

EFFETTI DI UNA NUOVA FORMA DI GLUCOSAMINA SULLA DEGRANULAZIONE DEI MASTOCITI. STUDIO IN VITRO

EFFECTS OF A NEW FORM OF GLUCOSAMINE ON MAST CELL DEGRANULATION. AN IN VITRO STUDY

ALDA MIOLO¹, PAOLA BADINO², RAFFAELLA BARBERO², GIOVANNI RE²

¹ Centro di Documentazione e Informazione Scientifica (CeDIS), Innovet Italia, Saccolongo (Padova)

² Dipartimento di Patologia Animale, Sezione di Farmacologia e Tossicologia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

Il lavoro oggetto del presente articolo è stato presentato al "10th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Turin, Italy, 17-22 September 2006"

Riassunto

Obiettivo - Valutare gli effetti *in vitro* di una nuova forma di glucosamina (Glupamid®) sulla degranulazione dei mastociti, alla luce del coinvolgimento patogenetico di queste cellule nell'artrosi.

Materiali e metodi - Cellule RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia cells*) sono state incubate con serotonina marcata, sensibilizzate con anticorpi monoclonali (IgE) anti-dinitrofenolo (DNP) e stimolate con albumina umana coniugata con DNP, in presenza o assenza di Glupamid®. L'effetto di Glupamid® è stato misurato come percentuale di inibizione del rilascio di serotonina.

Risultati - Glupamid® si è dimostrato attivo nel ridurre significativamente e in maniera dose-dipendente il rilascio di serotonina da parte delle cellule RBL-2H3.

Discussione e conclusioni - La capacità di diminuire la degranulazione mastocitaria dimostrata dalla nuova forma di glucosamina in studio conferma che la molecola agisce attraverso il cosiddetto meccanismo ALIA (*Autacoid Local Injury Antagonism*), cioè la modulazione dell'eccessiva degranulazione mastocitaria. Alla luce del ruolo patogenetico giocato dai mastociti sinoviali nel processo artrosico, i presenti risultati aprono interessanti prospettive nell'utilizzo di Glupamid® nell'artrosi del cane e del gatto.

Summary

Objective - To evaluate the *in vitro* effects of a new form of glucosamine (Glupamid®) on mast cells degranulation, in view of the newly recognized involvement of these cells in the pathophysiology of osteoarthritis.

Materials and methods - Rat basophilic leukemia cells of the secreting subline 2H3 (RBL-2H3) grown in stationary cultures were incubated with ³H-serotonin, sensitized with mouse anti-DNP (dinitrophenol) IgE, and challenged by dinitrophenylated human serum albumin, with or without Glupamid®. The effect of Glupamid® was expressed as the percent inhibition of serotonin release.

Results - Glupamid® significantly and dose-dependently decreased the release of serotonin from RBL-2H3 cells.

Discussion and conclusions - The ability of Glupamid® to reduce the serotonin release confirms that the compound acts by the so called ALIA mechanism, i.e. the down-modulation of mast cell hyper-degranulation. In view of the emerging role played by synovial mast cells in the pathogenesis of degenerative joint disease, the present results shed new lights on the potential use of Glupamid® in the management of canine and feline osteoarthritis.

INTRODUZIONE

Alla luce delle recenti acquisizioni sui meccanismi patogenetici dell'artrosi - che hanno evidenziato la coesistenza di processi degenerativi, infiammatori ed algici, nonché

complesse interrelazioni tra i vari tessuti articolari¹ - anche la terapia dell'artrosi ha subito una svolta radicale. Dall'approccio unicamente sintomatico (es. FANS, corticosteroidi), si è, infatti, passati all'adozione di piani di trattamento combinato, che prevedono l'associazione di molecole capaci di agire in modo sinergico sia sui sintomi che sulle cause della patologia². In particolare, nell'ambito dei cosiddetti approcci "di fondo" o "disease-modifying"³, vengono oggi inclusi nuovi composti dotati di potenzialità antinfiamma-

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 23/10/2007 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 29/11/2007".

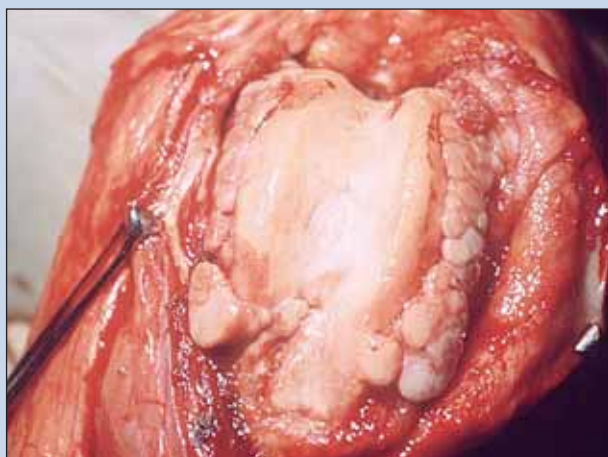


FOTO - Artrosi secondaria a rottura del legamento crociato anteriore. Evidenti le alterazioni artrosiche combinate, con condromalacia, formazioni osteocondrofitiche marginali e marcata infiammazione sinoviale (Foto: C.M. Mortellaro).

torie, antiossidanti, analgesiche^{4,5} e, in particolare, condroprotettive⁶, mirati al riequilibrio metabolico della cartilagine in degenerazione⁷.

La glucosamina è un aminozucchero il cui effetto condroprotettivo è stato recentemente confermato da studi compiuti in medicina umana^{8,9,10,11,12,13} e veterinaria^{14,15,16,17}. *In vitro*, è stato dimostrato che tale effetto si basa sulla capacità di riequilibrare il metabolismo cartilagineo, sia stimolando i processi riparativi¹⁸, sia inibendo quelli degradativi^{19,20}.

Recentemente, è stata sintetizzata e brevettata una nuova forma di glucosamina, denominata Glupamid® (N-palmitoil-D-glucosamina), originata dal legame amido dell'acido palmitico con la glucosamina. Chimicamente, appartiene alla famiglia delle amidi di acidi grassi (FAA, *Fatty Acid Amides*), di recente al centro della ricerca biochimica e farmacologica internazionale, in virtù delle importanti potenzialità applicative nel settore dell'infiammazione e del dolore^{21,22,23,24,25}. Le indagini condotte in merito alla via metabolica delle FAA ha chiarito che, una volta captate all'interno delle cellule, queste sostanze vengono idrolizzate dall'enzima FAAH (*Fatty Acid Amide Hydrolase*)^{26,27,28}, liberando i loro componenti primari. Nel caso del Glupamid®, la molecola viene idrolizzata in acido palmitico e glucosamina. Da un punto di vista strutturale, la N-palmitoil-D-glucosamina è un analogo del Palmidrol (N-palmitoil-etanolamina), capostipite delle aliamidi, sostanze note agire sulla degranulazione dei mastociti²⁹, attraverso un meccanismo endogeno denominato ALIA (*Autacoid Local Injury Antagonism*)³⁰, come confermato in animali da laboratorio³¹ e di interesse veterinario^{32,33,34,35}.

Negli ultimi anni, nuove evidenze sono andate confermando un importante coinvolgimento patogenetico del mastocita nell'artrosi^{36,37,38,39,40}. Cellula immunocompetente, costitutivamente presente nelle articolazioni del cane⁴¹ e del gatto⁴², il mastocita articolare si localizza prevalentemente nello strato subintimale della membrana sinoviale e nella capsula articolare, in stretta associazione con i vasi e le terminazioni nervose locali^{42,43}. Numerose ricerche hanno messo in evidenza il ruolo del mastocita come *primer* di

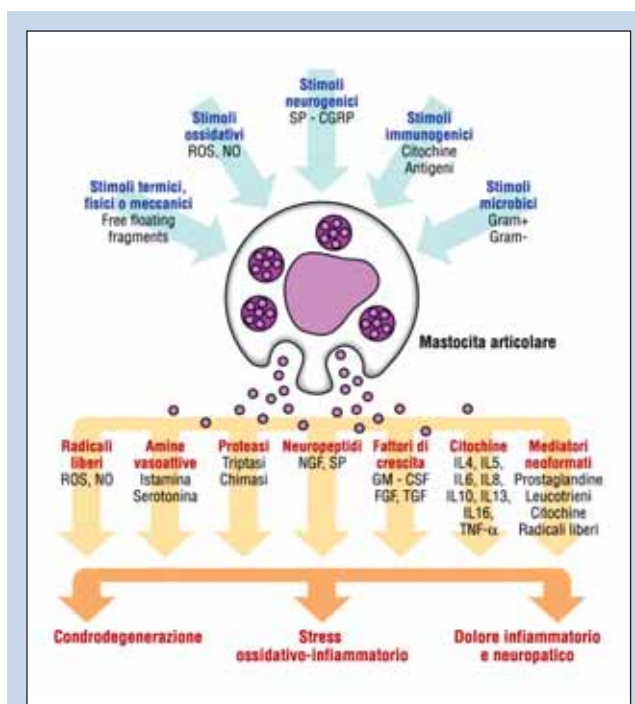


FIGURA 1 - Rappresentazione schematica del ruolo patogenetico del mastocita sinoviale nell'artrosi. In alto, sono riportati gli stimoli noti per attivare il mastocita sinoviale. Il conseguente processo di degranulazione provoca il rilascio di innumerevoli mediatori, che, per semplicità, sono riportati nell'immagine suddivisi per classe. Alcuni di questi mediatori (es. NO = monossido di azoto, triptasi) sono in grado di danneggiare direttamente la cartilagine, provocando fenomeni di condrodegenerazione; altri (es. NGF = Nerve Growth Factor, prostaglandine) sono noti sensibilizzare le fibre nervose nocicettive ed abbassarne la soglia dolorifica; altri ancora (es. istamina, ROS = Reactive Oxygen Species) sono implicati nella genesi dello stress ossidativo-infiammatorio.

malattie muscoloscheletriche^{44,45,46,47}. Nel corso del processo artrosico, è stato dimostrato che i mastociti sinoviali non solo aumentano di numero^{48,49}, ma vanno soggetti ad un'iperattivazione funzionale, direttamente correlata alla comparsa dei segni patognomici di artrosi (es. erosioni cartilaginee, stati flogistici e dolorosi)^{50,51,52,53} (Foto). Tale iperattivazione è la diretta conseguenza dell'eccesso di stimoli agonisti (es. citochine, neuropeptidi, frammenti osteocartilaginei, traumi, infezioni) che, convergendo sul mastocita sinoviale, ne stimolano l'incontrollato rilascio dei mediatori dotati di attività proteolitica, pro-infiammatoria, pro-ossidante ed algogena^{40,54} (Fig. 1).

Scopo del presente studio è stato quello di valutare la capacità di Glupamid® di influenzare la degranulazione di cellule mastocitarie in coltura.

MATERIALI E METODI

Coltura cellule RBL-2H3. Nel presente studio *in vitro* è stata utilizzata una linea cellulare di ratto, identificata con la sigla RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia cells*) e considerata omologa, per espressione recettoriale, contenuto granulare e funzionalità biochimica, ai mastociti^{29,55}. Le cellule RBL sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ in fiasche da coltura addizionate con MEM, contenente L-glutamina (2 mM), penicillina (100 unità/ml) e FCS (Siero Fetale Bovino) inattivato (20%). Successivamente, le cellule sono state prelevate e fatte crescere a pH

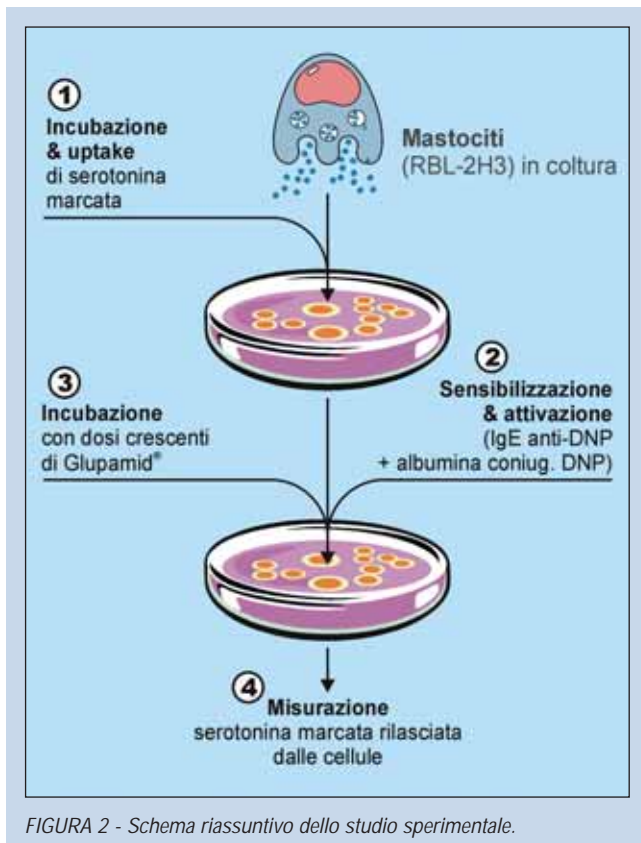


FIGURA 2 - Schema riassuntivo dello studio sperimentale.

7,2 in micropiastre rigide da 96 pozzetti di 6 mm di diametro e contenenti ciascuno 10^5 cellule in 100 μ l RPMI-1640, addizionato di gentamicina (50 μ g/ml) e FCS (Siero Fetale Bovino) inattivato (10%)²⁹.

Test del rilascio di serotonina. In fase di semina, le cellule RBL sono state incubate a 37°C per 18 ore con serotonina marcata (1 μ Ci/ml di [3 H]-serotonina). Al termine dell'incubazione, il supernatante è stato sostituito con 100 μ l di tampone Pipes (25 mM Pipes, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,4 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5,6 mM glucosio, pH 7,1), cui venivano aggiunte specifiche IgE monoclonali anti-albumina (IgE contro l'aptene dinitrofenolo, DNP, 0,3 μ g/ml), al fine di indurre la sensibilizzazione antigenica delle cellule. Un'ora dopo, tale supernatante veniva rimosso e sostituito con 100 μ l di una soluzione contenente albumina sierica umana coniugata con DNP (DNP-HSA, 0,1 μ g/ml), in concentrazione tale da indurre la degranolazione delle cellule RBL ed il conseguente rilascio di serotonina marcata nel supernatante. Contemporaneamente, i pozzetti delle piastre di coltura venivano incubati per 15 minuti con Glupamid® (0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M). Al termine del periodo di incubazione, dopo centrifugazione a 3000 rpm per 4 minuti, il supernatante veniva raccolto e letto in β -counter per 2 minuti al fine di misurare la quantità di serotonina marcata rilasciata nel mezzo di coltura (espressa in dpm). Parallelamente, il contenuto cellulare di ogni pozzetto veniva solubilizzato con 100 μ l di Triton X-100 (1%) in tampone fosfato (PBS) e sottoposto a lettura della radioattività (espressa in dpm), al fine di determinare la quantità di serotonina marcata presente nelle cellule. Tutti gli esperimenti venivano eseguiti in triplicato. Il disegno sperimentale dello studio è schematizzato in Figura 2. Il rilascio di serotonina marcata veniva misurato come il rap-

porto percentuale tra serotonina radioattiva presente nel supernatante e radioattività totale (serotonina marcata presente sia nel supernatante che nelle cellule), secondo la formula seguente:

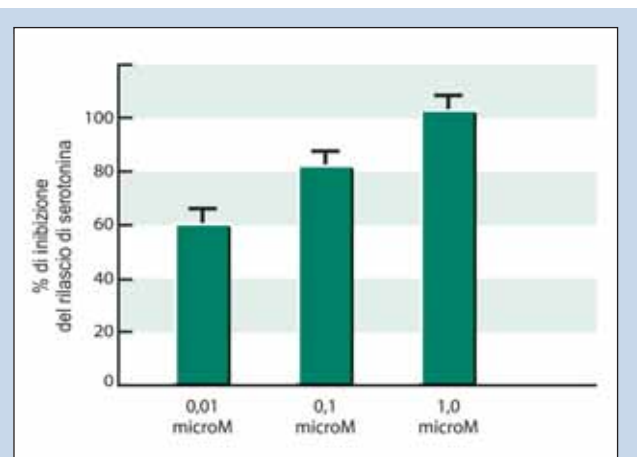
$$\text{rilascio di serotonina marcata} = \frac{[\text{dpm supernatante}]}{\text{dpm totali (supernatante + cellule)}} \times 100$$

L'effetto di Glupamid® veniva espresso come inibizione percentuale del rilascio di serotonina marcata, calcolata come differenza tra la media del controllo positivo (stimolo antigenico in assenza di Glupamid®) ed il dato osservato, rapportato alla differenza tra la media di rilascio nel gruppo di controllo positivo e negativo (assenza di stimolo antigenico).

Analisi statistica. Il confronto tra il rilascio di serotonina da parte delle cellule stimulate e trattate o meno con Glupamid® (0,01, 0,1 e 1 μ M) è stato effettuato utilizzando il test t di Student. Per la verifica dell'ipotesi di una relazione dose dipendente si è applicata l'analisi della regressione lineare semplice, utilizzando come variabile esplicativa il logaritmo della concentrazione molare di Glupamid®. Pertanto, Glupamid® 1 μ M aggiunto al controllo positivo ha valore 0, e gli altri due gruppi (Glupamid® 0,1 μ M e 0,01 μ M) hanno valore di concentrazione rispettivamente di -1 e -2. Le analisi sono state eseguite con il programma SAS. I risultati vengono considerati significativi per $p < 0,05$; altamente significativi per $p < 0,001$.

RISULTATI

Il trattamento con Glupamid® delle cellule RBL-2H3 attivate ha inibito il rilascio di serotonina. L'effetto è risultato altamente significativo ($p < 0,001$) per ciascuna delle tre dosi testate. Come evidenziato in Figura 3, la percentuale di inibizione cresce dal 61% per Glupamid® allo 0,01 μ M, all'83% per concentrazioni di Glupamid® pari allo 0,1 μ M, fino ad arrivare al 104% per 1 μ M Glupamid®. L'analisi

FIGURA 3 - Inibizione dose-dipendente del Glupamid® sul rilascio di serotonina. Il confronto tra il rilascio percentuale di serotonina da parte delle cellule stimulate e trattate con Glupamid® (0,01, 0,1 e 1 μ M), rispetto alle cellule stimulate e non trattate è stato effettuato utilizzando il test t di Student. L'effetto inibitorio del Glupamid® è risultato altamente significativo ($p < 0,001$) per ciascuna delle tre dosi testate.

della regressione è risultata altamente significativa ($p < 0,0001$) confermando che l'effetto del Glupamid® è dose-dipendente.

DISCUSSIONE

La linea cellulare utilizzata in questo studio (RBL-2H3) è un modello ormai classico di mastociti⁵⁵ e consente di lavorare in condizioni più standardizzate rispetto alle colture primarie, nonché di disporre di quantitativi cellulari elevati, necessari per condurre esperimenti ripetuti, come nel caso specifico.

I risultati del presente lavoro dimostrano, per la prima volta, che la nuova forma di glucosamina in studio, Glupamid®, è in grado di limitare (o down-regolare) il rilascio di mediatori da parte di cellule mastocitarie *in vitro*. In base a quanto osservato, Glupamid® agirebbe secondo il meccanismo ALIA (*Autacoid Local Injury Antagonism*)^{30,56}, cioè la down-modulazione del rilascio di mediatori mastocitari, mediante agonismo diretto o indiretto di specifici recettori di membrana, detti recettori periferici dei cannabinoidi^{29,57,58}. In virtù del loro meccanismo d'azione, le alihamidi vengono oggi definite sostanze ad attività cannabimimetica. Condividono, infatti, con il sistema endocannabinoide le principali caratteristiche funzionali: a) produzione "on demand" (su richiesta), in situazioni di danno/infiammazione^{59,60}; b) attivazione recettoriale^{29,61,62}; c) effetto inibitorio sul rilascio di mediatori implicati nella sensibilizzazione delle fibre nervose e nei processi infiammatori^{63,64}, al fine di prevenire e/o limitare l'eccessiva propagazione di flogosi e dolore^{65,66,67}. Numerosi sono gli studi sperimentali^{31,68,69,70,71,72} e i trial clinici veterinari^{32,73,74,75} che hanno dimostrato l'attività antinfiammatoria ed analgesica delle alihamidi.

La capacità del Glupamid® di down-regolare la degranulazione mastocitaria, dimostrata nel presente studio, assume particolare importanza in funzione del ruolo giocato dal mastocita sinoviale nella patogenesi del processo artrosico. Alcuni mediatori mastocitari (es. IL-1, TNF) sono in grado di compromettere le capacità biosintetiche dei condrociti^{76,77}, e ridurne le potenzialità riparative⁷⁸. Altri, come proteasi, citochine, radicali liberi ed amine vasoattive, possono avviare ed amplificare la degradazione della matrice cartilaginea^{79,80,81,82}. Altri ancora (es. radicali liberi, istamina e serotonina) sono oggi considerati diretti responsabili delle alterazioni microcircolatorie, biochimiche e cellulari che sottendono il cosiddetto "stress ossidativo-infiammatorio", tipico dell'articolazione artrosica¹. Infine, i mastociti sinoviali sono direttamente implicati nella genesi del dolore artrosico, sia di origine infiammatoria (dolore neurogenico o nocicettivo)⁸³, sia di tipo neuropatico, cioè legato ad un danno diretto dell'innervazione sensoriale e propriocettiva⁸⁴. Essi, infatti, degranulano in risposta a neuropeptidi, quali la sostanza P^{85,86}, liberando sostanze capaci di attivare ulteriormente le fibre nervose^{87,88,89}. In funzione di tale complesso ed importante coinvolgimento dei mastociti articolari nella genesi di infiammazione e dolore (Fig. 1), è lecito ipotizzare che Glupamid® rappresenti un intervento "a monte" della cascata flogistica ed algica, tipica dell'artrosi. In ciò si differenzia in modo sostanziale dal meccanismo d'azione dei FANS, che agiscono a valle della cascata di

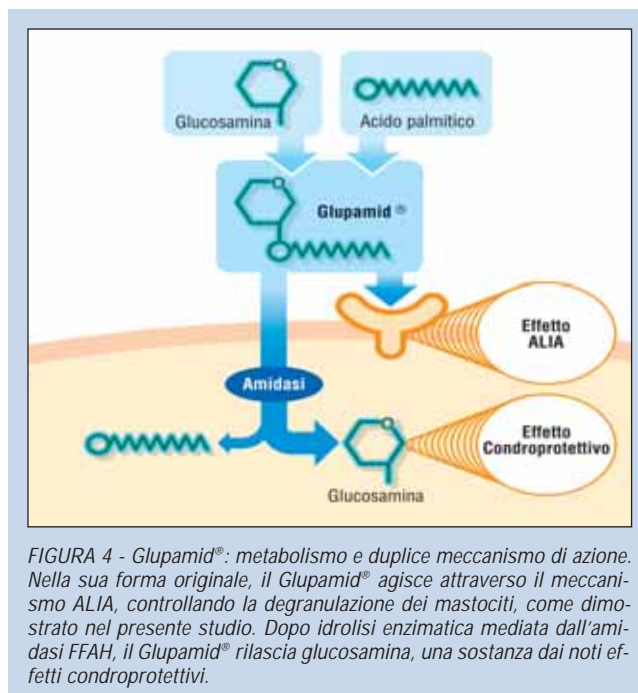


FIGURA 4 - Glupamid®: metabolismo e duplice meccanismo di azione. Nella sua forma originale, il Glupamid® agisce attraverso il meccanismo ALIA, controllando la degranulazione dei mastociti, come dimostrato nel presente studio. Dopo idrolisi enzimatica mediata dall'amidasi FAAH, il Glupamid® rilascia glucosamina, una sostanza dai noti effetti condroprotettivi.

reazioni alla base del processo infiammatorio, inibendo l'attività delle COX (ciclossigenasi)⁹⁰, con conseguenti e ben noti effetti collaterali, prevalentemente connessi alla natura della molecola ed alla durata del trattamento^{91,92,93}.

È, infine, importante sottolineare che il mediatore mastocitario valutato nel presente studio, la serotonina, sembra essere particolarmente implicato nella patogenesi dell'artrosi, in quanto in grado di (a) indurre le tipiche alterazioni endoteliali sottostanti alla flogosi⁹⁴, (b) attivare in maniera dose-dipendente enzimi specifici preposti alla sintesi di sostanze pro-infiammatorie (es. fosfolipasi A₂)⁹⁵, (c) stimolare il rilascio di mediatori ad attività flogistica ed algogena (es. PGE₂) da parte dei sinoviociti A⁹⁶, (d) attivare la collagenasi di tipo II⁹⁵, contribuendo in tal modo alla degradazione delle macromolecole della matrice cartilaginea. La serotonina, inoltre, sembra essere coinvolta nella genesi del dolore articolare, in quanto capace sia di attivare direttamente i nocicettori, sia di abbassarne la soglia di attivazione (sensibilizzazione)^{97,98}.

In conclusione, abbiamo dimostrato che la nuova forma di glucosamina oggetto di studio, Glupamid®, agisce attraverso il meccanismo ALIA, riducendo in maniera dose-dipendente il rilascio di serotonina da parte di linee cellulari mastocitarie attivate. A ciò va aggiunto che, *in vivo*, Glupamid® libera glucosamina in funzione dell'idrolisi mediata dall'enzima FAAH, come descritto nella sezione introduttiva e schematizzato in Figura 4. Sebbene siano necessari ulteriori studi e trial clinici controllati, è dunque ipotizzabile che, in virtù di questa duplice natura, Glupamid® possa configurarsi come promettente approccio "disease-modifying" nell'ambito del trattamento medico combinato per l'artrosi del cane e del gatto.

Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare il dottor Carlo Schievano per la preziosa collaborazione statistica.

Parole chiave

Artrosi, glucosamina, Glupamid®, aliamidi, mastociti.

Key words

Osteoarthritis, glucosamine, Glupamid®, aliamides, mast cells.

Bibliografia

- Miolo A, Mortellaro CM: Artrosi del cane e stress ossidativo-infiammatorio: dalla clinica al meccanismo. *Veterinaria* 17(1):17-33, 2003.
- Mortellaro CM, Miolo A: Approccio medico combinato all'artrosi del cane. *Veterinaria* 18(3): 9-19, 2004.
- Moskowitz RW, Hooper M: State-of-the-art disease-modifying osteoarthritis drugs. *Curr Rheumatol Rep* 7:15-21, 2005.
- Ferro E, Miolo A: Nuove prospettive nella prevenzione e nel trattamento dell'artrosi del cane in crescita: acido DL-alfa-lipoico. *Veterinaria* 16(1): 9-17, 2002.
- Miolo A: Quercetina e artrosi: razionale di utilizzo ed evidenze sperimentali. *Annali Pianta Officinali* 8: 34-45, 2004.
- Miolo A: Esiste un buon uso della condroprotezione nel trattamento dell'artrosi del cane? Un'indagine tra i medici veterinari italiani. 46mo Congresso nazionale multisala SCIVAC, Maggio 8-11, Milano, 2003, p 399.
- Verbruggen G: Chondroprotective drugs in degenerative joint diseases. *Rheumatology (Oxford)* 45(2): 129-138, 2006.
- Bruyere O, Pavelka K, Rovati LC, Gatterová J, et al.: Total joint replacement after glucosamine sulphate treatment in knee osteoarthritis: results of a mean 8-year observation of patients from two previous 3-year, randomised, placebo-controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* in press, 2007.
- Reginster JY, Bruyere O, Neuprez A: Current role of glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 46(5): 731-735, 2007.
- Herrero-Beaumont G, Ivorra JA, Del Carmen Trabado M, Blanco FJ, et al.: Glucosamine sulfate in the treatment of knee osteoarthritis symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled study using acetaminophen as a side comparator. *Arthritis Rheum* 56(2): 555-567, 2007.
- Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, et al.: Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Arch Intern Med* 163(13): 1514-1522, 2003.
- Reginster JY, Deroisy R, Rovati LC, Lee RL, et al.: Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet* 357(9252): 251-256, 2001.
- McAlindon T, Formica M, LaValley M, Lehmer M, et al.: Effectiveness of glucosamine for symptoms of knee osteoarthritis: results from an internet-based randomized double-blind controlled trial. *Am J Med* 117(9): 643-649, 2004.
- Beale BS: Use of nutraceuticals and chondroprotectants in osteoarthritic dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 34(1): 271-289, 2004.
- Neil KM, Caron JP, Orth MW: The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment and prevention of osteoarthritis in animals. *J Am Vet Med Assoc* 226(7): 1079-1088, 2005.
- McCarthy G, O'donovan J, Jones B, McAllister H, et al.: Randomised double-blind, positive-controlled trial to assess the efficacy of glucosamine/chondroitin sulfate for the treatment of dogs with osteoarthritis. *Vet J* 174(1): 54-61, 2007.
- Crovace A, Lacitignola L, Miolo A: Surgery plus chondroprotection for canine cranial cruciate ligament (CCL) rupture. A proton-NMR study. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19(4): 239-245, 2006.
- Dodge GR, Jimenez SA: Glucosamine sulfate modulates the levels of aggrecan and matrix metalloproteinase-3 synthesized by cultured human osteoarthritis articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11(6): 424-432, 2003.
- Schlueter AE, Orth MW: Further studies on the ability of glucosamine and chondroitin sulfate to regulate catabolic mediators in vitro. *Equine Vet J* 36(7): 634-636, 2004.
- Gouze JN, Gouze E, Popp MP, Bush ML, et al.: Exogenous glucosamine globally protects chondrocytes from the arthritogenic effects of IL-1beta. *Arthritis Res Ther* 8(6): R173, 2006.
- Lambert DM, Di Marzo V: The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 6(8): 757-773, 1999.
- De Petrocellis L, Melck D, Bisogno T, Di Marzo V: Endocannabinoids and fatty acid amides in cancer, inflammation and related disorders. *Chem Phys Lipids* 108(1-2): 191-209, 2000.
- Schmid HH, Berdyshev EV: Cannabinoid receptor-inactive N-acyl ethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3): 363-376, 2002.
- Walker JM, Krey JF, Chen JS, Vefring E, et al.: Targeted lipidomics: fatty acid amides and pain modulation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77(1-4): 35-45, 2005.
- Wise LE, Cannavacciuolo R, Cravatt BF, Marun BF, et al.: Evaluation of fatty acid amides in the carrageenan-induced paw edema model. *Neuropharmacology* in press, 2007.
- Cravatt BF, Lichtman AH: The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem Phys Lipids* 121(1-2): 135-148, 2002.
- Ueda N: Endocannabinoid hydrolases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 521-534, 2002.
- Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S: The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66(2-3): 201-210, 2002.
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, et al.: Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci* 92(8): 3376-3380, 1995.
- Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R: A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions* 39 Spec No: C145-7, 1993.
- Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, et al.: N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 300(3): 227-236, 1996.
- Scarpella F, Abramo F, Noli C: Clinical and histological evaluation of an analogue of palmitoylethanolamide, PLR 120 (comiconized Palmdrol INN) in cats with eosinophilic granuloma and eosinophilic plaque: a pilot study. *Vet Dermatol* 12(1): 29-39, 2001.
- Abramo F, Noli C, Giorgi M, et al.: Elastic fibres and mast cells in canine open skin wounds treated with an ALIamide-based gel: a morphometric study. *Vet Dermatol*, 16(5): 354, 2005.
- Abramo F, Salluzzi D, Leotta R, Noli C, et al.: Mast cell morphometry of cutaneous wounds treated with an autacoid gel: a placebo-controlled study. *Vet Dermatol* 15(Suppl.1): abs. FC-59, 2004.
- Miolo A, Re G, Barbero R, Giorgi M, et al.: Aliamides modulate skin mast cell degranulation in dogs and cats. *J Vet Pharmacol Ther* 29 (Suppl 1): 204-205, 2006.
- Mortellaro CM, Miolo A: Il mastocita nell'artrosi del cane. 48mo Congresso Nazionale Multisala SCIVAC, Rimini, 27-30 Maggio, 2004, pp 300-303.
- Pu J, Nishida K, Inoue H, Asahara H, et al.: Mast cell in osteoarthritic and rheumatoid arthritic synovial tissues of the human knee. *Acta Medica Okayama* 52(1): 35-39, 1998.
- Dean G, Hoyland JA, Denton J, Donn RP, et al.: Mast cells in the synovium and synovial fluid in osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 32(8): 671-675, 1993.
- Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, et al.: Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev* 217: 65-78, 2007.
- Nigrovic PA, Lee DM: Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 217: 19-37, 2007.
- Schumacher HR: Ultrastructure of the synovial membrane. *Ann Clin Lab Sci* 5(6): 489-498, 1975.
- Heppelmann B, Messlinger K, Neiss WF, Schmidt RF: Fine sensory innervation of the knee joint capsule by group III and group IV nerve fibers in cat. *J Comp Neurol* 351(3): 415-428, 1995.
- Hukkanen M, Gronblad M, Rees R, Kottinen YT, et al.: Regional distribution of mast cells and peptide containing nerves in normal and adjuvant arthritic rat synovium. *J Rheumatol* 18(2): 177-183, 1991.
- Freemont AJ, Jeziorska M, Hoyland JA, Rooney P, et al.: Mast cells in the pathogenesis of chronic back pain: a hypothesis. *J Pathol* 197(3): 281-285, 2002.
- Maruotti N, Crivellato E, Cantatore FP, Vacca A, et al.: Mast cells in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26(1): 1-4, 2007.
- Eklund KK: Mast cells in the pathogenesis of rheumatic diseases and as potential targets for anti-rheumatic therapy. *Immunol Rev* 217: 38-52, 2007.
- Marone G: Mast cells in rheumatic disorders. *Clin Exp Rheumatol* 16(3): 245-249, 1998.
- Buckley MG, Gallagher PJ, Walls AF: Mast cell subpopulations in the synovial tissue of patients with osteoarthritis: selective increase in numbers of tryptase-positive, chymase-negative mast cells. *J Pathol* 186(1): 67-74, 1998.
- Woolley DE, Tetlow LC: Mast cell activation and its relation to proinflammatory cytokine production in the rheumatoid lesion. *Arthritis Res* 2(1): 65-74, 2000.

50. Renoux M, Hilliquin P, Galoppin L, Florentin J, et al.: Cellular activation products in osteoarthritis synovial fluid. *Int J Clin Pharmacol Res* 15(4): 135-138, 1995.
51. Bridges AJ, Malone DG, Jicinsky J, Chen M, et al.: Human synovial mast cell involvement in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Relationship to disease type, clinical activity and antirheumatic therapy. *Arthritis Rheum* 34(9): 1116-1124, 1991.
52. Attur MG, Dave M, Akamatsu M, Katoh M, et al.: Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage* 10(1): 1-4, 2002.
53. Wasserman SI: The mast cell and synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 27(8): 841-844, 1984.
54. Renoux M, Hilliquin P, Galoppin L, Florentin J, Menkes CJ: Release of mast cell mediators and nitrites into knee joint fluid in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 4(3): 175-179, 1996.
55. Seldin DC, Adelman S, Austen KF, Stevens RL, et al.: Homology of the rat basophilic leukemia cell and the rat mucosal mast cell. *Proc Natl Acad Sci* 82(11): 3871-3875, 1985.
56. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal Toso R, Leon A: Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokin. *Trends Neurosci* 19(11): 514-520, 1996.
57. Samson MT, Small-Howard A, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, et al.: Differential roles of CB1 and CB2 cannabinoid receptors in mast cell. *J Immunol* 170(10): 4953-4962, 2003.
58. Stander S, Schmelz M, Metz D, Luger T, et al.: Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *J Dermatol Sci* 38(3): 177-188, 2005.
59. Darmani NA, Izzo AA, Degenhardt B, Valenti M, et al.: Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoylethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: review of the available pre-clinical data and first human studies. *Neuropharmacology* 48(8): 1154-1163, 2005.
60. Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, et al.: Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology* 52(2): 415-422, 2007.
61. Lo Verme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, et al.: The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci* 77(14): 1685-1698, 2005.
62. Mackie K, Stella N: Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 28(8,2): E298-E306, 2006.
63. Walker JM, Krey JF, Chu CJ, Huang SM: Endocannabinoids and related fatty acid derivatives in pain modulation. *Chem Phys Lipids* 121(1-2): 159-172, 2002.
64. Yoshihara S, Morimoto H, Ohori M, Yamada Y, et al.: Endogenous cannabinoid receptor agonists inhibit neurogenic inflammation in guinea pig airways. *Int Arch Allergy Immunol* 138(1): 80-87, 2005.
65. Lambert DM, Vandevoorde S, Jonsson KO, Fowler CJ: The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem* 9(6): 663-674, 2002.
66. Di Marzo V: Biochemistry and pharmacology of fatty acid amides – effects on inflammation, pain and pruritus and new perspectives in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 29(Suppl.1): 2-4, 2006.
67. Re G, Barbero R, Miolo A, Di Marzo V: Palmitoylethanolamide, endocannabinoids and related cannabimimetic compounds in protection against tissue inflammation and pain: potential use in companion animals. *Vet J* 173(1): 23-32, 2007.
68. De Filippis D, D'Amico A, Esposito G, Iuvone T: Il Palmidrol inibisce la formazione di granuloma nel ratto. 56mo Congresso Internazionale Multisala SCIVAC, Rimini, 1-3 giugno 2007, p 544.
69. Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, et al.: Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135(1): 181-187, 2002.
70. Lo Verme J, Russo R, La Rana G, Fu J, et al.: Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Pharmacol Exp Ther* 319(3): 1051-1061, 2006.
71. D'Amico A, De Filippis D, Iuvone T: Local administration of palmitoylethanolamide reduces chronic granuloma-associated angiogenesis in rat. 33rd National Congress of the Italian Society of Pharmacology (SIF), Cagliari, Italy, June 6-9, 2007.
72. Iuvone T, De Filippis D, D'Amico A, Petrosino S, et al.: Protective role of aliamides and endocannabinoid system during lambda-carrageenin-induced granuloma formation. 3rd International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Sorrento, May 9-12, 2007.
73. Mantis P, Lloyd DH, Pfeiffer D, Stevens K, et al.: Assessment of the effect of an aliamide-containing topical gel by evaluation of the reduction of wound volume measured by High Resolution Ultrasound Biomicroscopy. *Wounds* 19(5): 113-119, 2007.
74. Bonello D, Squarzone P: Effect of the combined use of a mucoadhesive gel containing the aliamide Adelmidrol with dental scaling: a controlled clinical study in dogs with gingivitis. 14th European Congress of Veterinary Dentistry, Ljubljana, September 22-25, 2005.
75. Marsella R, Joyce J, Nicklin C, Lopez J: Evaluation of the effects of Palmitoylethanolamide on clinical signs in house dust mite allergic high IgE Beagle dogs using a randomized, double blinded, placebo controlled design. *Vet Dermatol* 16(3): 202, 2005.
76. Fujita Y, Hara Y, Nezu Y, Yamaguchi S, et al.: Direct and indirect markers of cartilage metabolism in synovial fluid obtained from dogs with hip dysplasia and correlation with clinical and radiographic variables. *Am J Vet Res* 66(12): 2028-2033, 2005.
77. Venn G, Niefeld JJ, Duits AJ, Brennan FM, et al.: Elevated synovial fluid levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor associated with early experimental canine osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 36(6): 819-826, 1993.
78. Schalkwijk J, Joosten LA, Van den Berg WB, Van de Putte LB: Chondrocyte non responsiveness to insulin-like growth factor 1 in experimental arthritis. *Arthr Rheum* 32(7): 894-900, 1989.
79. Tetlow LC, Woolley DE: Histamine stimulates matrix metalloproteinase-3 and -13 production by human articular chondrocytes in vitro. *Ann Rheum Dis* 61(8): 737-740, 2002.
80. Fujita Y, Hara Y, Nezu Y, Schulz KS, et al.: Proinflammatory cytokine activities, matrix metalloproteinase-3 activity, and sulfated glycosaminoglycan content in synovial fluid of dogs with naturally acquired cranial cruciate ligament rupture. *Vet Surg* 35(4): 369-376, 2006.
81. Hay CW, Chu Q, Budsberg SC, Clayton MK, et al.: Synovial fluid interleukin 6, tumor necrosis factor, and nitric oxide values in dogs with osteoarthritis secondary to cranial cruciate ligament rupture. *Am J Vet Res* 58(9): 1027-1032, 1997.
82. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP: The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11(10): 747-755, 2003.
83. McDougall JJ: Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther* 8(6): 220-226, 2006.
84. Schaible HG, Schmelz M, Tegeder I: Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 58(2): 323-342, 2006.
85. Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Tornwall J, et al.: Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966: 384-399, 2002.
86. Kontinen YT, Tiainen VM, Gomez-Barrena E, Hukkanen M, et al.: Innervation of the joint and role of neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci* 1069: 149-154, 2006.
87. Richardson JD, Vasko MR: Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 302(3): 839-845, 2002.
88. Dray A: Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesthesiol* 75(2): 125-131, 1995.
89. Kidd BL, Photiou A, Inglis JJ: The role of inflammatory mediators on nociception and pain in arthritis. *Novartis Found Symp* 260: 122-133, 2004.
90. Green GA: Understanding NSAIDs: from aspirin to COX-2. *Clin Cornerstone* 3(5): 50-60, 2001.
91. Bjordal JM, Ljunggren AE, Klovning A, Slordal L: Non-steroidal anti-inflammatory drugs, including cyclo-oxygenase-2 inhibitors, in osteoarthritic knee pain: meta-analysis of randomised placebo controlled trials. *British Med J* 329(7478): 1317, 2004.
92. Bjordal JM, Ljunggren AE, Klovning A, Slordal L: NSAIDs, including coxibs, probably do more harm than good, and paracetamol is ineffective for hip OA. *Ann Rheum Dis* 64(4): 655-656, 2005.
93. Levesque LE, Brophy JM, Zhang B: Time variations in the risk of myocardial infarction among elderly users of COX-2 inhibitors. *Canadian Med Assoc J* 174(11): 1-11, 2006.
94. Wang Y, Mitchell J, Sharma M, Gabriel A, et al.: Leukotrienes mediate 5-hydroxytryptamine-induced plasma extravasation in the rat knee joint via CysLT-type receptors. *Inflamm Res* 53(2): 66-71, 2004.
95. Richard M, Vignon E, Peschard MJ, Broquet P, et al.: Serotonin-stimulated phospholipase A2 and collagenase activation in chondrocytes from human osteoarthritic articular cartilage. *FEBS Lett* 278(1): 38-40, 1991.
96. Seide MF, Ulrich-Merzenich G, Fiebich B, Candelario-Jalil E, et al.: Tropisetron inhibits serotonin-induced PGE2 release from macrophage-like synovial cells in serum-free tissue culture. *Scand J Rheumatol Suppl* 119: 33, 2004.
97. Wong HY: Neural mechanisms of joint pain. *Ann Acad Med Singapore* 22(4): 646-650, 1993.
98. Kopp S: The influence of neuropeptides, serotonin and interleukin-1beta on temporomandibular joint pain and inflammation. *J Oral Maxillofac Surg* 56(2): 189-191, 1998.