KOP. Le cellule non mostrano autofluorescenza (riquadro A), l'incubazione con [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 10 nM consente di visualizzare la presenza di fluorescenza sulla membrana delle cellule (riquadro C, immagine scattata 5 minuti dopo l'aggiunta del ligando). Il pretrattamento con un antagonista competitivo (preincubazione della durata di 15 minuti) per il recettore KOP, quale Naloxone 1 μM, ha prevenuto in maniera quasi completa il legame di [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 10 nM con le cellule (riquadro E) confermando la specificità di legame ligando – recettore.

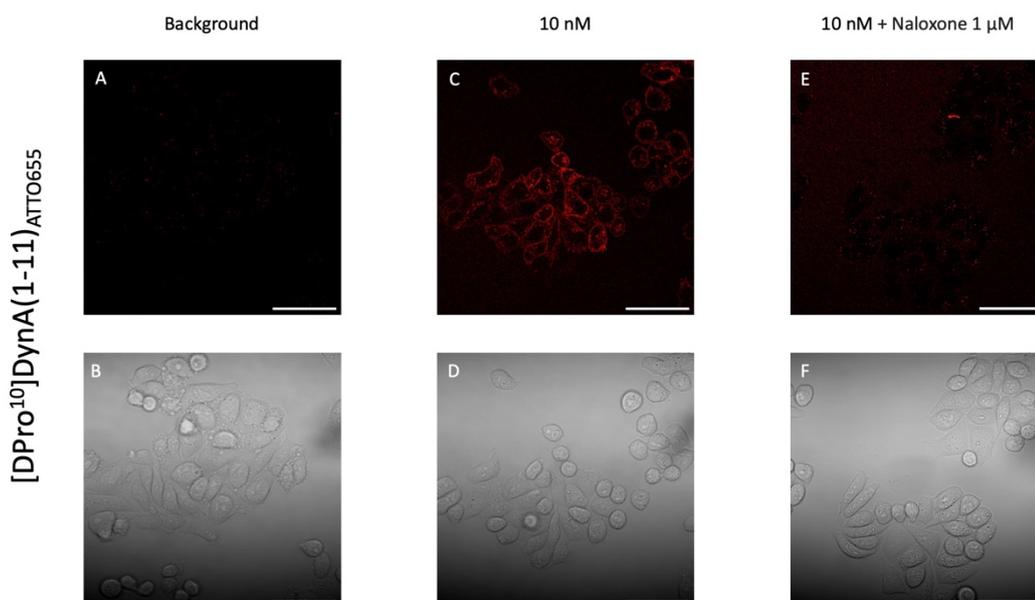


Figura 18. Valutazione del ligando fluorescente [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 in cellule esprimenti stabilmente il recettore KOP tramite microscopia confocale. Fluorescenza basale delle cellule CHO_{KOP} (A) e rispettivo bright field (B), fluorescenza emessa da [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 (10nM, C) e rispettivo bright field (D), fluorescenza residua emessa da [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂ATT0655 (10nM, E) in presenza dell'antagonista Naloxone (1 μM) e rispettivo bright field (F). Le immagini ottenute sono rappresentative di 2 esperimenti.

Deltorphin_{CATTO390} - Le immagini sotto riportate (Figura 19) sono rappresentative di esperimenti preliminari volti a validare il ligando Deltorphin_{CATTO390} tramite la valutazione del legame con il recettore in cellule CHO che esprimono stabilmente il recettore DOP con proteina G chimerica. Le cellule mostrano una bassa autofluorescenza (riquadro A), l'incubazione con Deltorphin_{CATTO390} 1 μ M consente di visualizzare la presenza di fluorescenza sulla membrana delle cellule (riquadro C, immagine scattata 5 minuti dopo l'aggiunta del ligando). Il pretrattamento con un antagonista selettivo e competitivo (preincubazione della durata di 15 minuti) per il recettore DOP, quale Naltrindole 1 μ M, ha prevenuto in maniera quasi completa il legame di Deltorphin_{CATTO390} 1 μ M con le cellule (riquadro E) confermando la specificità di legame ligando – recettore.

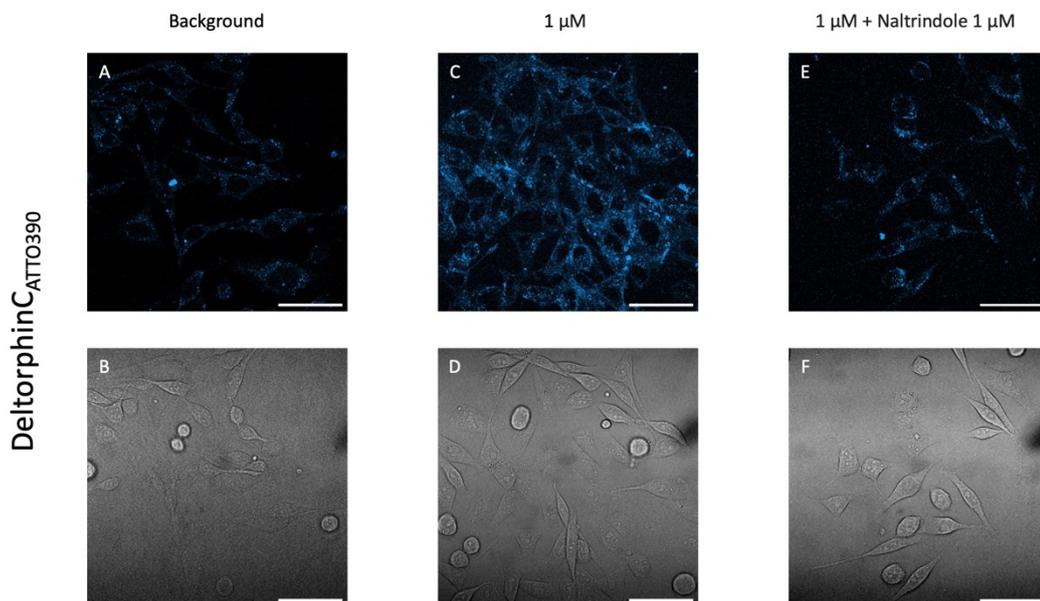


Figura 19. Valutazione del ligando fluorescente Deltorphin_{CATTO390} in cellule esperimenti stabilmente il recettore delta tramite microscopia confocale. Fluorescenza basale delle cellule CHO_{DOP} con proteina G chimerica (A) e rispettivo bright field (B), fluorescenza emessa da Deltorphin_{CATTO390} (1 μ M, C) e rispettivo bright field (D), fluorescenza residua emessa da Deltorphin_{CATTO390} (1 μ M, E) in presenza dell'antagonista Naltrindole (1 μ M) e rispettivo bright field (F). Le immagini ottenute sono rappresentative di 2 esperimenti.

Dermorphin_{ATTO488} - Le immagini sotto riportate (Figura 20) sono rappresentative di esperimenti preliminari volti a validare il ligando Dermorphin_{ATTO488} tramite la valutazione del legame con il recettore in cellule CHO che esprimono stabilmente il recettore MOP. Le cellule mostrano una bassa autofluorescenza (riquadro A), l'incubazione con Dermorphin_{ATTO488} 100 nM consente di

visualizzare la presenza di fluorescenza sulla membrana delle cellule (riquadro C, immagine scattata 5 minuti dopo l'aggiunta del ligando). Il pretrattamento con un antagonista competitivo (preincubazione della durata di 15 minuti) per il recettore MOP, quale Naloxone 1 μ M, ha prevenuto in maniera quasi completa il legame di Dermorphin_{ATTO488} 100 nM con le cellule (riquadro E) confermando la specificità di legame ligando – recettore.

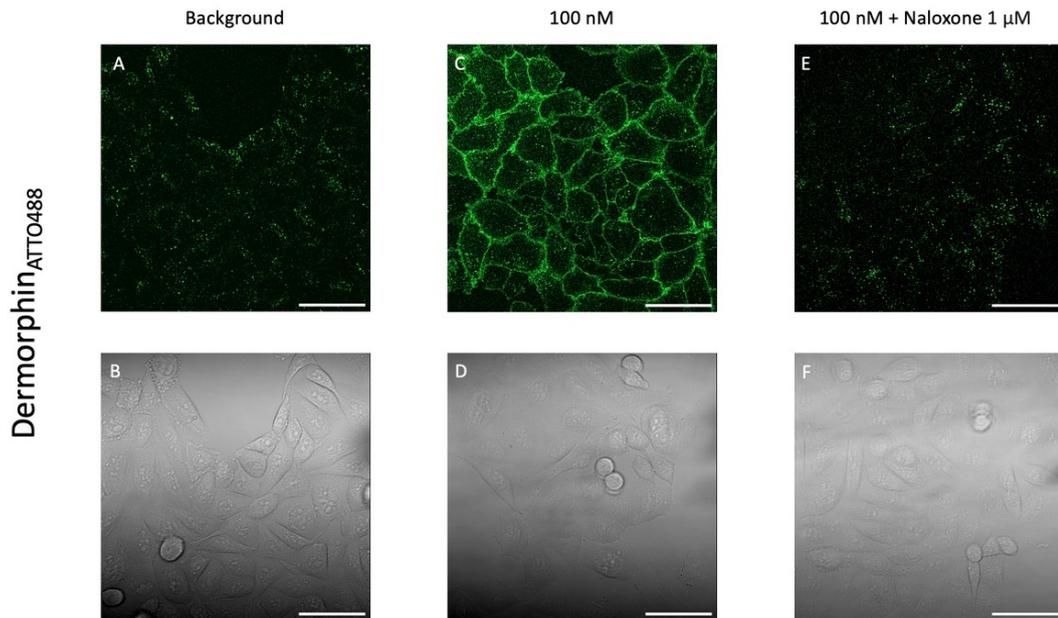


Figura 20. Valutazione del ligando fluorescente Dermorphin_{ATTO488} in cellule esponenti stabilmente il recettore mu tramite microscopia confocale. Fluorescenza basale delle cellule CHO_{MOP} (A) e rispettivo bright field (B), fluorescenza emessa da Dermorphin_{ATTO488} (100 nM, C) e rispettivo bright field (D), fluorescenza residua emessa da Dermorphin_{ATTO488} (100 nM, E) in presenza dell'antagonista Naloxone (1 μ M) e rispettivo bright field (F). Le immagini ottenute sono rappresentative di 2 esperimenti.

5 Discussione

In questo studio abbiamo valutato espressione e funzionalità dei recettori oppioidi in cellule di Schwann. La loro presenza potrebbe essere in prospettiva sfruttata per antagonizzare funzionalmente il recettore per CGRP. Il sistema CGRP è di notevole importanza nelle moderne terapie antiemicraniche e dati di letteratura suggeriscono come, in questo contesto, un ruolo importante sia giocato dalle cellule di Schwann. L'espressione dei trascritti dei recettori oppioidi è risultata in generale bassa, da un punto di vista funzionale è stata misurata una certa variabilità nell'attivazione del recettore di CGRP, mentre la stimolazione dei recettori muscarinici, tramite CCh ha generato un profilo farmacologico meno variabile ed in linea con quanto riportato in letteratura. Inoltre, la stimolazione dei quattro recettori oppioidi con ligandi selettivi ha prodotto risposte variabili ma misurabili per il recettore NOP e KOP. Infine, sono stati generati dati di microscopia confocale in cellule esprimenti stabilmente i diversi recettori oppioidi con ligandi marcati fluorescentemente.

Più nel particolare, in questo studio ci si è concentrati sulla quantificazione dei livelli dei trascritti dei geni codificanti per i recettori oppioidi NOP, MOP, KOP e DOP in colture primarie di hSC. Tra i quattro recettori di cui è stato valutato il livello di espressione, i trascritti per i recettori NOP, MOP e DOP risultano espressi a bassi livelli mentre non è stata rilevata alcuna espressione per il recettore KOP.

Come si può osservare da studi già presenti in letteratura, avvalendosi di qPCR sono stati misurati livelli molto bassi di espressione del recettore MOP nella microglia isolata dal nucleo accumbens di ratti trattati in acuto con morfina. Inoltre, non sono stati evidenziati rilevanti livelli di espressione del recettore DOP sempre tramite l'utilizzo di metodica qPCR, nella microglia e negli astrociti isolati dal nucleo accumbens di ratti trattati con morfina. Per quanto riguarda l'espressione degli altri due recettori oppioidi, invece, sono stati rilevati bassi livelli per il recettore NOP e bassissimi livelli per il recettore KOP (18). Ulteriori risultati ottenuti da studi effettuati sull'espressione dei recettori oppioidi, in particolare sul recettore KOP, suggeriscono che potrebbe verificarsi un aumento della sua espressione, a livello sia centrale che periferico, e della sua funzione in presenza di stati di dolore neuropatico cronico (24).

Per quanto riguarda gli studi di variazione bioimpedenziometrica (che tramite il Cell Index misurano l'attivazione funzionale dei recettori di interesse nelle hSC), sono stati effettuati esperimenti con diversi ligandi. In primis è stato valutato il Carbacolo (CCh). Sono già presenti in letteratura alcuni studi che documentano rilevanti livelli di espressione di tutti i sottotipi di recettori muscarinici (M1, M2,

M3) nelle hSC, rilevati con qPCR. Il recettore di nostro interesse è il sottotipo M2, in quanto il CCh, in qualità di agonista muscarinico, in seguito ad interazione con il recettore M2 stimola la differenziazione delle hSC (25).

Dalle curve sopra raffigurate (Figura 14) si può osservare come l'agonista CCh sia in grado di attivare il proprio recettore nelle hSC e di produrre una elevata variazione nel Cell Index in testimonianza di una avvenuta stimolazione cellulare. È stato studiato tramite saggio bioimpedenziometrico anche il Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP). Edvindhsson e colleghi hanno evidenziato l'abilità del CGRP di causare vasodilatazione sia via aumento del cAMP intracellulare sia con un meccanismo endotelio-dipendente. In particolare, per quanto riguarda il meccanismo cAMP dipendente, la stimolazione dei recettori per il CGRP sulla membrana delle hSC genererebbe l'internalizzazione del complesso recettoriale con conseguente attivazione del segnale di traduzione del cAMP (17,26). Ciò che ne è risultato è che il CGRP produce una stimolazione sulle hSC molto variabile alla concentrazione più elevata. Ciò che è stato possibile osservare, invece, è che i valori di CI (Cell Index) in seguito ad interazione delle hSC con CGRP e quelli di CI in seguito a stimolazione con il ligando EGF sono in correlazione: quando l'effetto dell'EGF sulle hSC misurato è basso, si ha, in concomitanza, un basso effetto del CGRP, nonostante l'elevatissima variabilità nella risposta caratteristica di quest'ultimo agonista. La relazione tra la risposta al recettore tirosin-chinasico EGFR e al recettore accoppiato a proteine G (del CGRP) è tutt'altro che scontata; probabilmente una buona risposta ad EGF è sintomo di buona responsività al saggio label free. Di conseguenza, anche le risposte al CGRP sono più sostenute.

Attraverso saggi di bioimpedenziometria, sono stati valutati anche gli agonisti dei 4 diversi recettori oppioidi: N/OFQ, Dermorphin, Deltorphin C e [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂. Tutti i composti testati sono sufficientemente selettivi per i diversi recettori oppioidi per garantire l'applicazione della metodica label-free (Simon Katharina et al, Congresso Nazionale SIF 2024). Sebbene l'espressione di tutti i recettori per gli agonisti precedentemente citati sia risultata molto bassa, sono stati condotti degli studi sulla loro attivazione e quello che è stato possibile notare è che gli agonisti selettivi per questi recettori stimolano in modo molto variabile i recettori NOP, MOP, KOP e DOP con una risposta modesta solo da parte dei recettori NOP e KOP.

È importante notare come nel campo delle proteine di membrana, ed in particolar modo dei GPCR, a fronte di una bassa espressione del livello di trascritto la quantità di proteina e di proteina funzionale espresse spesso non correlino. A tale scopo analizziamo la loro espressione come trascritti, come presenza a livello della membrana e la loro capacità di essere attivati (e bloccati).

N/OFO_{ATTO594} è stato valutato tramite microscopia confocale in cellule HEK293 vive, non fissate. Questo esperimento, già precedentemente pubblicato in letteratura, ci ha permesso di validare l'adeguatezza del ligando fluorescente e del nostro approccio in microscopia. Inoltre, nel protocollo sperimentale utilizzato, è stato possibile osservare che il pretrattamento con un antagonista selettivo per il recettore NOP (SB-612111) previene il legame del ligando marcato al proprio recettore. L'esperimento ha generato risultati simili a quelli pubblicati in letteratura (23). Lo stesso protocollo è stato applicato a cellule CHO ricombinanti con Dermorphin_{ATTO488}, con Deltorphin C_{ATTO390} e con [DPro¹⁰]DynA(1-11)NH₂_{ATTO655}.

Tra i precedenti 3, in letteratura erano presenti studi riguardanti esclusivamente il recettore MOP (22) e i risultati ottenuti ci hanno permesso di osservare che sono stati generati risultati simili a quelli già pubblicati. Questo approccio verrà quindi applicato all'identificazione dei recettori NOP, MOP, KOP e DOP sulle cellule di Schwann.

Ciò che possiamo concludere in merito ai risultati ottenuti per quanto riguarda il possibile ruolo modulatore degli agonisti oppioidi nell'emicrania è riassumibile nei seguenti punti:

- a) nelle condizioni sperimentali in cui si è sviluppato lo studio proposto, l'interazione CGRP-hSC ha dato una elevatissima variabilità con una risposta pressochè trascurabile; questa variabilità sembra legata in generale alla responsività a stimoli proliferatori quali EGF;
- b) questa grande variabilità potrebbe mascherare il ruolo dei recettori oppioidi che comunque appaiono scarsamente espressi. In prospettiva futura, ciò che potrebbe essere di fondamentale aiuto per la ripetizione dei medesimi esperimenti consiste nel:
 1. cambiare tipologia di hSC mediante il cambio di provider delle cellule;
 2. valutare la loro attività in colture primarie generate ad hoc.

Tuttavia, rimane comunque di alto interesse sviluppare terapie meglio tollerate per trattare l'emicrania. Questo studio non solo offre una maggior comprensione di importanti tool farmacologici come i ligandi marcati fluorescentemente per valutare l'espressione dei recettori oppioidi; inoltre offre importanti prospettive per uno studio più approfondito dei meccanismi trasduzionali operanti nelle cellule di Schwann e in grado di governare la risposta al dolore periferico.

6 Bibliografia

1. Barbanti P, Rognoni C, Malorni W, Tarricone R, Marconi M, Orthmann N, Torbica A. Emicrania: Una malattia di genere. Impatto socio-economico in Italia. Prima edizione (ottobre 2018).
2. Khan J, Al Asoom L I, Al Sunni A, Rafique N, Latif R, Al Saif S, Almandil N B, Almohazey D, Abdulazeez S, Borgio J F. Genetics, pathophysiology, diagnosis, treatment, management, and prevention of migraine. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 139 (2021) 111557
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111557>
3. G S Grieco, S Gagliardi, I Ricca, O Pansarasa, M Neri, F Gualandi, G Nappi, A Ferlini, C Cereda. Nex CACNA1A deletions are associated to migraine phenotypes. 2018 Aug 30;19(1):75. doi: 10.1186/s10194-018-0891-x
4. Joshua Lai, Esmā Dilli. Migraine Aura: Updates in Pathophysiology and Management. *Current Neurology and Neuroscience Reports* (2020) 20: 17.
<https://doi.org/10.1007/s11910-020-01037-3>
5. P C Tfelt-Hansen. History of migraine with aura and cortical spreading depression from 1941 and onwards. *Cephalalgia*. 2010 Jul;30(7):780-92. doi: 10.1111/j.1468-2982.2009.02015.x
6. Vincenzo Guidetti, Lidia Savi. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders. Terza edizione (2018).
7. .ICHD-II Classification: Parts 1–3: Primary, Secondary and Other. *Cephalalgia* [Internet]. maggio 2004 [citato 3 dicembre 2023];24(1_suppl):23–136. Disponibile su: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1111/j.1468-2982.2004.00653.x>
8. Messoud Ashina. Migraine. *N Engl J Med*. 2020 Nov 5;383(19):1866-1876. doi 10.1056/NEJMra1915327
9. Laura Mayans, MD, MPH, and Anne Walling, MB, ChB. University of Kansas School of Medicine, Wichita, Kansas. Acute Migraine Headache: Treatment Strategies. *Am Fam Physician*. 2018;97(4):243-251
10. Rosaria Greco, Chiara Demartini, Anna M Zanaboni, Daniele Piomelli, Cristina Tassorelli. Endocannabinoid System and Migraine Pain: An Update. *Front Neurosci*. 2018 Mar 19;12:172. doi: 10.3389/fnins.2018.00172
11. Piero Barbanti, Cinzia Aurilia. Ultra-late response (> 24 weeks) to anti-CGRP monoclonal antibodies in migraine: a multicenter, prospective, observational study. 17 January 2024. Volume 271, pages 2434–2443, (2024).
12. Jes Olesen, Rami Burstein, Messoud Ashina, Peer Tfelt-Hansen. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitization. *Lancet Neurol*. 2009 Jul; 8(7):679-90.

13. Amara, S., Jonas, V., Rosenfeld, M. *et al.* Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298, 240–244 (1982). <https://doi.org/10.1038/298240a0>.
14. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014 Oct;94(4):1099-142. doi: 10.1152/physrev.00034.2013. PMID: 25287861; PMCID: PMC4187032.
15. Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B & Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 2002; 22:54-61. London. ISSN 0333-1024.
16. Wei Zhongya, Ying Fei, Wenfeng Su, Gang Chen. Emerging Role of Schwann Cells in Neuropathic Pain: Receptors, Glial Mediators and Myelination. *Front. Cell. Neurosci.* 2019 13:116. doi: 10.3389/fncel.2019.00116.
17. De Logu, F., Nassini, R., Hegron, A. *et al.* Schwann cell endosome CGRP signals elicit periorbital mechanical allodynia in mice. *Nat Commun* 13, 646 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28204-z>
18. Halina Machelska, Melih O. Celik. Opioid Receptors in Immune and Glial Cells - Implications for Pain Control. *Front. Immunol.*, 04 March 2020. Volume 11 - 2020 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00300>
19. A. Rizzi, C. Ruzza, S. Bianco, C. Trapella, G. Calo', Antinociceptive action of NOP and opioid receptor agonists in the mouse orofacial formalin test, *Peptides*, Volume 94, 2017, Pages 71-77, ISSN 0196-9781, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.07.002>.
20. Bartsch T, Akerman S, Goadsby PJ. The ORL-1 (NOP1) receptor ligand nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits neurogenic dural vasodilatation in the rat. *Neuropharmacology.* 2002 Nov;43(6):991-8. doi: 10.1016/s0028-3908(02)00148-x.
21. Dripps, Bertels, S. Moye, F. Tipton, Siegersma. Forebrain delta opioid receptors regulate the response of delta agonist in models of migraine and opioid-induced hyperalgesia. (2020) 10:17629 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74605-9>
22. Giakomidi D, Bird MF, McDonald J, Marzola E, Guerrini R, Chanoch S, et al. (2021) Evaluation of [Cys(ATTO 488)⁸]Dermorphin-NH₂ as a novel tool for the study of μ -opioid peptide receptors. *PLoS ONE* 16(4): e0250011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250011>
23. Bird, Guerrini, Willets, Thompson, Calò, Lambert. Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) conjugated to ATTO594: a novel fluorescent probe for the N/OFQ (NOP) receptor. October 2018 <https://doi.org/10.1111/bph.14504>
24. Kyle E. Parker, Elizabeth Sugiarto, Anna M.W. Taylor, Arynah A. Pradhan and Ream Al-Hasani. Pain, Motivation, Migraine, and the Microbiome: New Frontiers for Opioid Systems and Disease. *Molecular Pharmacology* October

- 2020, 98 (4) 433-444; DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.120.119438>
25. Piovesana, Faroni, Tata, J. Reid. Functional Characterization of Muscarinic Receptors in Human Schwann Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 6666; doi:10.3390/ijms21186666
26. De Logu F, Nassini R, Landini L, Geppetti P. Pathways of CGRP Release from Primary Sensory Neurons. *Handb Exp Pharmacol.* 2019;255:65-84. doi: 10.1007/164_2018_145. PMID: 29980913.
27. Al-Hashimi M, McDonald J, Thompson JP, Lambert DG. Evidence for nociceptin/orphanin FQ (NOP) but not μ (MOP), δ (DOP) or κ (KOP) opioid receptor mRNA in whole human blood. *Br J Anaesth.* 2016 Mar;116(3):423-9. doi: 10.1093/bja/aev540. PMID: 26865135.