

Università della Calabria

Dottorato di Ricerca in

“Farmacologia e Biochimica della Morte Cellulare” - XIX ciclo

Settore scientifico disciplinare permanente

BIO/14 – Farmacologia

**Ruolo del sistema endocannabinoide nei meccanismi di
neuroprotezione da 17 β -estradiolo in un modello
sperimentale di ischemia cerebrale focale**

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta

Relatore

Chiar.mo Prof. Giacinto Bagetta

Candidata

Dott.ssa Cinzia Mazzei

Anno Accademico 2006-2007

SOMMARIO

ABSTRACT	5
CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	7
1.1 - Gli endocannabinoidi: cenni storici	7
1.1.1 - Biosintesi degli endocannabinoidi	9
1.1.2 - Metabolismo degli endocannabinoidi.....	14
1.1.3 - Localizzazione degli endocannabinoidi nel SNC.....	19
1.1.4 - Ruolo degli endocannabinoidi nell'eccitotossicità	21
1.1.5 Ruolo fisiopatologico degli endocannabinoidi	24
1.2 - Recettori per gli endocannabinoidi	33
1.2.1 - Struttura molecolare dei recettori per gli endocannabinoidi	34
1.2.2 - Distribuzione e proprietà dei recettori cannabinoidi.....	37
1.2.3 - Meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori cannabinoidi	39
1.3 - L'ischemia cerebrale: epidemiologia ed approcci farmacologici	44
1.3.1 - Meccanismi di danno neuronale da ischemia/riperfusione.....	46
1.3.2 - Modelli sperimentali di ischemia cerebrale	49
1.4 - Estrogeni e Neuroprotezione	51
1.4.1 - Sintesi dell'estradiolo	52
1.4.2 - Recettori Estrogenici	53
1.4.3 - Evidenze cliniche e sperimentali a supporto dell'attività neuroprotettiva estrogenica	55
1.4.4 - Meccanismi di neuro protezione del 17 β -Estradiolo	58
1.4.4.a - Effetti genomici.....	60
1.4.4.b - Effetti non genomici	65
1.5 - Scopo della tesi	72
CAPITOLO 2 - MATERIALI E METODI	74
2.1 - Animali e trattamenti farmacologici	74

2.2 - Ischemia cerebrale focale	75
2.3 - Neuropatologia e quantificazione del danno ischemico.....	77
2.4 - Analisi del sistema endocannabinoide.....	78
2.4.1 - Determinazione dei livelli endogeni dell'AEA	78
2.4.2 - Determinazione dell'attività della FAAH	80
2.4.3 - Determinazione dell'attività della NAPE-PLD.....	81
2.4.4 - Determinazione del legame ai recettori CB1 e TRPV1	83
2.5 - Analisi statistica.....	84
CAPITOLO 3 - RISULTATI.....	85
3.1 - Effetti del 17-βestradiolo sui livelli endogeni dell'AEA.....	85
3.2 - Effetti del 17β-estradiolo sull'attività della FAAH e della NAPE-PLD	88
3.3 - Effetti del 17-βestradiolo sull'espressione e sul contenuto del recettore CB1 e della FAAH.....	90
3.4 - Gli effetti neuroprotettivi del 17β-estradiolo sono ER mediati	91
CAPITOLO 4 - DISCUSSIONE	95
BIBLIOGRAFIA	103

ABSTRACT

In questo studio sono stati determinati i livelli endogeni dell'endocannabinoide finora meglio caratterizzato, anandamide (AEA) e l'attività degli enzimi responsabili, rispettivamente, della sua sintesi e degradazione, la NAPE-PLD e la FAAH, nella corteccia e nello striato di ratti sottoposti ad occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo) di 2 ore. È stato osservato che il contenuto di AEA nello striato di ratti sottoposti a MCAo, ma non nella corteccia, era significativamente incrementato (all'incirca di 3 volte rispetto ai ratti controllo, $P < 0.01$) e questo incremento era accompagnato parallelamente da un aumentata attività della NAPE-PLD (di circa 1.7 volte rispetto ai ratti controllo, $P < 0.01$) e da una ridotta attività (~ 0.6 volte; $P < 0.05$) ed espressione della FAAH (~0.7 volte; $P < 0.05$). Questi effetti indotti dalla MCAo venivano ulteriormente potenziati da un ora di ri-perfusione, mentre il legame dell'AEA al recettore cannabinoide CB1 e al recettore vanilloide TRPV1 non erano influenzati in maniera significativa dall'insulto ischemico. Inoltre, il trattamento con l'antagonista del recettore CB1, SR141716, e non quello con l'agonista R-(+)-WIN55,212-2, ha dimostrato di ridurre significativamente (33%; $P < 0.05$) il volume cerebrale d'infarto dopo 22 ore di ri-perfusione; mentre la somministrazione di una dose neuroprotettiva di 17β -estradiolo (0.20 mg/kg, i.p.), che era in grado di ridurre il volume d'infarto del 43%, si dimostrava capace anche di ridurre l'effetto dell'ischemia cerebrale sul sistema endocannabinoide in maniera recettore estrogenico dipendente. In conclusione, abbiamo dimostrato che il sistema endocannabinoide è implicato nella fisiopatologia del danno cerebrale tMCAo-

indotto e che la modulazione farmacologica di questo sistema endogeno da parte dell'estradiolo conferisce neuroprotezione.

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 - Gli endocannabinoidi: cenni storici

Huang Ti, un imperatore cinese, intorno al 2600 AC probabilmente non sospettava che le preparazioni della *Cannabis sativa*, che egli consigliava per il trattamento di crampi, malaria e dolori reumatici possedevano nel nostro corpo delle molecole endogene analoghe in grado di esercitare, potenzialmente, gli stessi effetti benefici. Infatti, solo 4500 anni dopo nel 1964, fu identificato il principale componente psicoattivo della *Cannabis sativa* e dei suoi derivati, il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC) (Gaoni & Mechoulam, 1964). Lo stadio successivo fu la scoperta che il Δ^9 -THC agisce legandosi a specifiche proteine della membrana plasmatica, chiamate “recettori cannabinoidi”. Nonostante sia stata suggerita l’esistenza di diversi recettori per il Δ^9 -THC e per i suoi analoghi sintetici, finora sono stati clonati solo due recettori per i cannabinoidi: il recettore CB1, che è il più abbondante recettore accoppiato a G proteine nel sistema nervoso centrale (SNC), e il recettore CB2 espresso prevalentemente in molte cellule del sistema immunitario e nei tessuti periferici (Pertwee, R.G. 2005; Klein, T.W. 2005). Mentre i recettori CB1, tra le altre funzioni, sono associati all’inibizione del rilascio di neurotrasmettitori; i recettori CB2 sembrano partecipare, invece, alla modulazione del rilascio e dell’attività delle citochine. È ormai riconosciuto, infatti, che oltre ai recettori CB1 aventi anche importanti funzioni a livello periferico, in alcune regioni cerebrali sono presenti in misura minore anche i recettori CB2 (Pertwee, R.G. 2005; Klein, T.W. 2005; Van

Sinckle M.D et al., 2005). La scoperta di recettori per i cannabinoidi ha suggerito l'esistenza di ligandi endogeni in grado di attivarli chiamati **endocannabinoidi**, tra cui quelli maggiormente studiati sono l'**Anandamide** (N-arachidonoiletanolamina; AEA) (*Devane et al., 1992*) e il **2-Arachidonoilglicerolo** (2-AG) (*Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995*) (*Figura 1*). Questi, così come gli altri endocannabinoidi proposti, derivano dal metabolismo non ossidativo dell'acido arachidonico, un acido grasso essenziale ω 6-polinsaturo.

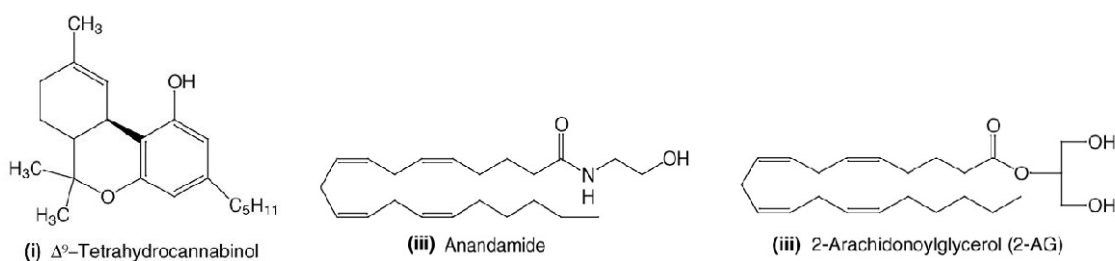


Figura 1. Struttura chimica del Δ⁹-THC (i), dell'AEA (ii), e del (iii) 2-AG.

Gli endocannabinoidi, similamente al Δ⁹-THC e agli agonisti sintetici del recettore cannabinoide, attivano diverse vie intracellulari in seguito alla stimolazione dei recettori CB1 e CB2 e delle proteine G a loro associate. È ormai noto che l'AEA e il 2-AG, essendo composti lipidici derivanti da fosfolipidi di membrana, non sono immagazzinati in vescicole secretorie ma vengono sintetizzati *ex novo* nel loro sito d'azione in seguito all'aumento della concentrazione intracellulare di calcio ed agiscono su richiesta, in maniera rapida e transitoria, prima di essere idrolizzati e inattivati. La sintesi degli endocannabinoidi in risposta a una diretta depolarizzazione della membrana è strettamente dipendente dall'aumento del calcio intracellulare, sebbene l'attivazione dei recettori metabotropici per il glutammato del gruppo 1 e di

altri recettori a G proteine legati alla fosfolipasi C siano in grado di stimolare, anche, la produzione di tali molecole (*Maejma T. et al., 2001*). Infatti, sia la formazione dei due distinti precursori biosintetici del AEA e del 2-AG che la loro conversione nei rispettivi endocannabinoidi sono catalizzate da enzimi calcio-dipendenti (*Di Marzo et al., 2004*); ciò comporta che l'intera cascata di reazioni che porta alla formazione degli endocannabinoidi avviene su richiesta e i livelli degli endocannabinoidi dipendono essenzialmente dalla disponibilità di acido arachidonico in posizione sn-1 e sn-2 dei fosfogliceridi precursori dell'AEA e del 2-AG, rispettivamente. Diversamente dai classici neurotrasmettitori, immediatamente dopo la loro sintesi gli endocannabinoidi sono rilasciati dal neurone postsinaptico nello spazio extracellulare, attraverso un meccanismo non ancora conosciuto, e qui si legano con diversa selettività ai loro recettori presinaptici. Una volta esplicata la loro azione essi sono rapidamente rimossi dallo spazio extracellulare tramite un rapido e selettivo meccanismo di up-take cellulare seguito dall'idrolisi intracellulare (*Di Marzo et al., 2004*). I recettori per i cannabinoidi, gli endocannabinoidi e le proteine che catalizzano la loro sintesi e inattivazione costituiscono nel loro insieme il cosiddetto **Sistema Endocannabinoide (SE)**.

1.1.1 - Biosintesi degli endocannabinoidi

Se molecole endogene svolgono un ruolo come mediatori di risposte fisiologiche e patologiche, devono necessariamente esistere nelle cellule vie biosintetiche regolabili, cioè meccanismi molecolari in grado di sintetizzare tali sostanze al momento e nel luogo opportuno. Inoltre, il segnale chimico portato da tali molecole

deve poter essere terminato, qualora la sua funzione biologica si esaurisca, attraverso vie cataboliche anch'esse regolabili. Il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella modulazione di funzioni fisiologiche, sia a livello del sistema nervoso che in tessuti periferici, è oggi confermato dalla scoperta di specifici meccanismi biosintetici e degradativi (*Di Marzo & Bisogno, 1998*). Diversamente dai classici neurotrasmettitori e neuropeptidi, l'anandamide e il 2-AG non sono depositati in vescicole intracellulari ma sono prodotti e rilasciati su richiesta dalla scissione, recettore indotta, di precursori fosfolipidici. Il precursore dell'anandamide è un N-Arachidonoilfosfatidiletanolamina (N_arPE) che si ritiene possa originarsi dal trasferimento dell'acido arachidonico dalla posizione sn-1 della fosfatidilcolina alla fosfatidiletanolamina catalizzato dall'enzima N-aciltransferasi (NAT). In colture di neuroni corticali di ratto, l'attività della NAT sembra essere regolata da due secondi messaggeri: il calcio e l'AMP ciclico. Il calcio è necessario per l'attivazione della NAT, che è inattiva in sua assenza, mentre l'cAMP agisce, attraverso la fosforilazione protein kinasi A dipendente, aumentando l'attività dell'enzima (*Cadas et al., 1996*).

L'N-arachidonoilfosfatidiletanolamina, formata per azione della NAT, è poi scissa da una fosfolipasi D specifica per le N_arPE (NAPE PLD), che è stata di recente parzialmente purificata e caratterizzata (*Hansen et al., 1999, Ueda et al., 2001*), in AEA e acido fosfatidico (*Figura 2*). Sia la fosfolipasi D che l'N-aciltransferasi sono enzimi Ca^{2+} dipendenti, ciò spiega perché la sintesi dell'anandamide sia stimolata da ionofori al Ca^{2+} e dalla depolarizzazione delle membrane neuronali. Un ciclo simile può essere utilizzato anche per la sintesi di altre NAE_s cannabimimetiche a partire dai

loro precursori fosfolipidici che sono costituenti ubiquitari nelle cellule, nei tessuti animali e umani e nei fluidi corporei (Schimid, 2000). Un'illustrazione del rilascio di anandamide, recettore dipendente, dai fosfolipidi di membrana è stata fornita da alcuni studi di microdialisi (Giuffrida et al., 1999; Beltramo et al., 2000) i quali suggeriscono che l'AEA può essere rilasciata nello striato del cervello di ratto sotto l'attivazione dei recettori dopaminergici D₂ e che tale rilascio può essere coinvolto nel controbilanciare gli effetti stimolatori della dopamina sull'attività motoria.

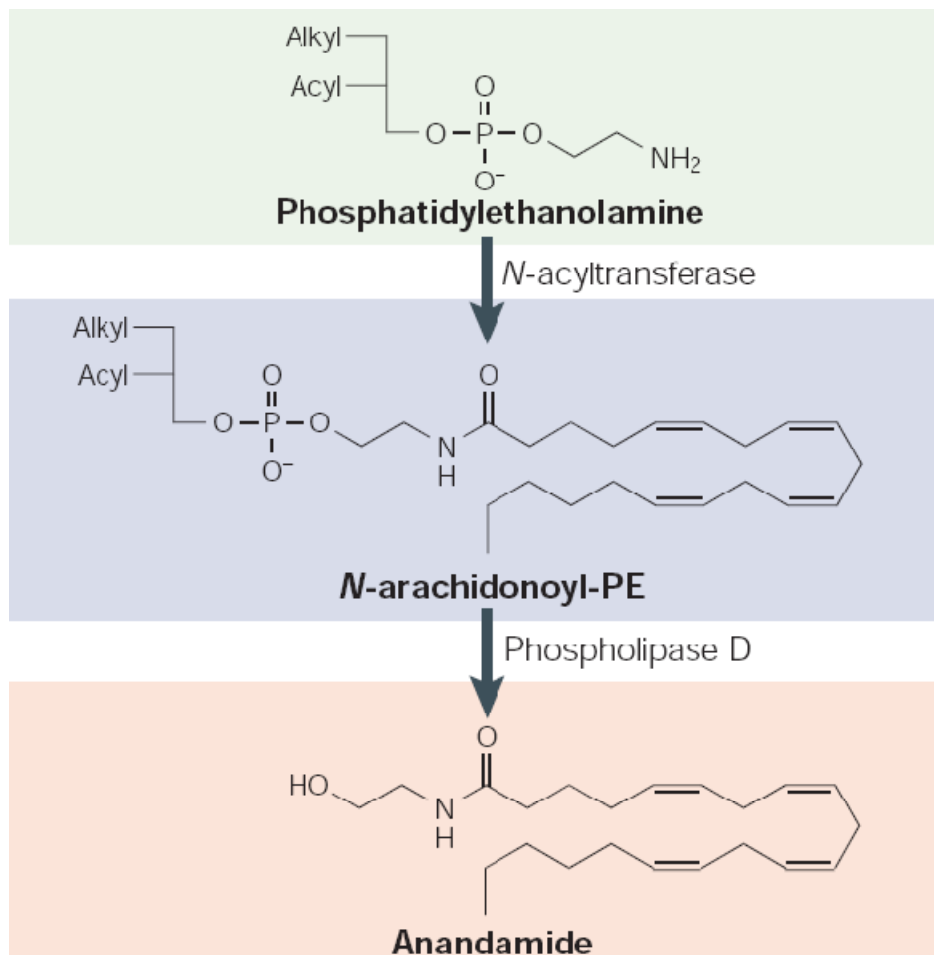


Figura 2. Via biosintetica dell'anandamide. L'aumento della concentrazione intracellulare del calcio, indotta dall'attività neuronale, stimola l'attività della N-aciltransferasi che catalizza il trasferimento dell'acido arachidonico dalla posizione sn-1 del fosfolipide donatore alla fosfatidiletanolamina generando così il precursore dell'anandamide: N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (NArPE). La fosfolipasi D, poi, scinde il fosfodiesterato legato alla NArPE rilasciando l'anandamide.

Una sintesi alternativa dell'AEA può avvenire anche attraverso la diretta condensazione enzimatica tra l'acido arachidonico libero e l'etanolamina. Questa via è catalizzata da un'anandamide sintasi che è più attiva a un pH alcalino di circa 8.5-10 ed è indipendente sia dall'ATP che dal coenzima A. L'anandamide sintasi richiede, però, concentrazioni micromolari di acido arachidonico e concentrazioni millimolari di etanolamina che sono molto superiori alle normali concentrazioni di tali composti all'interno della cellula (*Kruszka & Gross, 1994; Devane & Axelrod, 1994*). Inoltre, un'AEA sintasi parzialmente purificata dal cervello di maiale (*Ueda et al., 1995*) ha dimostrato di avere la stessa dipendenza dal pH e dalla temperatura e lo stesso profilo di inibizione dell'amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH), l'enzima che catalizza l'idrolisi dell'AEA. Pertanto, si è ipotizzato che l'AEA sintasi sia un'amide idrolasi che, in condizioni non fisiologiche, funziona al contrario (FAAH REVERSE). In accordo con questa ipotesi si è osservato che una FAAH clonata, espressa in cellule COS-7, era capace di sintetizzare l'anandamide se incubata con alte concentrazioni di etanolamina (*Kurahashi et al., 1997*). Solo un'altra AEA sintasi è stata trovata nell'utero di topo (*Paria et al., 1996*) e ha dimostrato di avere molte caratteristiche analoghe alla FAAH dello stesso tessuto; eccezionalmente le attività dell'AEA sintasi e dell'idrolasi nell'utero sono regolate entrambe da ormoni sessuali all'interno della stessa via (*Maccarrone et al., 2000*). Sia che rappresenti un enzima differente o una FAAH inversa, l'attività della sintasi può certamente contribuire al mantenimento dell'equilibrio dei livelli dell'anandamide, almeno in specifici compartimenti cellulari dove l'acido arachidonico e l'etanolamina raggiungono concentrazioni elevate.

Il 2-AG, così come altri monoacilgliceroli, è un intermedio lipidico comune a diverse vie metaboliche; ciò spiega perché, a differenza dell'anandamide, i cui livelli basali sono bassi a causa della scarsa quantità dei precursori sn-1-arachidonoil fosfogliceridi presenti, i livelli del 2-AG in cellule e tessuti non stimolati sono, generalmente, due ordini di grandezza maggiori rispetto a quelli dell'anandamide e sono sufficienti ad attivare entrambi i recettori per i cannabinoidi (*Sugiura et al., 1995; Stella et al., 1997*). È però evidente che, pur essendo un importante precursore e prodotto di degradazione di fosfo-, di- e tri-gliceridi, solo una minima quantità del 2-AG ritrovato nelle cellule e nei tessuti è in grado di diffondere attraverso le membrane e di uscire dalla cellula per attivare i recettori CB1 e CB2. Quindi, delle diverse vie biosintetiche finora conosciute per la formazione del 2-AG, le vie che portano alla sintesi dell'endocannabinoide dovrebbero essere Ca^{2+} dipendenti dal momento che la formazione *de novo* del 2-AG, come dell'AEA, viene indotta nei neuroni dalla depolarizzazione della membrana (*Bisogno et al., 1997b; Stella et al., 1997*). Il più probabile ciclo di biosintesi del 2-AG coinvolge la stessa cascata enzimatica responsabile della generazione dei secondi messaggeri: 1,2-diacilglicerolo e inositolo trisfosfato (*Figura 3*). Infatti la fosfolipasi C, agendo sul fosfatidilinositolobisfosfato, produce diacilglicerolo (DAG) che è poi convertito in 2-AG dall'attività di una sn-1-DAG lipasi (*Stella et al., 1997*). Una via alternativa per la sintesi del 2-AG prevede la produzione, mediata dalla fosfolipasi A1 (PLA1), del 2-Arachidonoillisofosfolipide che potrebbe essere poi idrolizzato a 2-AG dall'attività di una lisofosfolipasi C (liso-PLC). Indipendentemente dalla via sintetica utilizzata, la produzione neuronale del 2-AG può essere indotta, in risposta ad un aumento del calcio intracellulare,

ugualmente dall'attività neuronale o dall'occupazione di recettori di membrana. Infatti, in fettine ipocampali di ratto, la stimolazione delle collaterali di Schaffer, che sono tratti di fibre eccitatorie che utilizzano il glutammato come neurotrasmettitore, produce un incremento significativo, calcio-dipendente, dei livelli del 2-AG nel tessuto (Stella *et al.*, 1997).

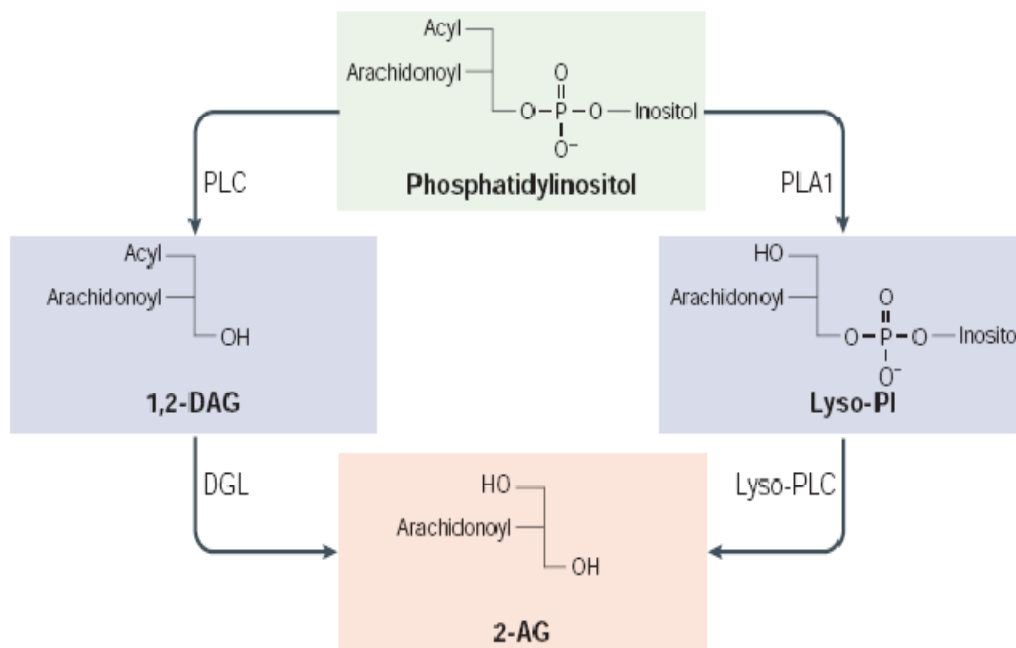


Figura 3. Principale via biosintetica del 2-Arachidonilglicerolo (2-AG). La fosfolipasi C, agendo sul fosfatidilinositolobisfosfato, produce diacilglicerolo (DAG) che è poi convertito in 2-AG dall'attività di una sn-1-DAG lipasi.

1.1.2 - Metabolismo degli endocannabinoidi

L'attività biologica dell'anandamide e del 2-AG è terminata attraverso un processo a due stadi che prevede: la rimozione degli endocannabinoidi dallo spazio extra-

cellulare, mediata da un trasportatore ad alta affinità, seguita dalla degradazione intracellulare da parte di un'amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH) (Figura 4).

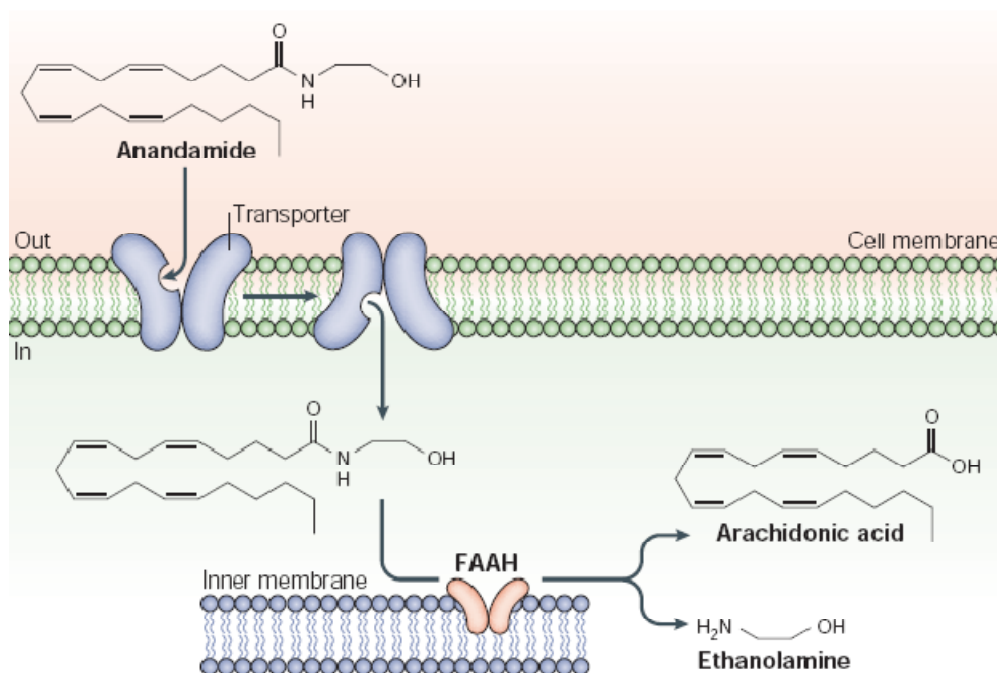


Figura 4. Meccanismi di inattivazione degli endocannabinoidi. Anandamide e 2-AG sono internalizzati dai neuroni tramite un meccanismo di trasporto ad alta affinità, chiamato "trasportatore degli endocannabinoidi". Una volta all'interno delle cellule, essi vengono idrolizzati da due distinte idrolasi a serina: l'AEA dalla amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH) e il 2-AG da una monoacilglicerolo lipasi (MAGL).

Sono state caratterizzate diverse proprietà di un trasportatore di membrana selettivo per l'AEA (AMT), sebbene la sua struttura molecolare sia ancora ignota. E' stato dimostrato in molte cellule neuronali e non-neuronali che l'AMT trasporta l'anandamide attraverso la membrana mediante un processo saturabile che ha le caratteristiche di una diffusione facilitata: tale processo è bidirezionale ed indipendente sia dall'energia che dal Na⁺, diversamente dal trasporto di amine e di aminoacidi (Jarrahian et al., 2000). Dal momento che tale proteina trasporta gli

endocannabinoidi secondo il loro gradiente di concentrazione attraverso la membrana, è stato suggerito che l'AMT: 1) Sia in grado di facilitare il rilascio dell'AEA dai neuroni immediatamente dopo la sua sintesi, lavorando nella direzione opposta dell'up-take cellulare (*Hillard et al., 1997*); e 2) necessita il successivo metabolismo intracellulare per consentire la rimozione dell'AEA dallo spazio extracellulare. Di recente è stato dimostrato, inoltre, che l'AMT è funzionalmente accoppiato al recettore CB1 attraverso il nitrossido (NO): l'attivazione dei recettori CB1 da parte dell'anandamide determina, infatti, il rilascio di NO che a sua volta attiva l'AMT, probabilmente mediante la nitrosilazione di un residuo di cisteina nel sito di legame, stimolando così la rimozione dell'AEA dallo spazio extracellulare (*Maccarrone et al., 2000*). Questo loop regolatorio rappresenta una specie di "timer" mediante il quale l'attivazione dei recettori CB1, da parte dell'AEA, induce la terminazione dell'attività dell'anandamide sul recettore stesso: quindi, l'AEA esercita un controllo a feedback negativo sull'attività dell'enzima. Attualmente non è ben chiaro se il 2-AG sia trasportato all'interno delle cellule dall'AMT o da trasportatori diversi. Uno studio condotto nelle cellule di glioma del ratto (*Piomelli et al., 1999*) ha dimostrato che il NO stimola l'uptake di anandamide e di 2-AG allo stesso modo e che l'inibitore sperimentale dell'AMT, AM404, è in grado di bloccare il riassorbimento di entrambi gli endocannabinoidi con la stessa potenza. Ciò suggerisce che può non esistere un trasportatore di membrana specifico per il 2-AG o, se esiste, è molto simile all'AMT sebbene abbia un'efficacia per il 2-AG minore che per l'anandamide (*Bisogno et al., 2001*). L'AMT è stato rilevato in diversi tipi cellulari derivanti dal cervello e dal sistema immunitario (*Hillard & Jarrahian,*

2000); in particolare, è stato caratterizzato in molte cellule umane come i neuroblastomi e i linfomi, le piastrine, le cellule endoteliali, i mastociti e i linfociti periferici (*Maccarrone et al., 1998,2000*). Una caratteristica dell'AMT molto importante, che merita ulteriori ricerche, è la sua capacità di lavorare all'inverso per espellere l'anandamide dalla cellula (*Hillard & Jarrahan, 2000*). Diviene, infatti, sempre più evidente che l'AEA è in grado di agire all'indietro, mediante un meccanismo a feedback negativo, e che l'AMT può giocare un ruolo importante nella regolazione di questo segnale retrogrado.

Una volta captati dalle cellule sia l'AEA che il 2-AG fungono da substrati per l'Amide Idrolasi degli acidi grassi (FAAH), che è l'enzima che scinde il legame dell'amide e dell'estere rilasciando, rispettivamente, acido arachidonico ed etanolamina o glicerolo (*Figura 4*). FAAH è un enzima di membrana, con un pH ottimale intorno a 9, che si trova principalmente nelle frazioni microsomiali e mitocondriali delle cellule. Tale enzima mostra, inoltre, un'attività esterasica per i monoacilgliceroli (*Di Marzo et al., 1998*) e i metilesteri degli acidi grassi (*Kurahashi et al., 1997; Patricelli & Cravatt, 1999*); infatti, il 2-AG è idrolizzato da FAAH ad una velocità molto maggiore rispetto all'anandamide. È stato proposto che l'amide idrolasi controlli l'uptake cellulare dell'anandamide mediante la generazione o il mantenimento di un gradiente di concentrazione interno, che guida la diffusione facilitata dell'AEA mediata dall'AMT (*Deutsch et al., 2001*).

Sebbene FAAH non sia l'unico fattore che controlla il trasporto dell'AEA, il suo ruolo centrale nella degradazione dell'anandamide può spiegare perché è l'attività di FAAH, ma non quella di AMT (*Maccarrone, 2001*), ad essere modulata sotto

particolari condizioni fisiopatologiche. Le caratteristiche cinetiche e strutturali dell'enzima sono state ampiamente studiate e analizzate e, da queste, risulta che il cDNA di FAAH contiene una sequenza consenso per le amidasi altamente conservata (*Cravatt et al., 1996*). Le sequenze aminoacidiche dell'enzima umano, di ratto, di topo e di maiale mostrano, infatti, più del 73% di identità e il 90% di omologia nella sequenza "consenso". Sebbene gli mRNA di FAAH differiscano tra le varie specie, le proteine codificate sono costituite tutte da 579 aminoacidi (*Ueda et al., 2001*). Sono stati identificati in FAAH tre domini fondamentali: un dominio transmembrana, all'estremità N-terminale (*Cravatt et al., 1996*), che non influenza l'attività dell'enzima ma dirige l'oligomerizzazione proteica (*Patricelli et al., 1998*); un dominio ricco in serina e glicina, che contiene la sequenza consenso dell'amidasi (*Kobayashi et al., 1998*); e un dominio ricco in prolina, che è omologo alla classe II del dominio di legame SH3 (*Arreaza & Deutsch, 1999*). Studi di mutagenesi sito specifica, hanno dimostrato che il residuo di serina in posizione 241 è il principale nucleofilo responsabile dell'attività catalitica dell'enzima (*Patricelli et al., 1999*) e che altri due residui aminoacidici della sequenza consenso, Ser217 e Cys249, partecipano all'attività enzimatica. FAAH è stato trovato e caratterizzato nelle stesse cellule umane che producono l'AMT ovvero nelle cellule di neuroblastomi e linfomi, nelle piastrine, nelle cellule endoteliali, nei mastociti e nei linfociti periferici (*Maccarrone et al., 1998,2001*). Comunque, in assenza della FAAH gli endocannabinoidi possono subire altre reazioni metaboliche. Per esempio: 1) L'anandamide e il 2-AG possono essere ossidati dalla Ciclossigenasi-2 (COX-2) e

successivamente essere metabolizzati ad etanolamidi delle prostaglandine o ad esteri del glicerolo che sono composti inattivi sui recettori cannabinoidi;

2) Un'altra possibile via per la degradazione dell'anandamide coinvolge gli enzimi responsabili della cascata dell'acido arachidonico: per azione della lipossigenasi, infatti, si formano le idroperossianandamidi che sono in grado di inibire l'attività della FAAH, con una costante apparente dell'ordine del millimolare (*Maccarrone et al., 1998*); queste idroperossianandamidi sono considerate, attualmente, i più potenti inibitori naturali dell'enzima finora scoperti e, potendo essere generate in vivo, esse giocano sicuramente un ruolo fondamentale nel controllo della degradazione dell'anandamide, al contrario dei prodotti dell'AEA generati dalla 2-Ciclossigenasi, i quali non sembrano influenzare, invece, l'attività della FAAH (*Maccarrone et al., 2000*);

3) Il 2-AG, inoltre, può essere idrolizzato, ugualmente, sia da FAAH che da monoacilglicerolo lipasi indipendenti (MAG) in acido arachidonico e glicerolo oppure può essere anche direttamente esterificato in fosfolipidi di membrana o in di- e tri-acilgliceroli neutri (*Di Marzo et al., 1999, 2001, Goparaju et al., 1999*).

1.1.3 - Localizzazione degli endocannabinoidi nel SNC

La prima sostanza endogena, isolata da estratti cerebrali di maiale, in grado di mimare molti effetti psicoattivi del Δ^9 -tetraidrocannabinolo fu l'Anandamide. L'AEA, diversamente da altre etanolamidi degli acidi grassi, è stata isolata e quantificata mediante cromatografia liquida e spettrometria di massa in vari tessuti umani, post-mortem, e di ratto, e ha dimostrato di essere largamente distribuita sia nel

cervello che in tessuti periferici (*Felder et al., 1993, 1996*). All'interno del cervello, i più alti livelli dell'endocannabinoide sono stati trovati nelle aree in cui c'è un'alta densità di recettori per i cannabinoidi, quali l'ippocampo, lo striato, il cervelletto e la corteccia. I livelli di AEA misurati nel cervello sono equivalenti a quelli di altri neurotrasmettitori come la serotonina e la dopamina, ma almeno 10 volte inferiori a quelli riscontrati per il GABA e per il glutammato. Quantità considerevoli di anandamide sono state ritrovate anche nella milza umana e di ratto dove sono espressi alti livelli di recettori CB2, suggerendo così che l'AEA si comporta da agonista per entrambi i sottotipi recettoriali dei cannabinoidi, CB1 e CB2. Piccole quantità di anandamide sono state trovate anche nel cuore umano e nel talamo, così come nella pelle del ratto; mentre solo tracce dell'endocannabinoide sono state rilevate nel siero, nel plasma e nel liquido cerebrospinale umano.

Dopo alcuni anni dall'identificazione dell'AEA è stato identificato un secondo messaggero derivante dai fosfolipidi di membrana che ha dimostrato di possedere le proprietà di un agonista cannabinoide: il 2-Arachidonoilglicerolo (*Stella et al., 1997*). Sebbene il 2-AG sia stato inizialmente isolato solo da tessuti periferici (*Mechoulam et al., 1995*), di recente è stato confermato, mediante l'uso della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), che il 2-AG è una delle più abbondanti specie molecolari di monoacilgliceroli presenti nel cervello (*Stella et al., 1997; Kondo et al., 1998*). Considerevoli quantità del 2-AG sono state trovate nel fegato, nella milza e nei reni anche se i livelli di endocannabinoide sono significativamente più bassi di quelli misurati nel cervello (*Kondo et al., 1998*). Infatti i livelli di 2-AG trovati nel cervello sono 170 volte superiori a quelli dell'AEA (*Stella et al., 1997*).

1.1.4 - Ruolo degli endocannabinoidi nell'eccitotossicità

Nei processi eccitotossici, la morte cellulare è indotta dall'eccessiva stimolazione dei recettori per gli aminoacidi eccitatori causata dalle elevate concentrazioni di glutammato nello spazio extracellulare. L'eccitotossicità può essere, infatti, provocata da diversi stimoli quali, la deplezione di ATP che si verifica dopo un infarto, oppure da un danno meccanico diretto, o ancora da un'ischemia associata ad edema, conseguente ad un trauma cerebrale (*Siesjo, 1992*); essa è, inoltre, coinvolta in una serie di patologie neurodegenerative a progressione relativamente lenta come il Morbo di Parkinson e quello di Huntington. Benché le prove della partecipazione dell'eccitotossicità in tali disordini non siano chiare e dirette, di fatto, si è osservato che i neuroni danneggiati non sono in grado di sopravvivere a concentrazioni di glutammato che, normalmente, non sarebbero letali. I recettori ionotropici del tipo kainato e AMPA (α -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolpropionato) sono, generalmente, attivati dal legame con il glutammato; l'elevata stimolazione di questi canali ionici da parte del neurotrasmettitore provoca, però, l'influsso di ioni Na^+ che alterano l'omeostasi ionica intracellulare causando una rapida dissipazione del potenziale di membrana; la depolarizzazione della membrana, a sua volta, induce l'apertura dei canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti eliminando, così, il blocco del Mg^{2+} , sensibile al voltaggio, dal recettore N-metil-D-aspartato (NMDA) che determina un incremento massivo della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . La dissipazione del gradiente di Na^+ a cavallo della membrana interrompe alcuni importanti processi di trasporto come l'uptake del glutammato sinaptico (*Rossi et al., 2000*) e, probabilmente, anche la funzionalità dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, che porta

all'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare (*Kock & Barish, 1994*). Inoltre, l'aumento della concentrazione intracellulare del Na^+ determina la captazione di ioni cloro che, tramite il richiamo di acqua, provocano un rigonfiamento osmotico della cellula noto come "Edema citotossico" (*Rothman, 1985*) il quale, a sua volta, può portare a lisi della cellula e conseguente perdita dei suoi costituenti nello spazio extracellulare. L'aumento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare, da solo, è però sufficiente a indurre morte neuronale (*Choi, 1995*); quindi le cellule possono morire sia per rigonfiamento acuto Na^+/Cl^- -dipendente che per degenerazione ritardata indotta dall'aumento del Ca^{2+} . Gli eventi che portano alla morte eccitotossica della cellula possono essere indotti, quindi, a vari livelli: dalla deplezione di ATP secondaria alla privazione di ossigeno o di glucosio; dalla somministrazione di agonisti dei recettori dopaminergici (*Hijkhuizen et al., 1996*); dalla rimozione del blocco, voltaggio-dipendente, del Mg^{2+} dai recettori NMDA (*Zeevalk & Nicklas, 1992*); dal blocco della captazione del glutammato (*Velasco et al., 1996*) oppure dall'inibizione farmacologica dell'ATPasi Na^+/K^+ che induce direttamente depolarizzazione della membrana. Indipendentemente dall'evento scatenante, gli eventi neurotossici, successivamente, si autoamplificano portando, alla fine, a morte cellulare. Tutti questi processi sono stati studiati, molto estesamente, in vari modelli di danno neuronale acuto causato da ischemia o da infarto, sia in vivo che in vitro (*Pellegrini et al., 1990; Goldberg & Choi, 1993; Abdel-Hamid & Tymianski, 1997*). Recentemente, dall'analisi di alcuni modelli in vivo è risultato che il THC è in grado di ridurre il volume dell'edema citotossico, in maniera CB1 dipendente, in ratti neonati in cui il danno neuronale acuto è stato indotto mediante l'inibizione

dell'ATPasi Na^+/K^+ , (*van der Stelt et al., 2001*) dopo appena 15 minuti dal blocco dell'ATPasi Na^+/K^+ . Dopo sette giorni, il volume dell'area d'infarto si riduce, ulteriormente, del 40% rispetto agli animali controllo; tale effetto viene, però, abolito dalla contemporanea somministrazione di un antagonista selettivo del recettore CB1, come l'SR141716A. Gli autori hanno, perciò, suggerito che il ridotto influsso di Ca^{2+} , mediato dai recettori CB1, e il ridotto rilascio di Glutammato sono gli eventi responsabili della neuroprotezione in aree cerebrali come l'ippocampo, lo striato, la pars reticolata della Substantia Nigra e la corteccia pre-frontale (*van der Stelt et al., 2001*). Questa ipotesi è stata confermata anche da alcuni studi in vivo i quali hanno dimostrato che sia i cannabinoidi, naturali e sintetici, che l'anandamide sono in grado di inibire la trasmissione glutammatergica mediante un meccanismo a feedback negativo che provoca la chiusura dei canali al calcio voltaggio-dipendenti (*Shenet et al., 1996; Huang et al., 2001; Gerdeman & Lovinger, 2001*). Infatti una volta sintetizzata e rilasciata dall'elemento post-sinaptico, l'AEA diffonde all'indietro ed interagisce con i recettori CB1 pre-sinaptici i quali, sotto la stimolazione dell'endocannabinoide, inibiscono i canali al calcio voltaggio-dipendenti di tipo N- e P/Q determinando, così, un ridotto rilascio di neurotrasmettitori, come il glutammato o il GABA, in differenti aree del cervello (*Fig.5*), (*Wilson et al., 2001; Maejima et al., 2001; Kreitzer & Regehr, 2001; Gerdeman et al., 2002*).

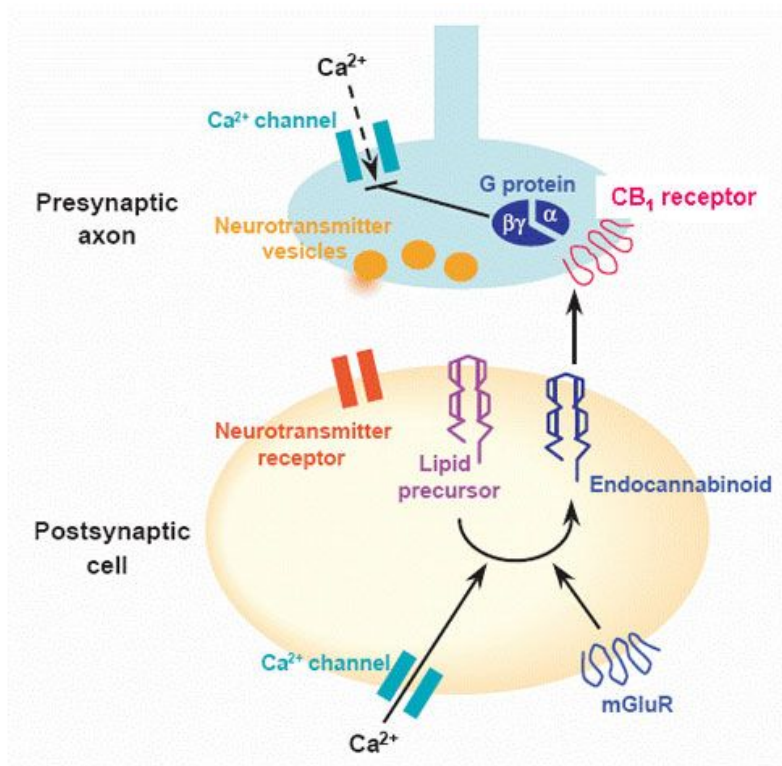


Figura 5. Modello dell' attività retrograda dell'AEA. La depolarizzazione pre-sinaptica determina l'ingresso di Ca^{2+} che, a sua volta, attiva l'esocitosi del glutammato; il glutammato diffonde nello spazio sinaptico e attiva i recettori post-sinaptici del glutammato; l'attivazione dei recettori glutammatergici NMDA, AMPA e di altri sottotipi provoca la depolarizzazione post-sinaptica e il conseguente ingresso di Ca^{2+} ; gli elevati livelli post-sinaptici di calcio attivano una transacilasi (TA) che converte la fosfatidiletanolamina (PE) in N-arachidonoiletanolamina (NAPE); NAPE viene, poi, idrolizzata da una fosfolipasi D (PLD) che genera l'anandamide. L'AEA è rilasciata dalla cellula post-sinaptica e diffonde all'indietro verso i recettori CB1 pre-sinaptici. Sotto l'attivazione dei recettori CB1 da parte dell'AEA vengono rilasciate le proteine $G_{i/o}$ che inibiscono i canali al Ca^{2+} voltaggio dipendenti N e P/Q. La chiusura dei canali al calcio voltaggio dipendenti provoca un ridotto del rilascio di neurotrasmettitori come il glutammato o il GABA.

1.1.5 Ruolo fisiopatologico degli endocannabinoidi

L'espressione ubiquitaria di vari componenti del sistema endocannabinoide, così come la loro presenza in organismi di livello inferiore, indica un importante ruolo del SE nella normale fisiologia (De Petrocellis et al., 2004). Vari studi di natura farmacologica hanno cercato di spiegare le funzioni del sistema endocannabinoide nel SNC tramite l'utilizzo di antagonisti del recettore cannabinoide che impediscono

a tali molecole di esplicitare la loro azione, oppure utilizzando topi knockout per i recettori cannabinoidi e stimolando poi l'attivazione dei recettori cannabinoidi. In generale, il SE e il recettore CB1, sono ritenuti regolare il bilancio energetico e i comportamenti quali l'assunzione di cibo, la paura e l'ansia; inoltre si ritiene possano modulare il metabolismo lipidico e glicidico (*Di Marzo & Matias, 2005*). Benché meno studiate, altre funzioni fisiologiche del SE possono essere correlate al sistema immunitario, alla neuroprotezione, alla memoria e all'apprendimento, alla nocicezione e alla fertilità. (*van der Stelt et al., 2005; Wang et al., 2006*).

Nonostante i livelli degli endocannabinoidi nei tessuti possano riflettere la stimolazione tonica delle cellule, è solo la variazione dei livelli dell'AEA e del 2-AG durante le varie condizioni fisiologiche e patologiche che, insieme alle osservazioni sulla loro attività farmacologica, sia in vivo che in vitro, fornisce utili informazioni sul possibile ruolo fisiopatologico degli endocannabinoidi. È stato scoperto che i livelli dell'anandamide e del 2-AG nell'intero cervello di ratto variano in maniera diversa durante lo sviluppo, dalla gestazione al concepimento, fino all'età adulta. Le quantità di AEA, NAPE e dei recettori CB1 aumentano progressivamente durante lo sviluppo, mentre i livelli del 2-AG rimangono costanti, fatta eccezione per il picco che si osserva il primo giorno dopo la nascita (*Berrendero et al., 1999*). Inoltre, livelli di AEA sempre più alti sono stati ritrovati nell'ippocampo e nel cervelletto dei ratti passando dalla seconda alla dodicesima settimana di età, per poi ridursi dopo la dodicesima settimana (*Koga et al., 1997*). Questi dati suggeriscono, pertanto, che l'AEA gioca, sicuramente, un ruolo fondamentale come ligando del recettore CB1 nell'adulto; invece, il 2-AG nel cervello può essere più importante nei primi stadi

dello sviluppo come, per esempio, nella regolazione dei processi primari dell'apprendimento. Entrambi gli endocannabinoidi, AEA e 2-AG, hanno dimostrato di riprodurre nei roditori l'inibizione della motilità spontanea e l'induzione della catalessia tipica dei cannabinoidi psicoattivi e degli agonisti CB1 (*Fride & Mechoulam, 1993; Mechoulam et al., 1995*). L'esistenza di un tono del SE nel controllo dell'attività spontanea e del comportamento motorio è stato suggerito dalla scoperta dell'anandamide, ma non del 2-AG, in microdializzati estratti dallo striato dorsale di ratti che possono muoversi liberamente (*Giuffrida et al., 1999*). In questi microdializzati si è visto che i livelli dell'AEA venivano fortemente incrementati (all'incirca di 8 volte rispetto al controllo) dalla stimolazione dei recettori dopaminergici con l'agonista D₂ quinpirolo; mentre il possibile antagonismo dell'azione dell'AEA sul recettore CB1 con un antagonista selettivo, come l'SR141716A, aumentava l'effetto stimolatorio sull'attività motoria dell'agonista D₂: quinpirolo. Un altro studio condotto nei ratti (*Di Marzo et al., 1999*) dimostrava che le concentrazioni dell'anandamide sono molto alte anche nella Substantia Nigra e nello strato esterno del Globus Pallidus. In realtà, l'iniezione intrapallidale di anandamide o di cannabinoidi sintetici induceva catalessia (*Wickens & Pertwee, 1993*), probabilmente potenziando l'azione del GABA attraverso l'inibizione del suo re-uptake (*Glass et al., 1997*). È stato, inoltre, scoperto che i livelli del 2-AG nel Globus Pallidus, diversamente da altre aree cerebrali, venivano notevolmente aumentati dopo il trattamento dei ratti con reserpina la quale, provocando deplezione dei depositi delle catecolamine dallo striato, induceva immobilità e sintomi del Morbo di Parkinson. La somministrazione nei ratti pre-trattati con reserpina di

agonisti dei recettori dopaminergici, D1 e D2, determinava un parziale recupero della capacità locomotoria che è accompagnato da una significativa riduzione dei livelli sia dell'anandamide che del 2-AG nel Globus Pallidus. Infine, la contemporanea somministrazione dell'agonista D2, quinpirolo, e dell'antagonista CB1, SR141716A, a ratti trattati con reserpina consente un recupero quasi completo della locomozione (*Di Marzo et al., 2000*). Questi risultati mostrano, pertanto, una correlazione inversa tra l'attività locomotoria spontanea e i livelli degli endocannabinoidi nello striato esterno del Globus Pallidus e suggeriscono che questi lipidi possono contribuire alla generazione di sintomi caratteristici del Morbo di Parkinson come la rigidità e la bradicinesia. Da questi studi emerge, ancora, che il sistema endocannabinoide può agire nei gangli della base per porre un "freno" alle azioni stimolatorie esercitate dal sistema dopaminergico sull'attività motoria. Il ruolo degli endocannabinoidi nel controllo della locomozione e, possibilmente, nei meccanismi di ricompensa, è stato dimostrato da un recente studio (*Di Marzo et al., 2000*) in cui, dapprima, è stata indotta la tolleranza al THC in un gruppo sperimentale di ratti e, poi, sono stati confrontati i livelli dell'anandamide e del 2-AG in diverse regioni cerebrali di questi animali, con quelli di ratti trattati con il solo veicolo. I più bassi livelli di entrambi gli endocannabinoidi sono stati ritrovati proprio nello striato dei ratti THC-tolleranti; inoltre altri studi precedenti (*Rodriguez de Fonseca et al., 1998*), avevano dimostrato che i ratti THC-tolleranti sono più responsivi alle droghe che potenziano l'azione della dopamina, come le amfetamine, e che questi ratti mostravano anche un comportamento motorio incrementato dopo l'interruzione del trattamento con THC.

Quindi, la scoperta di ridotti livelli dell'AEA e del 2-AG nello striato di ratti THC-tolleranti ha stabilito ancora una correlazione tra l'aumento dell'attività spontanea e i bassi livelli dei segnali endocannabinoidi nei gangli della base. Nello studio condotto da Di Marzo è stato scoperto che l'unica area dove il trattamento cronico con THC non induceva riduzione dei livelli di recettori cannabinoidi e di segnali transmembrana era quella limbica, in cui erano stati osservati anche livelli dell'anandamide 4 volte maggiori rispetto alle altre aree. In questa area cerebrale i cannabinoidi, aumentando il rilascio di dopamina dalle terminazioni dopaminergiche della porzione tegmentale ventrale, erano in grado di esercitare azioni di rinforzo sugli effetti di altre droghe di abuso; oppure, sotto varie condizioni fisiologiche, potevano partecipare alla regolazione dei meccanismi di ricompensa (*Gardner & Vorel, 1998*). Alcuni ricercatori (*Di Marzo et al., 2000*) hanno ipotizzato che la dopamina rilasciata nel Nucleus Accumbens, dopo trattamento cronico con THC (*Tanda et al., 1997*) stimolasse, a sua volta, la formazione di anandamide così come accade nello striato dorsale (*Giuffrida et al., 1999*). Il fatto che l'attivazione tonica dei recettori CB1 sia coinvolta, per esempio, nel rinforzo delle azioni degli oppioidi è stato suggerito da un recente studio eseguito su topi transgenici. Queste ricerche hanno, infatti, dimostrato una notevole riduzione degli effetti additivi degli oppioidi nei topi che mancano del recettore CB1 (*Ledent et al., 1999*), così come un mancato rilascio di dopamina, morfina-indotta, nel Nucleus Accumbens di questi animali transgenici (*Mascia et al., 1999*). Quindi, contrariamente a quanto accade nei gangli della base, gli endocannabinoidi rilasciati nel Nucleus Accumbens possono provocare

un incremento dell'azione della dopamina, forse partecipando ai meccanismi di ricompensa e di rinforzo di molte sostanze d'abuso.

Altre osservazioni quali, ad esempio, la scoperta dei recettori CB1 in alcuni nuclei ipotalamici come il nucleo arcuato e l'area pre-ottica mediale (*Fernandez-Ruiz et al., 1997*), suggeriscono che gli endocannabinoidi modulano anche alcune funzioni ipotalamiche comprendenti non solo il controllo della temperatura corporea (*Fride & Mechoulam, 1993; Mechoulam et al., 1995*), ma anche l'assunzione del cibo, l'appetito e il rilascio di ormoni pituitari. La somministrazione di un antagonista selettivo del recettore CB1, SR141716A, infatti, inibisce l'assunzione di cibo nei roditori (*Arnone et al., 1997; Simiand et al., 1998; Colombo et al., 1998*) e, sebbene questo effetto potrebbe essere dovuto alle proprietà di agonista inverso che possiede tale composto (*Landsman et al., 1997*), la possibilità che l'SR141716A agisca revertendo il tono stimolatorio degli endocannabinoidi sull'assunzione del cibo è confermato da due importanti osservazioni:

che l'AEA induce iperfagia nei ratti in una maniera sensibile all'SR141716A (*Williams & Kirkham, 1999*) e stimola l'assunzione di cibo anche a concentrazioni molto basse (*Hao et al., 2000*);

che i precursori biosintetici dell'AEA, NArPE, e il 2-AG sono stati trovati in concentrazioni elevate nel nucleo ipotalamico e nella ghiandola pituitaria anteriore (*Gonzales et al., 1999*).

Il sistema endocannabinoide, oltre alle funzioni finora menzionate, ha dimostrato di possedere un importante ruolo anche nel controllo dell'apprendimento e nei processi della memoria, soprattutto a livello dell'ippocampo. Tale funzione è supportata da

una serie di evidenze sperimentali. Infatti, sia l'AEA che il 2-AG inibiscono il Potenzamento a lungo termine (LTP) a livello dell'ippocampo (*Collin et al., 1995; Terranova et al., 1996; Stella et al., 1997*) e modulano il rilascio di glutammato o di Acetilcolina dalle porzioni ippocampali (*Di Marzo et al., 1998*); inoltre, l'AEA modula sia la memoria a breve termine che quella a lungo termine (*Mallet & Beninger, 1998; Castellano et al., 1997*); ancora, il blocco dei recettori CB1 con l'antagonista selettivo, SR141716A, aumenta il LTP (*Terranova et al., 1996*) mentre i topi Knockout per il recettore CB1 presentano un aumento della memoria così come del LTP (*Reibaud et al., 1999; Bohme et al., 2000*). Infine, sia l'AEA che la FAAH (ma non sempre il 2-AG) sono più abbondanti nell'ippocampo dell'uomo, del ratto e del topo (*Felder et al., 1996; Bisogno et al., 1999; Di Marzo et al., 2000*). Di notevole interesse è, soprattutto, il fatto che i livelli di anandamide nell'ippocampo di topi knockout per il recettore CB1 sono stati ritrovati significativamente più bassi che nei topi normali indicando, quindi, che l'attivazione tonica dei recettori CB1 in questa regione stimola la formazione di anandamide (*Di Marzo et al., 2000*). Tutti questi dati, considerati globalmente, conducono all'idea che esiste un tono del sistema AEA/CB1 che regola l'apprendimento e i processi della memoria a livello ippocampale.

Diversi studi (*Martin & Lichtman, 1998; Walker et al., 1999*) hanno utilizzato un approccio farmacologico per valutare, ancora, se gli endocannabinoidi fossero coinvolti anche nel controllo della percezione dolorosa e, soprattutto, nel dolore infiammatorio. Gli esperimenti eseguiti finora con antagonisti dei recettori cannabinoidi hanno fornito, però, risultati contrastanti a tal proposito suggerendo così

la necessità di ulteriori indagini che possano correlare le quantità degli endocannabinoidi nei tessuti alle varie risposte nocicettive. Due di questi studi sono stati eseguiti, di recente, sui ratti e in entrambi si è visto che la stimolazione elettrica della sostanza grigia periacqueduttale (PAG) induceva un'analgia, CB1 mediata, sebbene determinasse il rilascio di anandamide in microdializzati estratti da questa regione (*Walker et al., 1999*). Inoltre, l'iniezione di formalina, che è una sostanza chimica irritante, nella zampa dell'animale induceva una risposta nocicettiva oltre che il rilascio di AEA dalla PAG. Anche se la quantità di anandamide ritrovata nei microdializzati non era sufficiente ad attivare i recettori cannabinoidi, è stato osservato che sia nei ratti che nei topi il midollo allungato è una delle regioni con i più alti livelli di questo endocannabinoide e con la più bassa densità di recettori CB1 (*Bisogno et al., 1999; Di Marzo et al., 2000*). In realtà, un'altra ricerca ha suggerito che il tono endocannabinoide potrebbe regolare, in senso negativo, la percezione del dolore attraverso il recettore CB1 in un'altra regione del midollo allungato mediante gli stessi circuiti che sono responsabili della soppressione del dolore indotta dalla morfina (*Meng et al., 1998*). Per stabilire se l'AEA, il 2-AG e le PEA partecipassero al dolore infiammatorio come mediatori locali sono stati misurati quindi i livelli di questi composti nelle zampe di ratti dopo l'iniezione di formalina e durante la massima risposta dolorifica, e non sono state riscontrate significative differenze nei livelli di tali composti rispetto ai ratti trattati con il solo veicolo (*Beaulieu et al., 2000*). Pertanto, questi dati hanno portato all'idea che gli endocannabinoidi non necessariamente modulano la percezione del dolore infiammatorio nel sito flogistico.

Tutte le azioni degli endocannabinoidi sulla neurotrasmissione nel SNC sono riassunte nella tabella I.

Tabella I

Interferenze degli endocannabinoidi con le funzioni neuronali e con la neurotrasmissione nel SNC.

AZIONI BIOLOGICHE	LOCALIZZAZIONE NEL SNC
Controllo dell'induzione del dolore	Amigdala, talamo, Periacqueduttale grigia
Controllo dei disordini psicomotori	Gangli della base
Controllo della secrezione di ormoni pituitari, controllo del ciclo sonno-veglia, controllo della termogenesi, controllo dell'appetito	Ipotalamo
Controllo della plasticità sinaptica, inibizione del potenziamento a lungo termine, inibizione della trasmissione glutammatergica	Ippocampo
Controllo del tremore e della spasticità	Cervello e midollo spinale
Inibizione della sintesi e del rilascio di dopamina, inibizione della trasmissione GABAergica	Striato
Interferenza con la trasmissione dopaminergica	Gangli della base
Potenziamento della catalessia mediata dall'acido γ -aminobutirrico, soppressione della locomozione	Globus pallidus
Blocco dei recettori N-metil-D-aspartato	Corteccia e cervelletto
Controllo della visione scotopica	Retina

1.2 - Recettori per gli endocannabinoidi

I bersagli molecolari dell'anandamide e del 2-AG sono i recettori cannabinoidi che, insieme ai cannabinoidi endogeni, i trasportatori di membrana e le idrolasi, costituiscono il "Sistema Endocannabinoide". La famiglia recettoriale include: i recettori cannabinoidi CB1, presenti maggiormente nei neuroni centrali e periferici, e i recettori CB2, espressi prevalentemente dalle cellule immunitarie, i recettori cannabinoidi non CB1 e non CB2, i recettori non cannabinoidi e quelli vanilloidi (VR1). Diverse azioni biologiche dell'anandamide e del 2-AG o di entrambi, si esplicano attraverso l'attivazione di uno o più di questi targets mostrati nella tabella II. I recettori CB1 e CB2, che sono stati clonati e caratterizzati da Matsuda (1990) e Munro (1993) rispettivamente, appartengono entrambi alla famiglia dei recettori a sette domini transmembranari accoppiati a G proteine, in particolare, alle proteine G della famiglia G_i e G_o (Howlett & Mukhopadhyay, 2000). Il recettore CB1 è il più abbondante recettore accoppiato a G proteine espresso nel cervello (Pagotto et al., 2006) e la sua presenza nella neurocorteccia, nell'ippocampo, nei gangli della base e nel cervelletto è responsabile della maggior parte delle azioni comportamentali delle droghe cannabinoidi (Herkenham et al., 1990). Recentemente il recettore CB1 è stato trovato in un gran numero di tessuti periferici quali il tessuto adiposo, il fegato, il muscolo, il tratto gastrointestinale e il pancreas. (Cota & Woods, 2005; Juan-Picò et al., 2006). Il recettore cannabinoide CB2 è espresso nella milza, nelle tonsille e in cellule immunitarie come i linfociti B, i linfociti T e i monociti, indicando così una funzione del recettore prevalentemente di tipo immunitaria (Demuth & Molleman,

2006). Dati ottenuti da esperimenti eseguiti su topi knockout per il recettore CB2, indicano che tali recettori giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione, macrofago mediata, delle cellule T-helper (*Kunos & Batkai, 2001*). Inoltre, l'espressione dei recettori CB2 è stata dimostrata anche nelle cellule della microglia cerebrale, in condizioni infiammatorie (*Nunez et al., 2004*); e recenti studi con neutrofili umani indicano che il recettore CB2 è in grado di sopprimere la migrazione neutrofila durante il processo infiammatorio (*Kurihara et al., 2006*). Generalmente, AEA e 2-AG presentano un'affinità per il recettore CB1 molto maggiore che per il recettore CB2. Dati recenti ottenuti da studi eseguiti su topi knockout per i recettori CB1 e CB2 indicano, però, l'esistenza di altri recettori per gli endocannabinoidi, non-CB1 e non CB2, nel cervello (*Wilson & Nicoll, 2002*). Inoltre, gli endocannabinoidi possono produrre effetti che non sono mediati da recettori accoppiati a G proteine, anche se i meccanismi non mediati da recettori cannabinoidi sono ancora oggetto di studio (*Demuth & Molleman, 2006*).

1.2.1 - Struttura molecolare dei recettori per gli endocannabinoidi

Studi di criomicroscopia elettronica hanno rivelato la struttura 2D del recettore bovino della rodopsina accoppiato a G-proteine (*Krebs et al., 1998*) e questo ha permesso, poi, di costruire modelli più realistici di altri recettori a 7 domini transmembrana(7TM) della classe A. I recettori cannabinoidi, infatti, sono membri della classe A di recettori a 7TM, simil rodopsina, anche se formano una distinta sottoclasse di recettori leganti i lipidi. La loro struttura primaria, pertanto, è simile a quella di altri recettori accoppiati a G proteine (GPCR) con la presenza dei

caratteristici 7 domini transmembrana idrofobici che comprendono alcuni residui aminoacidici altamente conservati, una regione N-terminale che contiene i siti di glicosilazione e una regione C-terminale che può legarsi a complesse G-proteine (*Fig.6*). Tutti i cannabinoidi conosciuti, compresi quelli endogeni, sono piccole molecole non peptidiche e, in tutte le classi di recettori a 7TM, tali molecole si legano all'interno delle zone ad α -elica con poche interazioni nel loop extracellulare (EL) e nelle regioni aminoterminali (*Strader et al., 1994*). Una caratteristica particolare del recettore CB1 è la straordinaria lunghezza della sua regione aminoternale, non comune per un recettore appartenente alla classe A dei recettori a 7TM. Quasi tutta questa regione di circa 89 aminoacidi, contenente due siti di glicosilazione, può essere rimossa senza intaccare l'espressione del recettore, la sua interazione con specifici ligandi o l'attività biologica (*Rinaldi-Carmona et al., 1996*). Nonostante la loro bassa identità nei domini transmembrana, particolarmente in quelli TM1, TM4 e TM5, i recettori CB1 e CB2 legano diversi potenti agonisti, come il CP55940, con affinità molto simili.

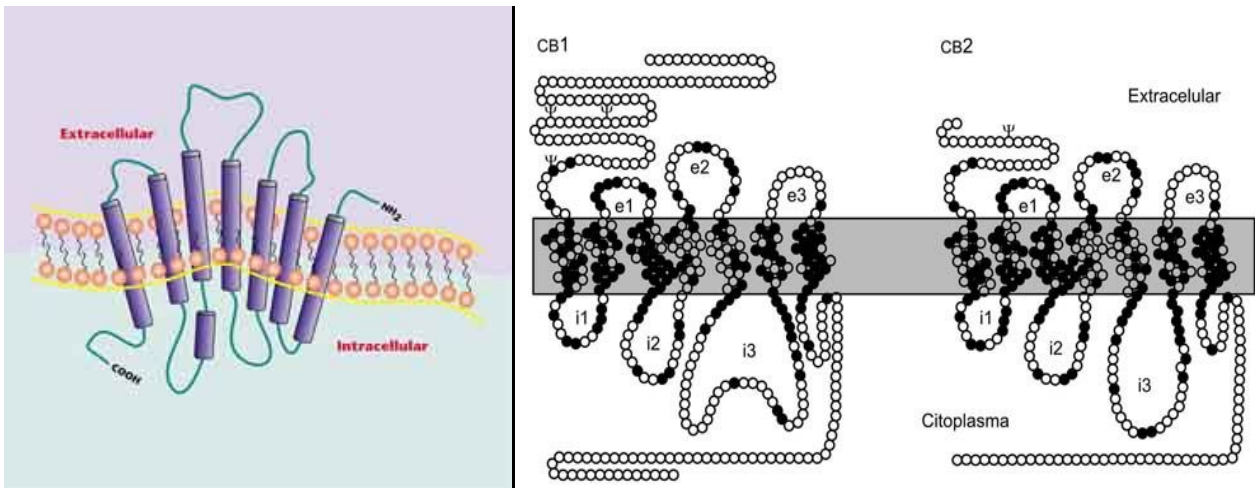


Figura 6. Recettori cannabinoidi umani. (a): una rappresentazione generale del recettore a 7TM accoppiato a G-proteine mostra le regioni transmembrana come cilindri collegati tra loro da tre loops extracellulari (EL) e tre loops intracellulare (IL). (b): una rappresentazione non ripiegata dei due recettori umani mostra i residui altamente conservati con cerchietti neri e i residui specifici dei vari sottotipi con cerchietti bianchi. La posizione dei siti di glicosilazione è rappresentata con il simbolo Ψ, mentre il rettangolo grigio rappresenta il doppio strato lipidico della membrana.

Finora sono stati scoperti specifici agonisti dei recettori cannabinoidi che possono rappresentare utili strumenti di ricerca nell'identificazione dei siti di legame, però, i dati ottenuti per altri recettori a 7TM mediante analisi mutazionali, devono essere utilizzati con molta attenzione in quanto i recettori cannabinoidi sono membri di una distinta sottofamiglia caratterizzata da proprietà strutturali che non si ritrovano nella maggior parte dei recettori a 7TM. In particolare essi mancano del residuo di cisteina nel loop extracellulare1 (EL1) e nel dominio transmembrana3 (TM3), presente nella gran parte dei recettori 7TM, ma contengono due residui di cisteina conservati nel EL2 che sembrano stabilizzare la struttura terziaria del recettore a causa del loro coinvolgimento nella formazione di ponti disolfuro intra-molecolari (EL2). In tale sottofamiglia, inoltre è assente un residuo di prolina altamente conservato, nel TM5, che potrebbe avere un importante effetto sulla struttura dello stesso dominio transmembrana 5. Le regioni C-terminali e il terzo loop intracellulare dei GPCR sono

noti essere ricchi in residui di serina e treonina. Nel caso della rodopsina e di diversi recettori adrenergici e muscarinici, alcuni di questi residui sono target di protein chinasi cAMP-dipendenti e di altre protein chinasi (*Strada et al., 1994*): tali fosforilazioni sono spesso agonista-dipendenti e provocano desensitizzazione del recettore e accoppiamento alla proteina G. Sul Cnr CB1 ci sono 4 gruppi di potenziali siti per la Protein chinasi cAMP-dipendente e per la protein chinasi Ca^{2+} -calmodulina dipendente che sono conservati nei recettori dell'uomo, del ratto e del topo. Il significato biologico di questi potenziali siti di fosforilazione presenti nelle molecole recettoriali, non è stato però ancora chiarito.

1.2.2 - Distribuzione e proprietà dei recettori cannabinoidi

A differenza dei recettori CB2 che sono espressi quasi unicamente nelle cellule immunocompetenti, considerevoli quantità dei recettori CB1 sono state trovate non solo nei neuroni centrali e periferici, sia del sistema nervoso vegetativo che sensoriale, ma anche in un gran numero di altri tipi cellulari come le cellule immunitarie, gli astrociti, i gameti e le cellule del tessuto riproduttivo, le cellule endoteliali del tessuto renale e vascolare, e le cellule epiteliali di varia origine. Questo può spiegarci perché tale sottotipo recettoriale sia espresso non solo nel SNC, dove certamente è molto abbondante, ma anche in diversi organi periferici (*Pertwee, 1997*). Nel cervello, il recettore CB1 è maggiormente rappresentato nelle aree che controllano la funzione motoria, cognitiva, emozionale e sensitiva come l'ippocampo, i gangli della base, il cervelletto, la corteccia, il talamo, l'amigdala e il bulbo olfattorio. Tuttavia, piccoli nuclei con un'alta densità di recettori CB1 sono stati

scoperti in altre aree come il midollo allungato e l'ipotalamo (*Herkenham et al., 1991*) che, per esempio, controllano il dolore, la temperatura corporea oppure il ciclo sonno-veglia e la funzione ormonale (*Figure 7a-7b*). Alti livelli dei recettori CB1 sono stati misurati, mediante tecniche di immunistochemica oppure, indirettamente, tramite ibridazione in situ anche nel midollo spinale, nelle corna dorsali e nella radice dorsale dei gangli, così come nelle fibre sensoriali che innervano le vie aeree, l'intestino, il sistema cardiovascolare e nelle fibre simpatiche. I recettori CB2, pur essendo espressi in cellule coinvolte nelle reazioni infiammatorie e immunitarie sia del SNC che periferico (che comprendono microglia, mastociti e macrofagi), possono contribuire a stimolare o ad inibire la tossicità neuronale modulando la generazione di mediatori come le interleukine, il nitrossido e il Tumor Necrosis Factor α (TNF α) (*Grundy et al., 2001*).

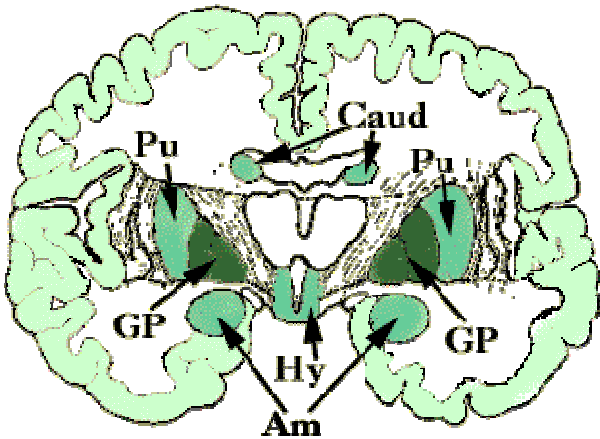


Figura 7a – Distribuzione dei recettori CB1 nel SNC. Le regioni primarie nelle quali i cannabinoidi si legano preferenzialmente sono i cosiddetti gangli della base. Si tratta di centri preposti al controllo della motilità involontaria. Essi comprendono: la Substantia Nigra (SN); il Globus Pallidus (GP); il Nucleo Caudato (Caud); il Putamen (Pu).

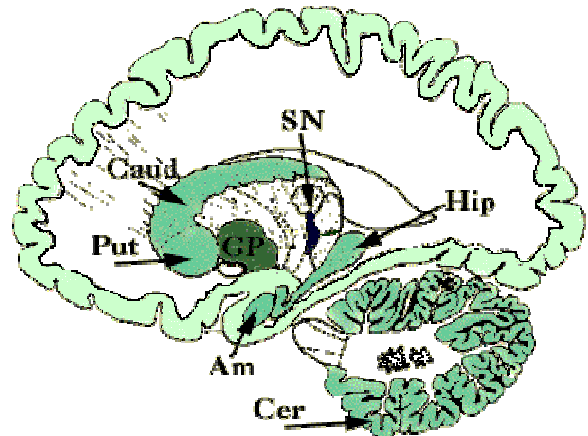


Figura 7b – Distribuzione dei recettori CB1 nel SNC. Un'altra area ricca di recettori per i cannabinoidi è il sistema limbico. Il sistema limbico è coinvolto nei processi di memorizzazione e nel controllo di stati emozionali quali la rabbia, il desiderio e la paura. Esso è composto da: Ippocampo (Hip) - sede di importanti processi legati alla memoria; Amigdala (Am) - area coinvolta nel controllo degli stati emozionali; Ipotalamo (Hy) - area che svolge funzioni di controllo neuroendocrino. I recettori per i cannabinoidi sono ben rappresentati anche nel cervelletto (Cer), la parte del sistema nervoso che controlla l'equilibrio e la coordinazione dei movimenti volontari. Inoltre, esiste una bassa densità di recettori per i cannabinoidi anche in varie aree della corteccia cerebrale (area verde chiaro delle figure soprastanti)

1.2.3 - Meccanismi di trasduzione del segnale dei recettori cannabinoidi

Recentemente, sono stati identificati i domini del recettore CB1 che interagiscono con differenti sottotipi di G-proteine mediando la trasduzione del segnale. La stimolazione funzionale dei recettori CB1 e CB2 da parte degli endocannabinoidi induce, attraverso l'attivazione di proteine $G_{i/o}$, una serie di eventi intracellulari normalmente associati ai recettori accoppiati a G proteine. Tali eventi comprendono:

1. **Inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi** con conseguente alterazione degli effetti a breve e a lungo termine della via cAMP/protein kinasi A. Prima ancora che avvenisse la caratterizzazione di uno specifico recettore di

membrana, esperimenti eseguiti su cellule di neuroblastoma, fettine cerebrali di ratto e colture di neuroni cerebellari hanno dimostrato che il Δ^9 -tetraidrocannabinolo ed altri cannabinoidi erano in grado di inibire l'adenilato ciclasi in una maniera reversibile, stereo selettiva e dose-dipendente (*Howlett and Fleming, 1984; Howlett et al., 1986; Bidaut-Russell et al., 1990; Pacheco et al., 1993*). Ci sono chiare evidenze che i recettori cannabinoidi, CB1 e CB2, sono coinvolti nella riduzione della produzione di cAMP, cannabinoide-indotta, tra cui il fatto che le regioni cerebrali in cui i cannabinoidi sono i più efficaci inibitori dell'adenilato ciclasi sono le stesse in cui si la più alta densità di recettori CB1 come l'ippocampo, lo striato e la corteccia cerebrale (*Bidaut-Russell et al., 1990*).

- 2. Inibizione dell'attività dei canali al calcio voltaggio-dipendenti di tipo N e P/Q e attivazione, invece, dei canali al K^+ di tipo A, voltaggio-dipendenti, e a rettificazione interna.** Questo effetto, che sembra essere mediato dalla diretta interazione delle sub unità β - γ della proteina $G_i/0$ con i canali ionici (*Wilson & Nicoll, 2002*), potrebbe essere responsabile del ridotto rilascio di acido γ -aminobutirrico (GABA) nelle sinapsi GABAergiche dell'area CA1 dell'ippocampo (*Hoffman & Lupica, 2000*) e nelle sinapsi glutammatergiche dello striato dorsale (*Huang et al., 2001*).
- 3. Una terza via, ben caratterizzata, associata ai recettori CB1 è quella delle protein chinasi mitogeno-attivate (MAP kinasi) (*Bouaboula et al., 1995*).** Recentemente l'importanza della famiglia delle MAP kinasi nella mediazione della differenziazione morfologica e nella promozione della sopravvivenza

neurone è stata abbondantemente trattata (*Fukunaga and Miyamoto 1998*). Diversi elementi di questa famiglia sono attivati durante vari eventi fisiologici e patologici quali l'ischemia cerebrale e l'epilessia e sono ritrovati, ad alte concentrazioni, nel sistema nervoso centrale. Attualmente, però, l'attivazione della pathway delle MAP kinasi da parte dei recettori cannabinoidi è stata dimostrata solo in colture cellulari; pertanto, non è ancora chiaro se tale via possa avere un ruolo fisiologico nel SNC in vivo.

4. **Stimolazione della fosfatidilinositolo3-kinasi** e di altre chinasi che fosforilano i residui di serina, treonina e tirosina delle proteine, e mobilizzazione del calcio intracellulare, verosimilmente attraverso l'attivazione della fosfolipasi C (*Guzman et al., 2002*) (*Fig 7*).

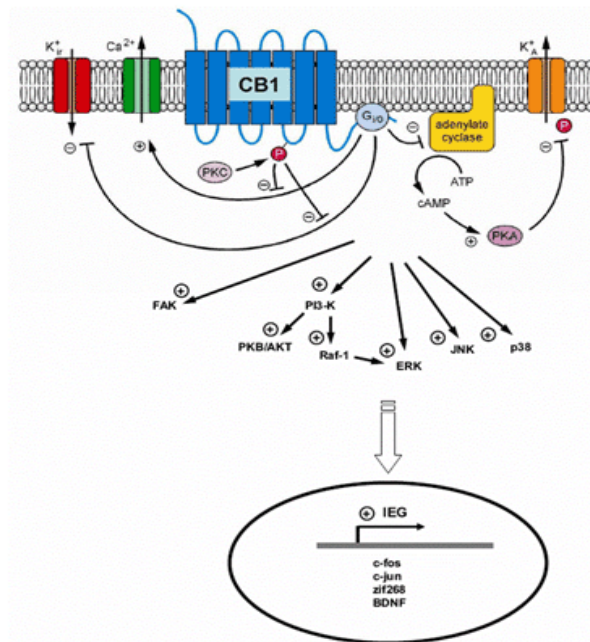


Figura 8. Pathways attivate dalla stimolazione del recettore CB1. L'attivazione dei recettori CB1 innesca una serie di eventi cellulari tipici delle proteine Gi/O ad essi accoppiate che comprendono: chiusura dei canali al Ca²⁺, apertura dei canali al K⁺, inibizione dell'adenilato ciclasi con conseguente riduzione dell'cAMP e stimolazione delle chinasi che fosforilano i residui di serina, treonina e tirosina delle proteine.

Il tipo di via di trasduzione del segnale modulata dall'attivazione del recettore CB1 sembra dipendere molto sia dal tipo di agonista utilizzato che dal tessuto o dall'organo coinvolto. In genere, dopo la loro attivazione, i recettori CB1 vanno incontro a processi di fosforilazione (*Garcia et al., 1998*) e internalizzazione (*Hsieh et al., 1999*) che possono essere seguiti dal riciclo in membrana, se il tempo di trattamento è breve (*Hsieh et al., 1999*). Alcuni esperimenti hanno messo in evidenza che, oltre ai recettori CB1 e CB2, ci sono altri bersagli molecolari attraverso cui gli endocannabinoidi possono indurre un'attività biologica. I recettori cannabinoidi non classici, ovvero non CB1 e CB2, sembrano mediare gli effetti di anandamide e congeneri sul rilascio di arachidonato e su molti altri processi come l'attivazione delle MAP Chinasi e delle piastine e l'inibizione dell'attività nelle giunzioni serrate. Un nuovo target molecolare dell'AEA, che sta suscitando grande interesse, è il recettore vanilloide (VR1), una proteina a sei domini transmembranari, con domini N- e C- terminali e un loop tra la 5° e la 6° elica transmembrana (*Caterina et al., 1997,1999*). VR1 è attivato da ligandi vanilloidi come la capsaicina, che è il principio attivo del *Capsicum annuum* (meglio noto come peperoncino), ma anche da stimoli nocicettivi come il dolore e gli acidi, pertanto, può essere considerato un importante mediatore molecolare di stimoli dolorosi nei terminali periferici dei neuroni sensitivi primari (*Szallas & Di Marzo, 2000*). L'attivazione dei recettori VR1 da parte dell'anandamide innesca una serie di eventi intracellulari che portano ad alcuni importanti effetti, come il rilassamento vascolare e l'induzione dell'apoptosi in neuroni umani e in cellule immunitarie (*Maccarrone et al., 2000*) (**Tab II**). L'attivazione dei recettori CB1 presenti in queste cellule ostacola, però, tali effetti

suggerendo così una relazione reciproca tra i vari bersagli dell'AEA che, se ulteriormente chiariti, potrebbero avere un importante significato regolatorio.

Tabella II

Effetti dell'AEA e del 2-AG sui differenti targets molecolari

Targets molecolari	Azioni biologiche
Recettori cannabinoidi "classici" (CB1 e CB2)	Inibizione dell'adenilato ciclasi Inibizione dei canali al Ca^{++} di tipo L, N e P/Q Attivazione dei canali al K^+ a rettificazione interna Attivazione della via delle MAP Kinasi Attivazione della fosfolipasi citosolica A_2 Attivazione delle Kinasi dell'adesione focale dei neuroni (FAK) Attivazione della NO sintasi (NOS) Soppressione dei recettori della prolattina Diminuzione delle resistenze vascolari sistemiche e mesenteriche Protezione contro l'apoptosi
Recettori cannabinoidi "non classici" (non-CB1 / non-CB2)	Rilascio di acido arachidonico Attivazione della via delle MAP Kinasi Inibizione dell'attività delle Gap junction Attivazione delle piastrine Ipotensione e vasodilatazione mesenterica Stimolazione della proliferazione di cellule linfoidi citokina dipendente
Recettori non-cannabinoidi o azioni non mediate da recettori	Inibizione dei canali al Ca^{++} di tipo L Inibizione dei canali al K^+ voltaggio dipendente Inibizione delle correnti mediate dai recettori della serotonina 5HT3 Attivazione delle correnti al Ca^{++} mediate dai recettori NMDA Rilascio di acido arachidonico Attivazione della Protein Kinasi C Attivazione delle piastrine
Recettore vanilloidi (VR1)	Rilassamento vascolare Rilascio del peptide vasoattivo calcitonina, gene dipendente Aumento del Ca^{++} intracellulare Disaccoppiamento mitocondriale Induzione dell'apoptosi

1.3 - L'ischemia cerebrale: epidemiologia ed approcci farmacologici

L'ischemia cerebrale rappresenta la terza causa di morte nei Paesi occidentali, con un'incidenza ogni anno di circa 125.000 nuovi casi nel Regno Unito, 700.000 negli Stati Uniti e un milione nell'Unione Europea (*Rothwell, 2001*), con una mortalità che supera il 25%. Essa costituisce la principale causa di invalidità grave ed è responsabile di circa la metà dei ricoveri ospedalieri per patologie neurologiche acute. Gli agenti farmacologici oggi a disposizione non sono in grado di limitare il danno associato all'ischemia cerebrale e sono usati solo a scopo preventivo, perché mirano a preservare o a ripristinare il flusso ematico cerebrale piuttosto che ad interferire con i meccanismi molecolari implicati nella morte delle cellule neuronali (*Gladstone et al., 2002*). Tra questi si annoverano gli anticoagulanti, gli antiaggreganti piastrinici che, anche in corso di ischemia, se somministrati entro le 48 ore, sembrano essere efficaci (*Alberts et al., 2001*) e le statine, farmaci in grado di ridurre i livelli ematici di colesterolo e di favorire la riorganizzazione vascolare e neuronale a seguito dell'insulto ischemico, garantendo la regressione del processo infiammatorio ad esso associato (*Chen et al., 2003*). Tuttavia, l'unico trattamento approvato dalla Food and Drug Administration per i pazienti colpiti da ischemia cerebrale consiste nella somministrazione, entro 3 ore dall'insulto, dell'attivatore tissutale del plasminogeno, un agente trombolitico che limita il danno ischemico mediante la rottura del trombo arteriolare ed il ristabilimento del flusso ematico; il

suo utilizzo è, però, limitato dal rischio di insorgenza di emorragia, che ammonta al 6.4%. La mancanza di farmaci efficaci in grado di contrastare il danno neuronale da ischemia, ha suscitato notevole interesse nel campo della ricerca. La maggior parte degli sforzi è stata focalizzata primariamente sull'attenuazione dell'eccitotossicità, il maggiore meccanismo coinvolto nell'insorgenza del danno cerebrale da ischemia. È stato osservato che gli antagonisti dei recettori NMDA diminuiscono marcatamente la morte di neuroni in coltura indotta da privazione di ossigeno e/o di glucosio, e risultano altamente neuroprotettivi anche in diversi modelli animali (*Albers et al., 1989*), ma non possono essere usati in clinica per gli effetti collaterali a livello centrale (*Lee et al., 2000*). Più promettente nel limitare i danni eccitotossici si è rivelato l'uso degli inibitori dei canali al calcio e al sodio voltaggio dipendenti e di sostanze capaci di stimolare la trasmissione GABAergica (*Goldberg, 2000*). Particolare attenzione è stata dedicata, inoltre, alla sperimentazione di agenti antiossidanti, come l'ebesen, un derivato organico del selenio, in grado di ridurre lo stress ossidativo che accompagna il danno ischemico, se somministrato entro le 24 ore dall'insulto (*Goldberg, 2000*), o di agenti capaci di inibire il rilascio e/o l'azione di citochine pro-infiammatorie, come l'antagonista del recettore per l'IL-1, che riduce notevolmente la morte ischemica (*Del Zoppo et al., 2000*). Inoltre, studi recenti dimostrano che l'inibizione dell'enzima nitrossido-sintasi (NO-sintasi) diminuisce il volume dell'infarto a seguito di ischemia anche se somministrato 24 ore dopo l'insulto (*Del Zoppo et al., 2000*). Infine, sono in via di sperimentazione molecole anti-apoptotiche e/o inibenti le proteine pro-apoptotiche, il cui effetto neuroprotettivo è documentato da evidenze sperimentali in diversi modelli animali. Nonostante i

notevoli progressi nella comprensione della fisiopatologia del danno ischemico e la scoperta di un gran numero di agenti farmacologici in grado di interferire con le conseguenze emodinamiche e molecolari dell'ischemia cerebrale, l'obiettivo di trattare efficacemente tale patologia non è stato ancora raggiunto. La mancata conoscenza delle cause alla base della diversa vulnerabilità neuronale nell'ischemia cerebrale, ha reso la maggior parte delle sperimentazioni cliniche fallimentari. Risulta evidente, quindi, la necessità e l'importanza della ricerca in tal campo.

1.3.1 - Meccanismi di danno neuronale da ischemia/riperfusion

In base alla diversa patofisiologia, è possibile distinguere due principali tipologie di ischemia cerebrale: l'*ischemia globale*, determinata dall'arresto completo dell'apporto sanguigno al cervello e l'*ischemia focale*, causata dalla riduzione del flusso ematico in una regione limitata del tessuto nervoso. L'esito finale dell'evento ischemico dipende dalla sua durata: nel caso in cui il flusso ematico venga ripristinato nell'arco di pochi minuti dall'insulto, si assiste ad un parziale recupero del danno, che, invece, può risultare irreversibile o anche letale nel caso in cui i tempi di ripristino del flusso siano più lunghi. Il danno neuronale che si sviluppa a seguito di un insulto ischemico prende origine da una complessa serie di eventi patofisiologici. I maggiori meccanismi patogenici di questa cascata includono l'eccitotossicità, le depolarizzazioni peri-infartuali, l'infiammazione e la morte cellulare; i cambiamenti ionici, metabolici ed emodinamici, derivanti da tali meccanismi, non sono, però, uniformi nell'intero tessuto ischemico. In esso è possibile distinguere una zona maggiormente colpita, denominata *core*, in cui si ha la perdita di circa l'80-90% del

flusso ematico e nella quale la morte cellulare è prevalentemente di tipo necrotico (*Li et al., 1998*) e una zona adiacente al core, detta **penombra**, in cui la riduzione dell'apporto ematico non supera il 60-70% (*Sims e Anderson, 2001*) e la morte cellulare è prevalentemente di tipo apoptotico (*Li et al., 1998*). A causa della crescente eccitotossicità o di altri fenomeni secondari associati, come la diffusione delle onde di depolarizzazione, l'infiammazione post-ischemica e la morte cellulare, la penombra può progredire ad infarto; pertanto, l'obiettivo primario nella neuroprotezione è proprio di salvaguardare la penombra ischemica (*Dirnagal et al., 1999*). L'alterazione più precoce che si manifesta nel danno ischemico è legata al difetto funzionale dei mitocondri e alla caduta dello stato energetico cellulare che si ripercuotono con rapidità su alcune funzioni della membrana plasmatica. Difatti, l'alterazione del flusso ematico riduce drasticamente il rilascio di ossigeno che determina la cessazione delle ossidazioni fosforilative, con una conseguente caduta dei livelli di ATP. Sebbene si assista, inizialmente, alla produzione di tale substrato attraverso la glicolisi, questa via vicariante non è in grado di soddisfare le richieste energetiche della cellula e termina ben presto per la rapida scomparsa di glicogeno e l'impossibilità di apporto di glucosio col sangue. Contemporaneamente, l'aumentata concentrazione di acido lattico è responsabile dell'acidosi, che è di per se elemento di lesività. A causa della deplezione energetica, le cellule neuronali e gliali perdono il potenziale di membrana; avviene una repentina redistribuzione degli ioni attraverso la membrana plasmatica che ne causa la depolarizzazione. I canali al calcio voltaggio dipendenti somatodendritici, così come quelli pre- e post-sinaptici, si aprono causando il rilascio esocitotico di glutammato. L'inattivazione dei trasportatori, a

seguito del calo energetico cellulare, rende impossibile la ricaptazione del neurotrasmettitore che si accumula nello spazio extracellulare, dando origine al processo eccitotossico. Nell'eccitotossicità la morte cellulare per necrosi o per apoptosi è innescata dall'eccessiva stimolazione dei recettori canale NMDA, AMPA e Kainato di tipo glutammaergico che mediano un influsso di calcio e sodio all'interno delle cellule neuronali post-sinaptiche, mentre il potassio è estruso all'esterno. La diffusione di glutammato e di potassio nello spazio sinaptico può propagare una serie di onde di depolarizzazione, le cosiddette depolarizzazioni peri-infartuali: con l'aumento del numero di tali depolarizzazioni, aumenta la dimensione dell'infarto (*Mies et al., 1993*). L'acqua si sposta nello spazio intracellulare per gradienti osmotici e le cellule neuronali e gliali si rigonfiano dando origine all'edema cerebrale. Allo stesso tempo, l'aumento di calcio intracellulare provoca l'attivazione di enzimi calcio-dipendenti quali proteasi, fosfolipasi, cicloossigenasi, NO-sintasi, responsabili della degradazione della struttura cellulare e della produzione di radicali liberi dell'ossigeno che sovrastano i meccanismi endogeni di scavenger, producendo la perossidazione lipidica, il danno alle membrane e l'attivazione di secondi messaggeri che promuovono l'insorgenza di un processo infiammatorio nell'arco di poche ore. La risposta infiammatoria può esacerberare a tal punto i livelli iniziali del danno tissutale che la possibilità di recupero della cellula diviene remota.

Sebbene l'intervento più immediato per limitare il danno neuronale consista nel pronto ripristino del flusso sanguigno, è noto che la riperfusione, a meno che non avvenga nell'arco di pochi minuti dall'insulto, può aggravare la situazione piuttosto che migliorarla, dando origine al cosiddetto danno da riperfusione. Esso è mediato

dalla formazione accelerata di molte specie reattive dell'ossigeno, inclusi i radicali idrossile, ossido nitrico (NO), prodotto dall'enzima NO-sintasi neuronale durante l'ischemia, e perossinitrito, un agente che promuove enormemente il danno tissutale (*Iadecola, 1997*) e che si forma per reazione tra l'NO e l'O₂, reso nuovamente disponibile dal ripristino del flusso sanguigno (*Murphy, 1999*). La riperfusione permette, anche, il ripristino del potenziale di membrana ed il conseguente accumulo di calcio a livello mitocondriale operato dai trasportatori nuovamente attivi. L'azione concomitante del calcio e dei radicali liberi, responsabili della distruzione della membrana mitocondriale interna e dell'ossidazione delle proteine del trasporto elettronico, indebolisce i mitocondri; si formano, così, pori di transizione che promuovono il rigonfiamento mitocondriale e la cessazione della produzione di ATP. Attraverso la membrana mitocondriale, incapace di mantenere la sua integrità, vengono riversate nel citosol molecole pro-apoptotiche, come il citocromo C, che promuovono l'innescamento del processo di morte cellulare (*Kroemer & Reed, 2000*).

1.3.2 - Modelli sperimentali di ischemia cerebrale

Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi modelli sperimentali in vivo per riprodurre l'ischemia cerebrale, globale e focale, allo scopo di studiarne i meccanismi patofisiologici ed i possibili interventi terapeutici. Il modello clinicamente più importante di ischemia cerebrale globale è l'arresto cardiaco, che negli esperimenti su animali da laboratorio può essere prontamente prodotto mediante una fibrillazione ventricolare o l'iniezione intracardiaca di un agente cardioplegico. Un approccio tecnicamente più semplice, sebbene piuttosto traumatico, è il metodo di Korbachev

(*Kawai et al., 1992; Korpatchev et al., 1982*), in cui un uncino è introdotto all'interno del petto per comprimere i grandi vasi mediastinali contro le pareti interne del torace. La cessazione o riduzione del flusso ematico cerebrale, nell'ischemia cerebrale globale, può essere riprodotto anche mediante l'occlusione delle arterie carotidi comuni e delle arterie vertebrali (occlusione dei 4 vasi) responsabili dell'intera irrorazione cerebrale.

Il modello clinicamente più importante di ischemia cerebrale focale è l'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo). Tale occlusione può essere effettuata mediante l'applicazione di un agente vasocostrittore, come l'endotelina 1, che produce un severo vasospasmo (*Hart et al., 1978*), o tramite l'inserimento nel lume del vaso di sottili filamenti di nylon, ricoperti di silicone (*Longa et al., 1989*), che possono essere facilmente rimossi per consentire la riperfusione. In questo modello di ischemia cerebrale focale prossimale l'occlusione dell'arteria cerebrale media avviene a livello della biforcazione che la separa dall'arteria cerebrale anteriore e determina una netta riduzione del flusso ematico nelle regioni del caudato putamen e della corteccia parietale e somato-sensoriale (*Memezawa et al., 1992*). L'ischemia cerebrale focale distale si ottiene, invece, per elettrocauterizzazione o per formazione di trombi, dovuta alla somministrazione di Bengal rosa o irradiazione laser, nei tratti più distali della MCA e determina un danno prevalentemente a livello corticale (*Markgraf et al., 1993*).

1.4 - Estrogeni e Neuroprotezione

Gli ormoni steroidei modulano diversi ed importanti processi fisiologici. Gli estrogeni, in particolare, sono fondamentali per la normale crescita, sviluppo, differenziazione e regolazione del sistema riproduttivo femminile e della ghiandola mammaria e sono direttamente coinvolti nella regolazione dell'asse ipotalamoipofisario. Tuttavia, l'attenzione nei confronti degli estrogeni è notevolmente cresciuta negli ultimi anni, in parte per i molti dati epidemiologici che hanno suggerito un effetto della Terapia Estrogenica Sostitutiva (ERT) nel ridurre, oltre che i rischi di patologie cardiovascolari e la comparsa dell'osteoporosi (*Grady et al., 1992*), anche l'incidenza del morbo di Alzheimer (AD) nelle donne in postmenopausa (*Henderson, 1997*).

La ricerca che ne è scaturita per comprendere le basi biologiche della neuroprotezione esercitata dagli estrogeni nell'AD, ha notevolmente ampliato la conoscenza degli effetti degli estrogeni sul SNC, avvalorando l'idea che tali molecole possano influenzare non solo i circuiti neuronali strettamente correlati con la riproduzione, ma anche aree cerebrali, come l'ippocampo, associate invece, a funzioni di tipo cognitivo. Sappiamo oggi che l'estradiolo, inizialmente noto solo come ormone sessuale femminile, possiede proprietà neurotrofiche e neuroprotettive ed è in grado di esercitare importanti effetti sulla plasticità e la sopravvivenza neuronale con meccanismi a tutt'oggi non completamente chiariti (*Garcia-Segura et al., 2001; Maggi et al., 2004*).

1.4.1 - Sintesi dell'estradiolo

Il 17β -estradiolo è il principale estrogeno umano, seguito dall'estrone e dall'estriolo. Si tratta di uno steroide a 18 atomi di carbonio, contenente un anello A fenolico e un gruppo β -idrossilico in posizione 17 dell'anello D. Le ovaie sono la principale fonte di estrogeno circolante nelle donne in premenopausa; negli uomini e nelle donne in postmenopausa, la fonte principale è rappresentata dallo stroma del tessuto adiposo. Precursore immediato del 17β -estradiolo è il testosterone, dal quale l'estrogeno viene sintetizzato per aromatizzazione dell'anello A in una reazione in tre tappe catalizzata dal complesso enzimatico dell'aromatasi (Fig 1.6). Gli effetti estrogenici fisiologici sono spesso attribuiti agli ormoni circolanti, ma gli estrogeni possono, in alcune circostanze, essere prodotti localmente. È il caso del SNC dove essi possono essere sintetizzati, a partire dagli androgeni, attraverso l'aromatasi presente in loco e manifestare i loro effetti localmente, vicino al sito di produzione.

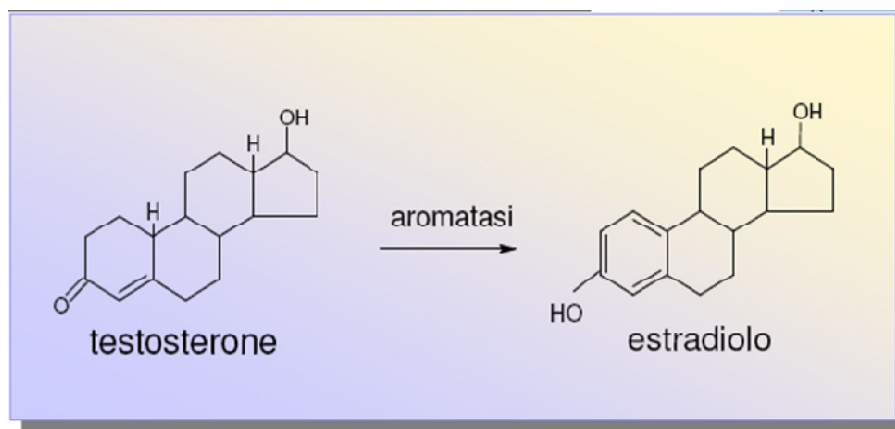


Fig.9 Sintesi del 17β - estradiolo. Precursore del 17β -estradiolo è il testosterone, dal quale l'estrogeno viene sintetizzato per aromatizzazione dell'anello A in una reazione in tre tappe catalizzata dal complesso enzimatico dell'aromatasi.

1.4.2 - Recettori Estrogenici

Molti, ma non tutti gli effetti degli estrogeni, sono mediati dal legame ai loro recettori (ERs). Analogamente agli altri membri della superfamiglia dei recettori per gli ormoni steroidei, quelli per gli estrogeni sono fattori di trascrizione attivati dal ligando, espressi in specifiche aree target del SNC e di altri organi estrogeno-sensibili. Fino al 1996 era noto un unico tipo di ER (ER α) (Green *et al.*, 1996), ma in quell'anno Kuiper e colleghi (Kuiper *et al.*, 1996), clonano un nuovo recettore che viene indicato come ER β . I due sottotipi recettoriali presentano un'alta omologia di sequenza amminoacidica, particolarmente nel dominio legante il DNA, mostrano differente affinità di legame per l'estradiolo e altri ligandi, quali i fitoestrogeni (Kuiper *et al.*, 1997) e, a dispetto dell'omologia, ER β ha un'attività trascrizionale notevolmente più bassa di ER α (Cowley & Parker, 1999). In vivo, i recettori per gli estrogeni esistono come parte di un complesso oligomero che include *heat shock proteins* e immunofilline (Tsai & O'Malley, 1994). In seguito al legame dell'estrogeno o all'attivazione ligando-indipendente, il recettore si dissocia parzialmente dall'oligomero per formare omo- o etero-dimeri (Cowley *et al.*, 1997; Pettersson *et al.*, 1997) che si legano a specifiche sequenze del DNA nei geni target, indicate come Elementi di Risposta agli Estrogeni (EREs), le quali sono situate a livello del promotore nei geni responsivi. In alternativa, l'ER attivato, può interagire con altri fattori di trascrizione leganti il DNA, come Sp1 (Safe, 2001) o Jun e Fos al sito AP-1 (Paech *et al.*, 1997) o con proteine adattatrici (Horwitz *et al.*, 1996) che, essendo presenti in quantità limitante, possono conferire specificità trascrizionale tissutale. Entrambi i processi portano al reclutamento di co-attivatori e componenti

del complesso di iniziazione della trascrizione della RNA polimerasi II, con conseguente aumento della trascrizione dei geni target.

Esempi di geni umani i cui promotori contengono EREs funzionali, sono quelli codificanti per pS2 (*Jeltsch et al., 1987*), ossitocina (*Richard & Zingg, 1990*), c-fos (*Weisz et al., 1990*), c-myc (*Weisz et al., 1988*), TGF-1 (*El-Ashry et al., 1996*) e prolattina (*Berwaer et al., 1994*). La fosforilazione, ormone-dipendente, dei recettori degli ormoni steroidei può giocare, inoltre, un ruolo importante nel legame del recettore ai suoi specifici elementi di risposta e, di conseguenza, nell'attivazione della trascrizione; questo vale anche per ER α che risulta essere fosforilato dopo il legame con il rispettivo ligando (*Denton et al., 1992; Weigel & Zhang, 1998*).

Accanto all'azione degli estrogeni mediata dai recettori nucleari, esistono evidenze, sempre più corpose, sulla capacità degli ER di mediare gli effetti degli estrogeni attraverso l'interazione con le cascate di segnale intracellulari (*Mermelstein, 1996; Toran-Allerand, 1996; Singer et al., 1999; Singh et al., 1999; Kelly & Wagner, 1999*). Molti di questi effetti sono rapidi ed indipendenti dalla sintesi proteica. Per molti anni è stata ipotizzata la presenza di un ER localizzato a livello della membrana plasmatica per spiegare risultati ottenuti in studi elettrofisiologici, che dimostravano effetti rapidi degli estrogeni in diverse aree cerebrali, e studi di binding, i cui dati erano a favore di un legame degli estrogeni con la frazione di membrana (*Zheng & Ramirez, 1997*). Ipotetici meccanismi per spiegare le azioni rapide degli estrogeni hanno incluso, oltre alla versione di membrana dei classici recettori nucleari ER α e ER β (*Razandi et al., 1999; Milner et al., 2001*), nuovi membri della famiglia degli ERs (*Gu et al., 1999; Nadal et al., 2000*), recettori accoppiati a proteine G (*Kelly &*

Wagner, 1999, Filardo et al., 2000) o recettori tirosin-chinasici simili a quelli dei fattori di crescita (Anuradha et al., 1994). Allo stato attuale, è stato descritto un ER che colocalizza con la caveolina-1, identico ad ER α e coinvolto nell'attivazione della NOS endoteliale (eNOS) e di proteine di segnale regolate per via extracellulare (Razandi et al., 2002); è stata anche proposta l'esistenza di un ER-X putativo associato alla membrana plasmatica coinvolto nell'attivazione della cascata delle MAP chinasi (Mitogen-Activated Protein Kinases; protein chinasi attivate da mitogeni) (Toran-Allerand et al., 2002). In aggiunta, Yang e colleghi (Yang et al., 2004), hanno per la prima volta recentemente riportato una localizzazione mitocondriale dell'ER- β in colture primarie di neuroni, in cardiomiociti ed in cellule ippocampali HT-22.

1.4.3 - Evidenze cliniche e sperimentali a supporto dell'attività neuroprotettiva estrogenica

Diversi studi clinici e dati epidemiologici avvalorano l'idea di un ruolo svolto dagli ormoni sessuali nel favorire le funzioni cognitive e ridurre il rischio e/o ritardare l'insorgenza di diversi disordini neurologici e mentali. Gli estrogeni sono in grado di migliorare i sintomi associati al Morbo di Parkinson (Blanchet et al., 1999; Cyr et al., 2002; Currie et al., 2004) ed alla Malattia di Alzheimer (AD) (Paganini-Hill & Henderson, 1996; Brinton, 2004), migliorando la memoria, l'apprendimento ed i movimenti fini, così come altri aspetti neurocognitivi che subiscono deterioramento con il normale invecchiamento (Resnick & Maki, 2001; Zec & Trivedi, 2002).

Esistono, d'altra parte, anche studi che documentano come la terapia estrogenica sostitutiva non dia alcuna protezione nell'AD conclamato o nello scempenso e declino cognitivo (*Barrett-Connor & Kritz-Silverstein, 1993; Mulnard et al., 2004*).

Una delle possibili spiegazioni per questa apparente discrepanza di risultati potrebbe essere il tipo di associazione estro-progestinica utilizzato ed il tempo in cui la terapia è iniziata. Pare infatti che un inizio precoce della terapia, quando i neuroni non sono stati ancora danneggiati, sia fondamentale per produrre effetti positivi sulla progressione dell'AD (*Brinton, 2004; Gibbs & Gabor, 2003*). Allo stato attuale esistono numerose evidenze sperimentali che attribuiscono agli estrogeni proprietà neurotrofiche e neuroprotettive sia *in vivo* che *in vitro*. Gli estrogeni incrementano la vitalità, la sopravvivenza e il differenziamento di colture neuronali primarie sottoposte a deprivazione di glucosio e siero (*Faivre-Bauman et al., 1981; Behl et al., 1997*), proteggono colture neuronali primarie e tumorali dall'anossia e da differenti insulti neurotossici quali l'esposizione ad amminoacidi eccitatori (*Singer et al., 1996; Sribnick et al., 2004*), agenti ossidanti e beta-amiloide (*Green et al., 1996; Zhang et al., 2004*).

Inoltre, l'aggiunta di 17β -estradiolo al mezzo di coltura promuove la sopravvivenza di diverse popolazioni neuronali, quali neuroni ipotalamici (*Duenas et al., 1996*), dell'amigdala (*Arimatsu et al., 1986*), corticali (*Brinton et al., 1997; Wang et al., 2003*) ed ippocampali (*Sudo et al., 1997; Audesirk et al., 2003; Huang et al., 2004*). Questi dati *in vitro* sono avvalorati da altrettanti studi *in vivo* che documentano la capacità degli estrogeni di attenuare la morte neuronale in modelli animali di ischemia (*Simpkins et al., 1997b; Zhang et al., 1998; Wang et al., 1999*;

Hurn et al., 2000), nonché di ridurre la perdita neuronale dovuta alla somministrazione di tossine dopaminergiche (*Dluzen , 2000*) e acido kainico (*Azcoitia et al., 1998*). La somministrazione di dosi, sia farmacologiche che fisiologiche, dell'estrogeno produce effetti neuroprotettivi in roditori di sesso femminile ovairetommizzati esposti a danno ischemico focale (*Simpkins et al., 1997b; Alkayed et al., 1998; Dubal et al., 1998; Rusa et al., 1999*). La neuroprotezione da estrogeni è stata riportata anche in ratti maschi, nei quali la somministrazione sia acuta che cronica di 17 β -estradiolo riduce il danno cerebrale prodotto da occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media (*Toung et al., 1998*). Anche il danno ippocampale conseguente ad ischemia cerebrale globale transitoria risulta significativamente ridotto a seguito di pretrattamento con 17 β -estradiolo in ratti (*Wang et al., 1999; Bagetta et al., 2004*), topi (*Horsburgh et al., 2002*) e gerbilli (*Chen et al., 1998*). Le proprietà neuroprotettive degli estrogeni sono state anche riportate in un modello di Morbo di Parkinson indotto dalla somministrazione di 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP); in questo studio, le lesioni striatali prodotte dalla tossina, sono ridotte sia nei ratti maschi che in ratti femmina ovairetommizzati (*Dluzen et al., 1996; Callier et al., 2000; Ramirez et al., 2003*).

Inoltre, gli estrogeni, migliorano le prestazioni mnemoniche sia in roditori maschi che nelle femmine ovairetommizzate (*Simpkins et al., 1997a; Lannert et al., 1998; Frick et al., 2000*). Queste osservazioni suggeriscono che gli estrogeni possono avere un effetto stimolante sull'attività neuronale ed essere, altresì, coinvolti nel mantenimento della normale funzione nervosa. Perciò, il declino nei livelli degli estrogeni, potrebbe spiegare la maggiore predisposizione dei roditori di sesso

femminile rispetto ai maschi a sviluppare, con l'età, disfunzioni cognitive (Markowska, 1999; Frick et al., 2000).

1.4.4 - Meccanismi di neuro protezione del 17β-Estradiolo

L'estradiolo esercita un'ampia varietà di effetti nel cervello, agendo sulla differenziazione neuronale e gliale, la plasticità sinaptica, l'umore, alcune funzioni cognitive, memoria e comportamento (Garcia-Segura et al., 1994; McEwen & Alves, 1999; Woolley, 1999). Questa molteplicità di effetti riflette un'altrettanto ampia molteplicità di meccanismi d'azione (Fig. 10).

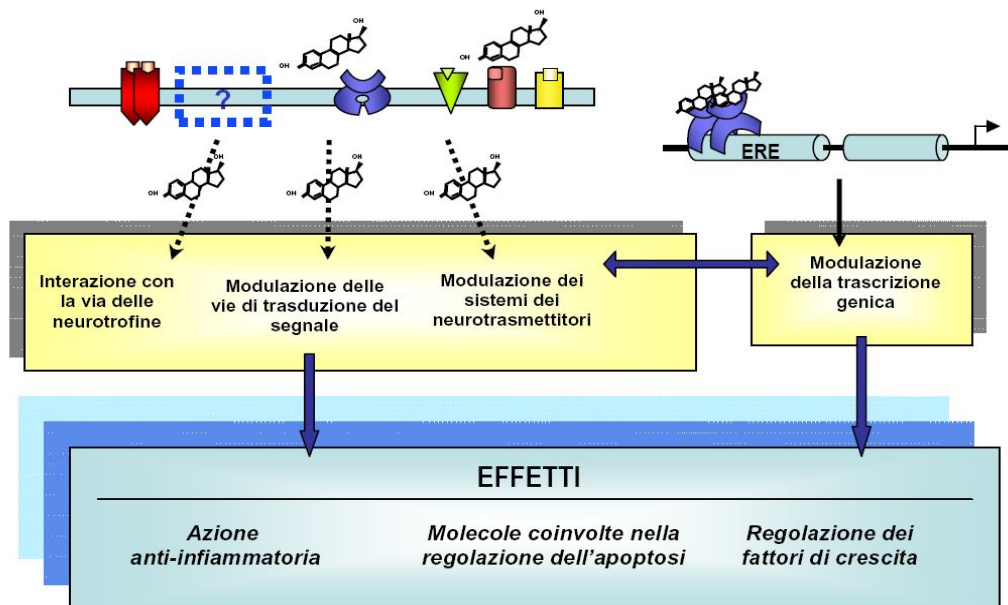


Figura 10. Meccanismi d'azione alla base degli effetti neurotrofici e neuroprotettivi degli estrogeni.

A livello molecolare, accanto alla classica attivazione dei propri recettori nucleari, gli estrogeni sono anche in grado di interagire con le *pathways* dei secondi messaggeri,

di alterare l'omeostasi del calcio e di esercitare effetti antiossidanti. I meccanismi neuroprotettivi degli estrogeni possono essere classificati in:

- **effetti genomici** (ad insorgenza lenta o ritardata);
- **non genomici** (ad insorgenza rapida, minuti o secondi).

Gli effetti genomici possono essere a loro volta distinti in diretti, dovuti cioè al legame dell'ER agli ERE con successiva attivazione della trascrizione, ed indiretti, dovuti all'attivazione ER-mediata di altri fattori di trascrizione. Gli effetti non genomici, indipendenti dalla sintesi proteica, possono essere invece suddivisi in effetti "recettore-dipendenti" (dovuti per esempio all'azione su ER di membrana) e "recettore indipendenti" (Fig. 11).

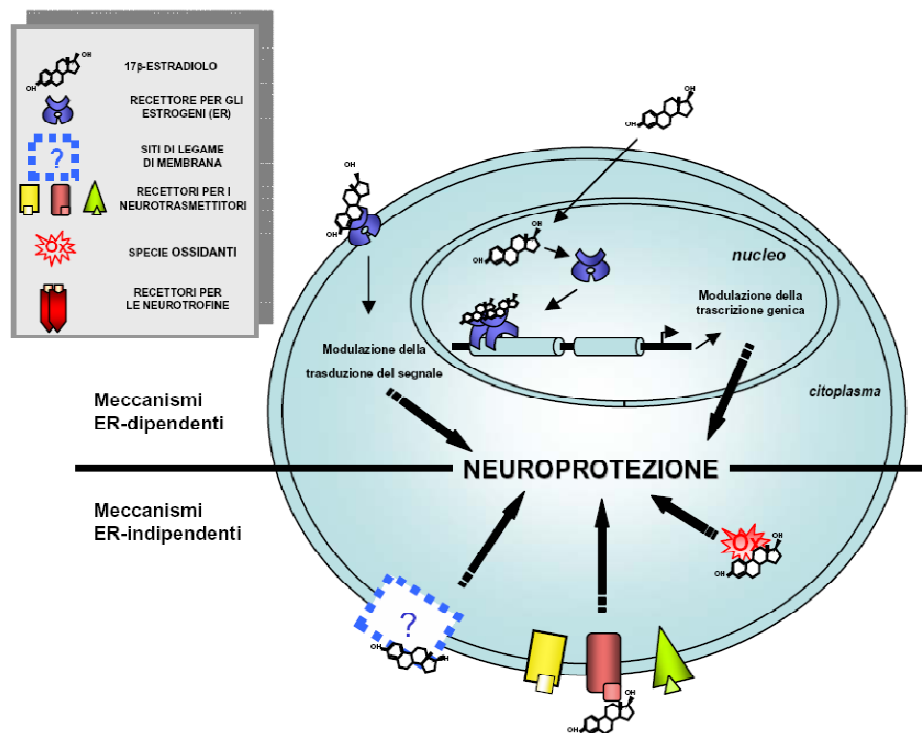


Figura 11. Azioni ER-dipendenti ed ER-indipendenti degli estrogeni

1.4.4.a - Effetti genomici

Gli effetti genomici vengono esercitati dall'ormone attraverso il classico meccanismo d'azione nucleare, con conseguente regolazione dell'entità e della velocità di trascrizione di alcuni geni target, il cui prodotto proteico rende poi conto dell'effetto finale. Gli effetti sul sistema riproduttivo appaiono mediati dall'attivazione del recettore ER α , mentre non è ancora chiaro il contributo di ciascun sottotipo recettoriale nel mediare gli effetti neuroprotettivi e neurotrofici (*Rissman et al., 1997; Ogawa et al., 1997, 1999*).

Fra i potenziali target molecolari della neuroprotezione mediata dagli ER vi sono:

– regolatori della morte cellulare

Gli effetti neuroprotettivi dell'estrogeno possono comportare la modulazione dell'espressione di molecole coinvolte nel controllo della morte cellulare, come le proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2.

L'estradiolo promuove l'espressione di inibitori della morte cellulare quali Bcl-2 e Bcl-XL (*Garcia-Segura et al., 1998; Singer et al., 1998; Pike, 1999; Zhao et al., 2004*), mentre riduce l'espressione di Nip-2, modulatore negativo di Bcl-2 (*Garnier et al., 1997; Vegeto et al., 1999; Belcredito et al., 2001*), e determina una riduzione dei livelli di mRNA per il fattore pro-apoptotico BAD in cellule PC12 trasfettate con il recettore ER α (*Gollapudi & Oblinger, 1999a*).

L'aumentata espressione di Bcl-2 indotta dall'estradiolo, riduce la morte di neuroni NT2 esposti ad H₂O₂ o glutammato (*Singer et al., 1998*), protegge neuroni ippocampali esposti a glutammato (*Nilsen & Brinton, 2003*), ed è associata alla riduzione della morte apoptotica prodotta dalla beta-amiloide in colture di neuroni

ippocampali (Pike, 1999). In seguito ad ischemia cerebrale focale si osserva una riduzione nell'espressione di Bcl-2 nella corteccia: tale effetto può essere prevenuto dalla somministrazione di estradiolo (Dubal et al., 1999). Alkayed et al. (2001) hanno dimostrato come l'effetto neuroprotettivo dell'estradiolo sia associato con un aumento di Bcl-2 e del suo mRNA anche nell'area di penombra prodotta da occlusione dell'arteria cerebrale media. L'aumentata espressione di Bcl-2 previene il rilascio di citocromo c dai mitocondri, che a sua volta porta all'attivazione della cascata delle caspasi implicate nel processo di morte cellulare conseguente ad un insulto citotossico (Desagher & Martinou, 2000; Reed, 2002). (Fig.12).

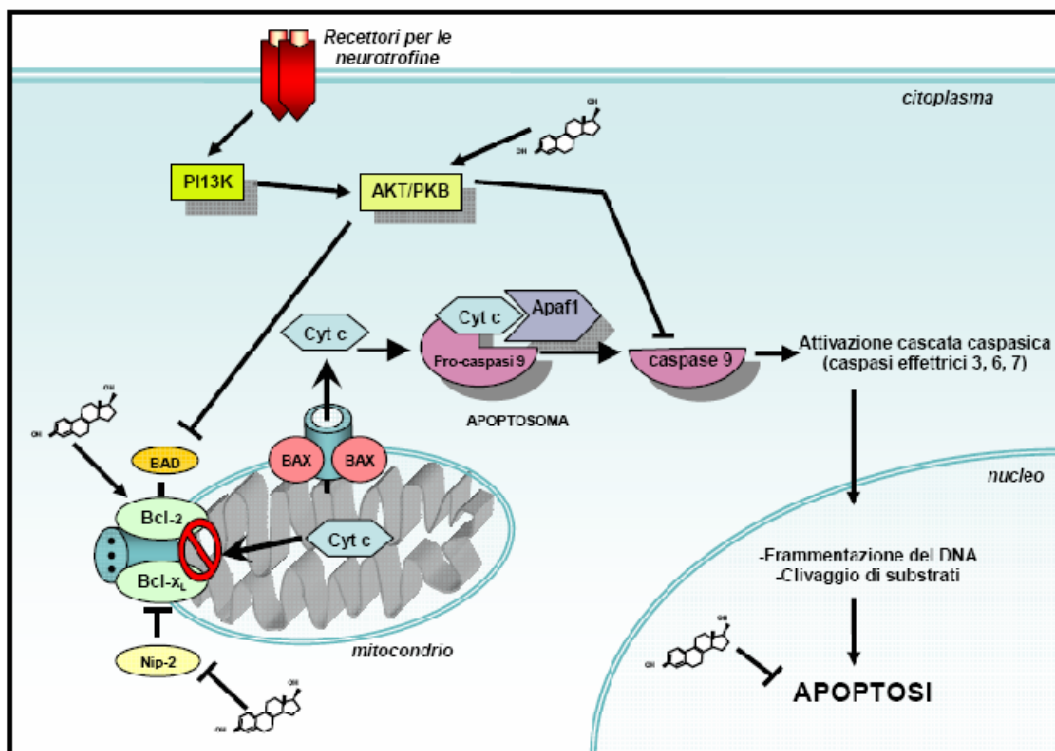


Figura 12. Effetti anti-apoptotici degli estrogeni

L'ischemia transitoria globale produce un aumento significativo di citocromo c nella frazione citosolica dell'ippocampo di ratto; tale effetto viene significativamente ridotto dal pretrattamento con estradiolo, e ciò indica che l'inibizione della traslocazione del citocromo c potrebbe rappresentare un meccanismo fondamentale alla base della neuroprotezione da estrogeni (*Bagetta et al., 2004*). Oltre all'effetto sulla traslocazione del citocromo c, Bcl-2, localizzato a livello dei mitocondri, promuove il rilascio di fattori di sopravvivenza capaci di sopprimere la depolarizzazione del potenziale di membrana mitocondriale (*Dispersyn et al., 1999*), la deplezione di ATP (*Kim et al., 2001*) e la perossidazione lipidica indotta da stimoli citotossici quali lo stress ossidativo (*Howard et al., 2002*).

Oltre all'inibizione della morte cellulare, Bcl-2 sembra anche promuovere la crescita e la rigenerazione assonale (*Holm & Isacson, 1999*) e ridurre la produzione di radicali liberi dell'ossigeno (*Bogdanov et al., 1999*). Tali effetti potrebbero spiegare come l'estradiolo promuove la sopravvivenza neuronale e riduce lo stress ossidativo nei neuroni, oltre a bloccarne la morte in seguito all'esposizione a determinati insulti.

– fattori di crescita

Alcuni degli effetti trofici del 17β -estradiolo nel tessuto neuronale possono essere mediati dall'attivazione dei segnali associati ai fattori di crescita. In specifiche popolazioni neuronali, gli estrogeni regolano l'espressione di neurotrofine come il BDNF (*fattore neurotrofico di derivazione cerebrale*) (*Gibbs, 1999*) e l'NGF (*fattore di crescita nervoso*), così come quella dei loro recettori, p75 (recettore a bassa affinità per l'NGF), trkA (*Gibbs et al., 1994; Sohrabji et al., 1994; McMillan et al., 1996*) e trkB (*Cambiasso et al., 2000*). Alcuni studi documentano come gli estrogeni siano

capaci di aumentare i livelli di mRNA per il BDNF nel bulbo olfattorio, nella corteccia cingolata (*Jeziarski & Sohrabji, 2000*), nell'ippocampo (*Gibbs, 1999*) e in neuroni mesencefalici (*Ivanova et al., 2001*). L'azione sinergica degli estrogeni e dell'NGF risulta essere fondamentale nella protezione di cellule PC12 dall'apoptosi indotta da deprivazione di siero (*Gollapudi & Oblinger, 1999b*). Inoltre, la neuroprotezione esercitata dagli estrogeni in colture corticali primarie esposte a glutammato è associata ad una rapida attivazione dell'attività di tirosin-kinasi e MAPK (*Singer et al., 1999*); ciò suggerisce che l'attivazione dei segnali di trasduzione dei fattori di crescita può avvenire anche senza una diretta attivazione dell'ER intracellulare (*Singh et al., 1999; Toran-Allerand et al., 1999*). Accanto a questo, la co-localizzazione spesso osservata in diversi tipi neuronali degli ERs e dei recettori per le neurotrofine è un ulteriore dato a favore della convergenza, e della reciproca interazione, fra questi due sistemi per regolare l'espressione di specifici geni importanti per la sopravvivenza cellulare (*Toran-Allerand et al., 1992; Toran-Allerand, 1996*).

Il fattore di crescita insulino-simile I (IGF-I) è fra i fattori di crescita in grado di interagire con il 17β -estradiolo in molti tipi di cellule (*Cardona-gomez et al., 2002*); sono, infatti, molteplici gli studi che supportano un'interdipendenza dell'azione degli estrogeni e dell'IGF-I nel cervello. L'IGF-I stimola la differenziazione e la sopravvivenza di popolazioni neuronali specifiche agendo sul suo recettore (IGF-IR), un membro della famiglia dei recettori ad attività tirosin-chinasica che utilizzano come sistemi di trasduzione del segnale la via della della fosfatidilinositolo-3-chinasi e quella delle MAPK. Il 17β -estradiolo e l'IGF-I realizzano un'azione concertata per

promuovere la differenziazione e la sopravvivenza dei neuroni ipotalamici in coltura (*Duenas et al., 1996; Quesada et al., 2002*); in questo caso, l'effetto degli estrogeni dipende da IGF-I, mentre l'azione di IGF-I viene bloccata dall'ICI 182,780, un antagonista dell'ER (*Dueñas et al., 1996*).

Inoltre, l'attivazione del recettore per IGF-I è necessaria per l'induzione della plasticità sinaptica e gliale da parte degli estrogeni nell'ipotalamo *in vivo* (*Fernandez-Galaz et al., 1997, 1999*). Simili risultati sono stati ottenuti in ratti ovariectomizzati esposti ad acido kainico: la neuroprotezione esercitata dagli estrogeni nel giro dentato dipende dall'attivazione del recettore per IGF-I, mentre l'effetto protettivo di IGF-I viene bloccato da antagonisti dell'ER (*Azcoita et al., 1998, 1999*).

Tali evidenze dimostrano che la neuroprotezione avviene solo quando entrambi i recettori (ER e recettore per IGF-I), o i loro sistemi di trasduzione, vengono attivati. Inoltre, sia l'IGF-I che l'estrogeno attivano l'Akt; l'ER α co-precipita con IGF-IR dopo somministrazione sistemica del 17 β -estradiolo nei ratti, probabilmente attivandolo (*Mendez et al., 2003*) e, viceversa, l'IGF-I può attivare l'ER trasfettato in cellule di neuroblastoma SK-ER3 senza che sia necessario il legame con il 17 β -estradiolo stesso (*Agrati et al., 1997*). Questi ed altri punti di convergenza fra le vie attivate da IGF-I e l'estrogeno sono tutte evidenze a favore di una cooperazione fra i due sistemi per promuovere effetti neurotrofici e neuroprotettivi.

– fattori coinvolti nel processo infiammatorio

L'estradiolo è in grado di interferire con l'aumento di fattori pro-infiammatori associato con i processi neurodegenerativi quali il Morbo di Alzheimer, l'ischemia e la sclerosi multipla. È stato, per esempio, dimostrato che la neuroprotezione da

estrogeni nell'ischemia cerebrale è accompagnata da una riduzione dei livelli di TNF- α (Liao et al., 2002). Lo stesso effetto si riscontra in modelli di encefalomielite autoimmune sperimentale, un modello animale di sclerosi multipla (Zec & Trivedi, 2002) nel quale l'estradiolo inibisce l'espressione di alcune citochine, chemochine e dei loro recettori nel SNC di ratti femmine (Matejuk et al., 2001).

Altri mediatori del processo infiammatorio modulati dal 17 β -estradiolo sono, nel topo, la metalloproteasi-9 ed il recettore C3 del complemento (Vegeto et al., 2003).

Inoltre, la somministrazione di dosi fisiologiche di estrogeno previene l'attivazione microgliale ed il richiamo dei monociti periferici indotto dall'iniezione i.c.v. di lipopolisaccaride (Vegeto et al., 2003). Questa osservazione è in linea con l'osservazione che il 17 β -estradiolo è in grado di inibire, in vitro, l'attivazione microgliale indotta da diversi stimoli infiammatori (Bruce-Keller et al., 2000).

L'azione a livello genomico non è il solo meccanismo coinvolto nell'azione antiinfiammatoria degli estrogeni poichè il blocco di fattori pro-infiammatori, quali iNOS, PGE2 ed MMP-9, in cellule microgliali sembra essere mediato dall'attivazione della via delle MAPK mediata dall'ER (Vegeto et al., 2001; Bruce-Keller et al., 2000).

1.4.4.b - Effetti non genomici

- Azione anti-ossidante

L'attività antiossidante è una proprietà intrinseca alla molecola dell'estradiolo, dovuta alla presenza del gruppo ossidrilico in C3 sull'anello A del nucleo steroideo.

Diversi studi dimostrano una chiara correlazione fra l'azione antiossidante

dell'estrogeno e le sue proprietà neuroprotettive (*Goodman et al., 1996; Behl et al., 1997; Moosman et al., 1999*). Il 17β -estradiolo può, per esempio, attenuare la perossidazione indotta da β -amiloide, glutammato o da esposizione a Fe_2SO_4 (*Goodman et al., 1996*). L'azione antiossidante si osserva normalmente a concentrazioni elevate (1-10 μM), considerate sovralfisiologiche e ciò riduce la rilevanza di tale effetto *in vivo*. Tuttavia, bisogna tener conto che, nelle aree cerebrali sottoposte ad insulto, si osserva un aumento dell'espressione dell'aromatasi negli astrociti (*Garcia-Segura et al., 1999*) ed un aumento dei livelli di ERs (*Dubal et al., 1999*), il che rende meno semplice stabilire quali siano, in tal caso, le concentrazioni fisiologiche dell'ormone.

- Modulazione dell'azione dei neurotrasmettitori

L'estrogeno è in grado di interagire con siti di legame putativi presenti sulla membrana plasmatica, producendo una serie di effetti rapidi sull'eccitabilità (*Moss & Gu, 1999*) e la trasmissione neuronale (*Bicknell, 1998*); il 17β -estradiolo può, inoltre, interagire con i recettori per alcuni neurotrasmettitori regolandone l'attività.

In colture ippocampali di ratto, per esempio, l'estradiolo protegge dall'eccitotossicità attraverso un'azione diretta sulla membrana (*Weaver et al., 1997*), producendo un'inibizione rapida e reversibile delle correnti ioniche indotte dall'NMDA, effetto questo non revertito da antagonisti recettoriali dell'ER; per contro, l'estradiolo, è anche in grado di favorire, in cellule ippocampali, il legame dell'NMDA al proprio recettore (*Woolley et al., 1997*).

Questi effetti che appaiono in opposizione, possono, in realtà, dipendere dal grado di attivazione del sistema glutamatergico dal momento che è stato dimostrato (*Nilsen et*

al., 2002), come l'estradiolo possa aumentare i livelli intracellulari di Ca^{2+} , in presenza di concentrazioni fisiologiche di glutammato e viceversa attenuarne l'aumento associato alla presenza di livelli tossici di neurotrasmettitore. Altro esempio di interazione con sistemi neurotrasmettitoriali è la capacità dell'estradiolo di proteggere il sistema nigro-striatale, regolando il rilascio di dopamina e inibendone l'uptake mediante una riduzione dell'affinità del trasportatore per il neurotrasmettitore (*Dluzen et al.*, 2000).

- Attivazione di vie di traduzione del segnale

Un ulteriore meccanismo d'azione alla base degli effetti neuroprotettivi degli estrogeni è la capacità dell'estradiolo di attivare ed interagire con diverse vie di trasduzione del segnale.

a) Attivazione della via cAMP-PKA-CREB

La pathway cAMP-PKA è un sistema di trasduzione del segnale ben conosciuto, in cui l'attivazione dell'adenilato ciclasi (AC) porta ad un aumento della concentrazione di AMP ciclico (cAMP) che attiva poi la protein chinasi A (PKA). L'estradiolo è in grado di aumentare i livelli di cAMP, in neuroni ipotalamici ed in cellule di neuroblastoma umano, incrementando così la fosforilazione di CREB (*cAMP responsive element binding protein*) PKA-mediata (*Zhou et al.*, 1996; *Watters & Dorsa*, 1998). Questi effetti sono rapidi e compaiono dopo 30-60 minuti dall'esposizione all'ormone. CREB può essere fosforilata anche attraverso la pathway delle MAP chinasi (*Singh et al.*, 1999) e potrebbe pertanto rappresentare un punto di convergenza per i molteplici eventi di trasduzione del segnale attivati o modulati dagli estrogeni. L'attivazione della via del cAMP e/o la fosforilazione di

CREB potrebbero contribuire a generare un effetto protettivo, diminuendo la suscettibilità delle cellule neuronali ai segnali pro-apoptotici (*Kew et al., 1996; Kobayashi et al., 1997*), aumentando l'espressione della proteina anti-apoptotica bcl-2 (*Ji et al., 1996*) o attivando le MAP chinasi (*Vossler et al., 1997*).

b) Attivazione della via della PLC e modulazione delle concentrazioni intracellulari di calcio.

L'estradiolo è in grado di attivare la fosfolipasi C (PLC), che idrolizza il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato a inositolo 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerolo (DAG) con conseguente rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari e attivazione della protein chinasi C (PKC) (*Ansonoff et al., 1998*). L'attivazione della pathway dell'IP3 è responsabile del rapido rilascio di Ca^{2+} che si osserva in neuroni dopaminergici embrionali in coltura esposti all'estradiolo (*Beyer & Raab, 1998*). Un aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} in seguito a trattamento con 17β -estradiolo è stato riportato anche in neuroni ippocampali (*Murphy & Segal, 1996*).

Tuttavia, l'effetto del 17β -estradiolo sull'omeostasi del calcio non sempre conduce ad un reale aumento della concentrazione intracellulare dello ione. Il 17β -estradiolo attenua, infatti, in neuroni ippocampali, l'aumento intracellulare di Ca^{2+} indotto dalla beta-amiloide (*Blum-Degen et al., 1998*) e dalla gp120 (*Brooke et al., 1997*); inoltre, il trattamento con l'estrogeno di ratti femmine prive di ovaie riduce in neuroni striatali le correnti del Ca^{2+} attraverso i canali di tipo L (*Mermelstein et al., 1996*). Gli estrogeni possono modulare i livelli Ca^{2+} anche per interazione con i recettori per il glutammato AMPA/kainato e/o NMDA (*Wong & Moss, 1992; Weaver et al., 1997*).

Pertanto, l'effetto del trattamento con 17β -estradiolo sulle concentrazioni intracellulari del Ca^{2+} varia nelle diverse condizioni sperimentali. Una delle ipotesi formulata per spiegare questa variabilità di risposta potrebbe essere la dipendenza dal complessivo stato di attivazione dei meccanismi molecolari deputati al mantenimento dell'omeostasi calcica al momento dell'esposizione all'estrogeno.

c) Attivazione della via delle MAPK.

L'interazione fra l'attività degli estrogeni ed i segnali mediati dai fattori di crescita nel cervello è ormai un dato consolidato; esistono, infatti, numerose evidenze sperimentali che indicano come i fattori di crescita e gli estrogeni possano agire in concerto per regolare la differenziazione di alcune aree cerebrali (*Toran-Allerand, 1996*), nonché mediare alcuni degli effetti neuroprotettivi del 17β -estradiolo. Nei neuroni, la pathway delle MAPK è attivata dal legame delle neurotrofine (come BDNF e NGF) ai loro recettori tirosin chinasi (RTK); questa rappresenta la via classica di attivazione delle chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK 1 e 2; *Extracellular regulated kinases*). L'interazione RTK-ligando porta all'autofosforilazione su tirosina del recettore, la proteina adattatrice Shc può allora riconoscere e legare il sito recettoriale fosforilato; il complesso recettore- Shc lega quindi la proteina Grb e il fattore di scambio di nucleotidi guanilici Sos che catalizza lo scambio del GDP con il GTP sulle GTPasi monomeriche Ras. La conseguente attivazione di Ras attiva le chinasi B-Raf e MEK 1/2 che, a loro volta, fosforilano ERKs. ERK 1/2 può allora alterare l'espressione genica traslocando nel nucleo e agendo sullo stato di fosforilazione e quindi di attivazione di uno specifico set di fattori di trascrizione o fosforilando p90RSK.

L'estradiolo può attivare questa via di traduzione del segnale; esso è, per esempio, in grado di proteggere rapidamente i neuroni ippocampali dall'eccitotossicità, attraverso un meccanismo che richiede, appunto, l'attivazione delle MAPK (*Bi et al., 2000*). Singh e colleghi suggeriscono che l'attivazione rapida delle MAPK prodotta da 17β -estradiolo sia indipendente dagli ERs, poichè il l'estrogeno induce la fosforilazione di MAPK anche in neuroni corticali ottenuti da topi *knockout* per ER α (*Singh et al., 2000*) e, nelle stesse colture, questa via è attivata anche dal 17α -estradiolo (isomero del 17β -estradiolo inattivo a livello trascrizionale) ed è insensibile all'effetto dell'antagonista dell'ER, ICI 182,780 (*Singh et al., 2000*).

È stata dimostrata la capacità del 17β -estradiolo di indurre rapidamente la fosforilazione di ERK1/2 in neuroni corticali di ratto in coltura (*Singer et al., 1999*). Al contrario di quanto riportato da Singh et al., i risultati di esperimenti di immunoprecipitazione in quest'ultimo studio indicano come punto d'incrocio fra i componenti delle via delle MAPK attivata dalle neurotrofine e l'estradiolo, B-Raf, che pare formare un complesso multimerico di cui fanno parte hsp90 ed ER (*Singer et al., 1999*). Allo stato attuale non è quindi possibile escludere un coinvolgimento degli ER nell'attivazione della via delle MAPK.

d) Attivazione di PI3K

In colture neuronali corticali, il 17β -estradiolo può modulare la via Akt/Protein chinasi B (AKT/PKB) attivando la fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI-3K) (*Honda et al., 2000*), che converte il fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato in fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato. Si ha così l'attivazione della chinasi fosfoinositide dipendente (PDK 1/2) che fosforila e attiva Akt/PKB. Le vie di PI-3K/Akt (*Cantley, 2002*) e di ERK1/2

(*Aikawa et al., 1997; Berra et al., 1997*) sono fra le più importanti *pathways* coinvolte nella sopravvivenza in molti tipi di cellule e possono, pertanto, essere responsabili di alcuni degli effetti neurotrofici e neuro protettivi del 17 β -estradiolo.

È stata recentemente descritta un'interazione diretta di ER α con p85, la subunità regolatrice di PI-3K, mentre ER β co-precipita con Akt (*Sun et al., 2001*). Vi sono molti studi che dimostrano la capacità degli estrogeni di attivare Akt (*Zhang et al., 2001; Cardona-Gomez et al., 2002; Ivanova et al., 2002*), che è a sua volta in grado di inattivare la glicogeno sintasi chinasi 3 β (GSK-3) (*Alessi & Cohen, 1998*) mediante fosforilazione a livello delle serine 9 e 21 (*Cohen & Frame, 2001; Scheid & Woodgett, 2001*).

La GSK-3 è una serin/treonin protein chinasi costitutivamente attiva nelle cellule, la cui attività può essere inibita attraverso la fosforilazione di residui di serina, attivata da una varietà di stimoli fra cui l'insulina. La GSK è altamente espressa nel SNC (*Takahashi et al., 1994*), dove partecipa a numerosi processi biologici (sintesi del glicogeno, sintesi proteica, accumulo di β -catenina, sopravvivenza cellulare, etc.) e patologici (diabete, insulino-resistenza, AD); in particolare la sua inibizione è associata all'attivazione di vie per la sopravvivenza nei neuroni (*Cross et al., 1995*), mentre l'attivazione sostenuta può risultare in neuro degenerazione (*Pap & Cooper, 1998; Bhat et al., 2000*). Pertanto, l'inattivazione della GSK attraverso la pathway della PI-3K (ma anche attraverso quella delle MAPK), rappresenta un ulteriore meccanismo di neuroprotezione innescato dall'estradiolo (*Goodenough et al., 2003; Cardona-Gomez et al., 2004*).

1.5 - Scopo della tesi

Recenti studi hanno messo in luce la capacità degli estrogeni di aumentare la possibilità di ripresa da un insulto ischemico cerebrale derivante da un disturbo cardiovascolare o da uno stroke cerebrovascolare. Il 17β -estradiolo, in particolare, ha dimostrato di ridurre la mortalità e il danno cerebrale in una larga varietà di modelli animali di ischemia cerebrale acuta, inclusa l'occlusione dell'arteria cerebrale media transitoria e permanente (*Simpkins et al., 1997, Alkayed et al., 1998, Dubal et al., 1998*). In accordo con questi dati, è stato osservato anche che la somministrazione sia di dosi fisiologiche che farmacologiche di E2 conferisce neuroprotezione in roditori femmine ovaectomizzate sottoposte a ischemia cerebrale focale. Sebbene gli effetti neuroprotettivi dell'E2 negli uomini siano controversi, ci sono sempre più crescenti evidenze che dimostrano che l'E2 aumenta la possibilità di recupero dal danno conseguente a ischemia cerebrale (*Paganini-Hill A., 1995, Schmidt et al., 1996*); inoltre, l'uso continuato di estrogeni ha dimostrato di ridurre significativamente il rischio di stroke (*Paganini-Hill et al., 1988, Falkeborn et al., 1993, Longstreth et al., 1994*). Finora sono stati suggeriti diversi meccanismi che stanno alla base della neuroprotezione dell'E2, tra cui la modulazione della sinaptosogenesi, l'attività anti-apoptotica e antiinfiammatoria o ancora la capacità di aumentare il flusso sanguigno cerebrale. Gli estrogeni esercitano la loro attività tramite l'interazione con i recettori estrogenici intracellulari, $Er\alpha$ e $Er\beta$, che risulta poi nella modulazione della trascrizione dei geni target degli estrogeni, inclusi quelli implicati nella sopravvivenza neuronale. Interessantemente, recenti studi hanno rivelato che questi

ormoni sessuali femminili possono conferire un'importante modulazione del sistema endocannabinoide in maniera tessuto e specie dipendente come dimostrato, sia in vivo, nell'utero di topo, sia in vitro in colture di cellule endoteliali, in cellule di neuroblastoma e di linfoma umane (Waleh *et al.*, 2002, Maccarrone *M.*, 2005). In particolare, l'anandamide viene rilasciata da cellule endoteliali umane trattate con E2 e completa l'azione di tale ormone sulle piastrine umane (Maccarrone *et al.*, 2002). Finora però, la modulazione del sistema endocannabinoide da parte degli estrogeni nel cervello è stata poco investigata. Pertanto, lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'insulto ischemico, indotto tramite occlusione dell'arteria cerebrale media (MCA), sui livelli regionali di anandamide, sul suo metabolismo e sul legame e l'espressione al suo recettore CB1, nel ratto maschio adulto. Inoltre, abbiamo valutato le possibili azioni neuroprotettive di agonisti e antagonisti dei recettori cannabinoidi in tale modello sperimentale.

CAPITOLO 2 – MATERIALI E METODI

2.1 - Animali e trattamenti farmacologici

Gli studi sono stati condotti in ratti maschi adulti (250-300g) del ceppo Wistar (Charles River, Calco, Italia) stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C) e umidità (65%), sottoposti a condizioni d'illuminazione artificiale controllata, con un ciclo luce/buio di 12 ore. Per lo studio farmacologico di neuroprotezione, il 17 β -estradiolo (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) è stato disciolto in olio vegetale ed è stato somministrato, intraperitonealmente (i.p), un'ora prima dell'induzione dell'ischemia ad una dose di 0.2 mg/kg. L'ICI 182 780, un antagonista puro del recettore per gli estrogeni, è stato disciolto in dimetilsolfossido al 4% ed è stato somministrato alla dose di 0.25 mg/Kg i.p, un'ora prima del 17-estradiolo.

Per gli studi sulla modulazione del sistema endocannabinoide da parte degli estrogeni, l'SR141716, antagonista del recettore cannabinoide CB1, è stato disciolto in olio vegetale ed è stato somministrato via i.p. ad una dose di 0.3mg/Kg, 15 minuti prima dell'induzione dell'occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo). L'agonista del recettore CB1, l'R-(+)-WIN55,212-2, è stato disciolto in glicole propilenico ed è stato somministrato via i.p. ad una dose di 1mg/Kg, 15 minuti prima dell'induzione dell'occlusione dell'arteria cerebrale media.

I ratti controllo hanno ricevuto lo stesso veicolo in cui sono stati disciolti i corrispondenti trattamenti farmacologici che è stato somministrato con le stesse modalità di questi ultimi. Tutte le procedure sperimentali sono state eseguite in

conformità alle linee guida del Consiglio Direttivo della Comunità Europea 86/609, compreso nel D.M. 116/1992 del Ministro Italiano della Salute.

2.2 - Ischemia cerebrale focale

L'ischemia focale temporanea è stata indotta per occlusione dell'arteria media cerebrale (MCAo) in ratti maschi adulti (280-300 g) del ceppo Wistar, stabulati in condizioni controllate di temperatura (22°C) e umidità (65%). I ratti sono stati inizialmente anestetizzati con isoflurano al 5% in aria; durante l'intervento chirurgico la percentuale di isoflurano è stata ridotta alle più basse concentrazioni (1.5-2%) necessarie per il mantenimento dell'anestesia. L'ischemia è stata indotta attraverso l'occlusione dell'arteria cerebrale media destra (MCAo), tramite l'utilizzo di un filamento intraluminale, mediante una tecnica relativamente non invasiva (*Longa et al., 1989*). Durante l'intervento la temperatura corporea è stata misurata attraverso un termometro rettale ed è stata mantenuta a 37°C mediante l'uso di un tappetino riscaldato. Con l'ausilio di uno stereomicroscopio, è stata eseguita una incisione a livello del collo, al fine di isolare le arterie carotidi interna ed esterna a livello della loro biforcazione dalla carotide comune (CCA). L'arteria carotide esterna (ECA) è stata recisa alla distanza di circa 3 mm dalla biforcazione carotidea; al suo interno è stato inserito un filamento di nylon siliconato (diametro 0,28 mm), delicatamente spinto a circa 18 mm dalla biforcazione carotidea fino ad incontrare una leggera resistenza che indica l'occlusione del punto di origine della MCA in corrispondenza del circolo di Willis (Figura 13). Il filamento è stato poi bloccato tramite un nodo con filo di seta per sutura sulla ECA, in prossimità della biforcazione carotidea per

impedire il sanguinamento della ferita. I ratti sham sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica senza l'occlusione della MCA.

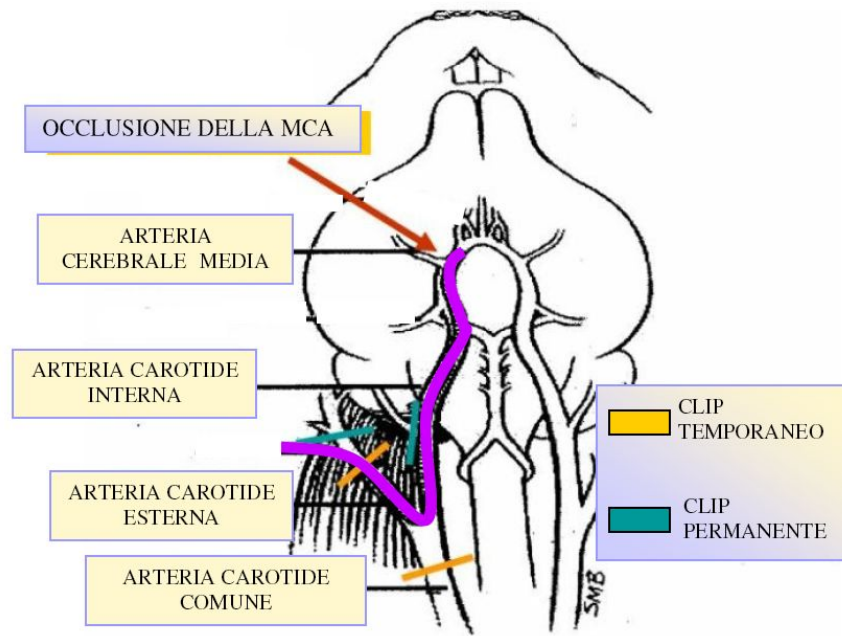


Figura 13. Occlusione dell'arteria cerebrale media (MCAo) tramite inserimento di un filamento intraluminale a partire dall'arteria carotide esterna.

Dopo aver chiuso la ferita, la somministrazione dell'isoflurano è stata sospesa per consentire il risveglio dell'animale. Un'ora dopo la chirurgia, è stata eseguita la valutazione del deficit neurologico tramite l'attribuzione di uno 'score': 0 = nessun deficit, 1 = mancata estensione della zampa anteriore sinistra, 2 = ridotta resistenza ad una spinta laterale, 3 = movimento rotatorio controlaterale, 4 = movimento solo a seguito di stimolazione, 5 = nessuna attività motoria spontanea. Solo i ratti con un chiaro deficit neuronale (≥ 3) sono stati inclusi nello studio. Dopo 2 ore di MCAo, gli animali sono stati brevemente rianestetizzati al fine di rimuovere il filamento e

consentire la ri-perfusione del tessuto cerebrale. Dopo la chiusura della ferita e il risveglio, i ratti sono stati trasferiti nelle gabbie con libero accesso a cibo e acqua.

2.3 - Neuropatologia e quantificazione del danno ischemico

Dopo 22 ore di ri-perfusione i ratti sono stati sacrificati, i cervelli prelevati rapidamente e sezionati ognuno in otto fettine coronali consecutive (spessore 2 mm) a partire dal polo frontale. Per valutare l'estensione del danno ischemico, le sezioni coronali cerebrali sono state incubate per 5 minuti a 37°C in una soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) sciolto in salina al 2%. Il TTC viene ridotto dalla succinico-deidrogenasi a formazano, un precipitato di colore rosso, per cui la colorazione rossa del tessuto rivela l'attività respiratoria delle cellule non ischemiche, mentre l'area non colorata corrisponde alla regione ischemica. Dopo incubazione in TTC le sezioni sono state fissate in formaldeide al 10% in tampone fosfato (PBS 0,01M) e conservate a 4°C prima di essere analizzate. Le immagini delle sezioni colorate con TTC sono state acquisite con uno scanner digitale e analizzate mediante l'ausilio di un programma computerizzato di analisi assistita dell'immagine (ImageJ 1.30v software). Il volume dell'area infartuata (mm³) è stato calcolato sommando l'area infartuata (porzione non colorata) delle otto sezioni e moltiplicando il valore ottenuto per lo spessore delle sezioni (2 mm) (*Li et al., 2000*).



$$\% \text{ edema} = \frac{(A + B) - C}{C} \times 100$$

A = volume porzione infartuata

B = volume porzione ipsilaterale non danneggiata

C = volume cerebrale controlaterale

2.4 - Analisi del sistema endocannabinoide

Per l'analisi del sistema endocannabinoide i ratti sono stati sacrificati, mediante decapitazione, a diversi tempi dalla MCAo; i cervelli sono stati rapidamente prelevati, lavati con tampone fosfato (PBS 0,01 M, pH=7.4 a 4°C) e, poi, adagiati su una piastra di Petri su ghiaccio per la dissezione delle cortecce e degli striati dell'emisfero destro (ischemico) e sinistro (non ischemico). I tessuti cerebrali così ottenuti sono stati immediatamente immersi in azoto liquido prima di essere trasferiti nel -80° C per i successivi studi.

2.4.1 - Determinazione dei livelli endogeni dell'AEA

Per la valutazione dei livelli endogeni dell'AEA le porzioni tissutali di corteccia e striato sono state omogenizzate con un UltraTurrax T25 (Stauffen, Germany) in un buffer di estrazione composto da: 50 mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7.4) e 1mM fluoruro di fenilmetanilsolfossido in un rapporto di omogeneizzazione di 1:10 (peso/volume). Dall'omogenato tissutale sono stati estratti i lipidi e la fase organica è stata, poi, fatta essiccare sotto azoto. I pellets così ottenuti sono stati risospesi in 20 µl

di metanolo, frazionati e successivamente analizzati mediante un sistema HPLC (High Performance Liquid Chromatography) con rivelatore fluorimetrico, come descritto da Wang et al. (2001). Per effettuare il frazionamento è stato usato il metodo di Lang et al. (1996) leggermente modificato, che prevede l'uso di un Sistema Gilson (Gilson Inc., Middleton, WI) provvisto di una pompa 305 e di un rivelatore 118 UV/Vis. La separazione è stata effettuata su una colonna impaccata con un TSK gel ODS 80TM (50x4.6 mm i.d. = 5 μ m) (TOSOH, Tokyo, Japan) con una soluzione eluente di acetonitrile ed acqua (8:2 v/v) ad una velocità di flusso di 1 ml/min. L'assorbimento è stato monitorato a 204 nm. L'eluato, contenente l'AEA che si lega selettivamente alle perline di Polimixin B immobilizzate sulla colonna, è stato disciolto in etanolo puro e separato mediante HPLC in fase inversa (Reverse-Phase HPLC). Le frazioni corrispondenti al tempo di eluizione dell'AEA (6.95 min.) sono state raccolte ed essiccate in azoto. Al fine di determinare i livelli di AEA mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico, le frazioni corrispondenti al tempo di eluizione dell'AEA, sono state derivatizzate disciogliendole in benzene anidro, secondo il metodo di Koga et al. (1995). Quindi, a 30 μ l della soluzione AEA-benzene-anidro, sono stati aggiunti 3 μ l di DBD-COCl (4-(N-cloroformilmetil-N-metil)amino-7-N,N-dimetilaminosulfonil-2,1,3-benzossazolo) saturato in benzene anidro ed il tutto è stato riscaldato a 60°C per 40 min (Fig 14).

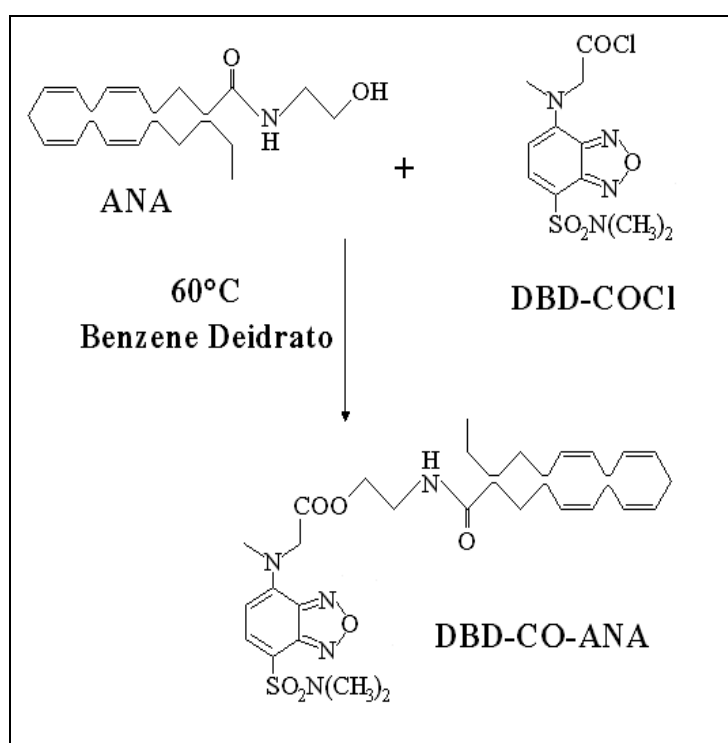


Figura 14 : Reazione di derivatizzazione dell'AEA. La reazione è terminata per aggiunta di 30 μ l di benzene contenente l'1% di acido acetico. La soluzione risultante è stata essiccata e concentrata mediante centrifugazione e successivamente diluita in 40 μ l di acetonitrile. Sono state, quindi, formate aliquote di 5 μ l ed ognuna è stata analizzata mediante HPLC, provvisto del rivelatore a fluorescenza S-3370 (Soma Optics, Ltd., Tokyo, Japan). La separazione è stata effettuata isocriticamente con una fase mobile di acetonitrile:acqua (8:2 v/v) ad una velocità di flusso di 1.0 ml/min. Il rivelatore fluorimetrico è stato settato a 560 nm e sottoposto ad eccitazione a 450 nm (Koga et al., 1995). Le concentrazioni di AEA sono state determinate mediante confronto con le curve di calibrazione costruite usando AEA sintetica.

2.4.2 - Determinazione dell'attività della FAAH

L'attività della FAAH è stata determinata misurando la quantità di acido arachidonico marcato rilasciato dall' [3 H]AEA 10 μ M mediante Cromatografia Liquida ad Alta pressione (HPLC) (Maccarrone et al., 1998). Gli omogenati tissutali di corteccia (penombra) e striato (core) (20 μ g per test) (Maurelli et al., 1995), ottenuti da ratti sottosti a 2h di MCAo, sono stati posti a reagire a 37°C con 5 μ l di AEA[H] 3 in 200 μ l di buffer F per 15 min. Trascorso tale tempo, la reazione è stata bloccata mediante

l'aggiunta di 800 µl di Metanolo/Cloroformio (2:1 v/v). La miscela è stata lasciata a reagire per altri 30 min a temperatura ambiente, dopodichè, sono stati aggiunti 240µl di cloroformio e 240µl di H₂O. Dopo 10 min. di reazione a T ambiente, la miscela è stata quindi centrifugata a 3000 g per 5 minuti ottenendo così: una fase acquosa, che è stata rimossa, e una fase organica che è stata prelevata e, poi, essiccata spinnando i campioni per 30 minuti in una DNA Mini speed vac (Heto-Holten, Denmark). I residui così ottenuti sono stati, infine, disciolti in 30 µl di metanolo ed analizzati all'HPLC per la quantificazione dell'acido arachidonico rilasciato dall' [³H]AEA. La separazione è stata eseguita su una colonna C18 che utilizza come fase mobile un gradiente ternario costituito da metanolo/ H₂O/acido Acetico (85/15/0.1, v/v/v). L'attività della FAAH è stata espressa come pmol Acido Arachidonico/min/mg prot.

2.4.3 - Determinazione dell'attività della NAPE-PLD

Al fine di valutare l'attività della fosfolipasi D, l'enzima di idrolisi della NArPE (N-acilfosfatidiletanolamina) (E.C. 3.1.4.4; NAPE-PLD), gli animali sono stati sacrificati mediante decapitazione ed i cervelli sono stati prelevati rapidamente e lavati con tampone fosfato (PBS 0,01 M, pH=7.4 a 4°C). Le porzioni tissutali di corteccia e striato ottenute dalla dissezione dei cervelli, sono state omogeneizzate a 4°C con un UltraTurrax T25 in 50 mM di Tris-HCl (pH 7.4) in un rapporto di omogeneizzazione di 1:10 (peso/volume). L'omogenato è stato aliquotato e conservato a -80°C. La concentrazione proteica dei campioni è stata misurata tramite il Metodo Bradford che si basa sull'azione del Comassie Brilliant Blue G-250, il quale lega i residui aminoacidici in forma anionica sviluppando massima assorbanza

a 595 nm. I valori finali di concentrazione sono stati poi ottenuti tramite interpolazione con una curva standard di albumina sierica bovina (BSA). L'attività enzimatica della NAPE-PLD è stata saggiata negli omogenati di cervello (50 µg/test) come descritto da Fezza et al. (2005). Gli omogenati tissutali sono stati incubati a 37°C con una miscela composta da 100 µM di [H]³NArPE in 100 µl di 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) contenente lo 0.1% di Triton X-100 (Okamoto et al., 2004). Dopo 30 minuti, la reazione è stata bloccata con 600 µl di metanolo/cloroformio (2:1 v/v); i campioni sono stati vortexati e centrifugati a temperatura ambiente, dopodiché, la fase organica del cloroformio è stata prelevata ed essiccata tramite una DNA Mini speed vac (Heto-Holten, Denmark) per 20 minuti, a 37°C e 100mbar (Maccarrone et al., 1999). Il pellet ottenuto è stato risospeso in 20 µl di metanolo e poi iniettato all'HPLC; in particolare, l'attività enzimatica della NAPE-PLD è stata misurata tramite un metodo radiocromatografico basato sull'HPLC a fase inversa accoppiata a conta scintillografica. Il principio su cui si basa tale metodica è la valutazione della quantità di [³H]AEA rilasciata ad opera della NAPE-PLD per idrolisi del precursore NArPE marcato con trizio. La separazione è stata eseguita con un gradiente ternario costituito da metanolo:acqua:acido acetico (85:14.9:0.1, v/v/v) come fase mobile su una colonna C18 (5 µm, 3.0x150 mm) (Waters, Milford, MA, USA). L'attività specifica (mg proteina/attività enzimatica) della NAPE-PLD è stata espressa come picomoli di [³H]AEA eluite al minuto per mg di proteina (pmol A.A./min/mg prot). La costante apparente di Michaelis-Menten (Km) e la velocità massima (Vmax) dell'enzima NAPE-PLD sono stati calcolati mediante un'analisi di regressione non-

lineare delle curve di saturazione usando il programma Prism 3 (GraphPAD Software for Science, San Diego, CA, USA).

2.4.4 - Determinazione del legame ai recettori CB1 e TRPV1

Gli studi di binding sono stati eseguiti su membrane ottenute dagli omogenati di corteccia e striato isolati come precedentemente descritto. Le membrane sono state sospese, alla concentrazione di 1 mg/ml di proteine, in tampone A (Tris-HCl 50 mM, Tris-EDTA 2 mM, MgCl 3mM, pH 7.4) e conservate a -80°C per non più di una settimana. Prima dell'analisi, i campioni sono stati scongelati e incubati (48 µg di proteine per saggio) in un volume finale di 0.5 ml di tampone B (Tris-HCl 50 mM, Tris-EDTA 2 mM, MgCl 3mM, BSA 5 mg/ml, pH 7.4) in presenza di [³H] CP55,940 (400 pM) o [³H]RTX (500 pM), agonisti rispettivamente del recettore CB1 e TRPV1. L'incubazione con il ligando radiomarcato è stata condotta per 1 ora a 30°C e poi interrotta tramite rapida filtrazione delle membrane previamente disposte su carta da filtro. I filtri lavati con tampone, sono stati poi trasferiti in provette contenenti 0.5 ml di Triton X-100 e 3.5 ml di liquido di scintillazione (LSC, OpticFluor, Canberra Packard) e lasciati incubare per tutta la notte prima di misurarne la radioattività. Il legame non specifico è stato determinato in presenza di AEA (10 µM) per i recettori CB1 e in presenza di capsazepina (1 µM) per i recettori vanilloidi. La costante apparente di Michaelis-Menten (Km) e il legame massimo (Bmax) sono stati calcolati mediante un'analisi di regressione non-lineare delle curve di saturazione usando il programma Prism 3 (GraphPAD Software for Science, San Diego, CA, USA).

2.5 - Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media \pm S.E.M. o media \pm S.D. La significatività statistica fra due gruppi sperimentali è stata valutata mediante il metodo non parametrico Mann-Whitney U-test oppure tramite il *t*-test di Student, mentre per più di due gruppi sperimentali è stata usata ANOVA seguita dal test di Tukey. I dati sperimentali sono stati elaborati usando il programma InStat 3 o, alternativamente, il programma Prism 3 (GraphPAD Software for Science, San Diego, CA). Le differenze sono state considerate statisticamente significative per valori di $p < 0.05$.

CAPITOLO 3 – RISULTATI

3.1 - Effetti del 17-βestradiolo sui livelli endogeni dell'AEA

Dopo due ore di occlusione dell'arteria cerebrale media abbiamo osservato un significativo aumento dei livelli endogeni dell'AEA nello striato ipsilaterale al danno ischemico ma non nella corteccia cerebrale ipsilaterale. Interessantemente, quando facevamo seguire le 2 h di MCAo da 1 h di riperfusione i livelli dell'AEA risultavano superiori a quelli rilevati nello striato dei ratti sottoposti a ischemia cerebrale senza riperfusione (Fig 15). È ormai noto che gli estrogeni proteggono il cervello dall'ischemia cerebrale focale (*Amantea et al., 2005*). Pertanto, al fine di verificare il ruolo del sistema endocannabinoide nella neuroprotezione esplicita dagli estrogeni in tale modello sperimentale abbiamo analizzato l'effetto del trattamento acuto con estradiolo sui livelli endogeni dell'AEA, sia nella corteccia che nello striato ischemici. I dati ottenuti hanno dimostrato che l'E₂ (0.20 mg/Kg i.p.) somministrato 1 h prima del MCAo revertiva in maniera significativa l'aumento dei livelli endogeni dell'AEA prodotti da 2h di ischemia cerebrale focale nello striato (Fig.15)

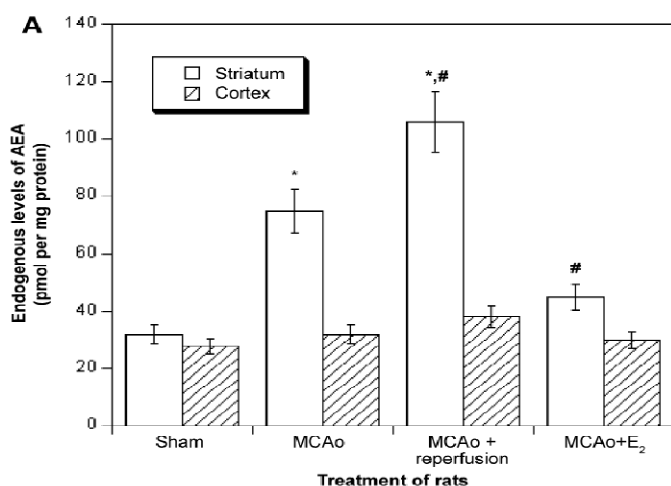
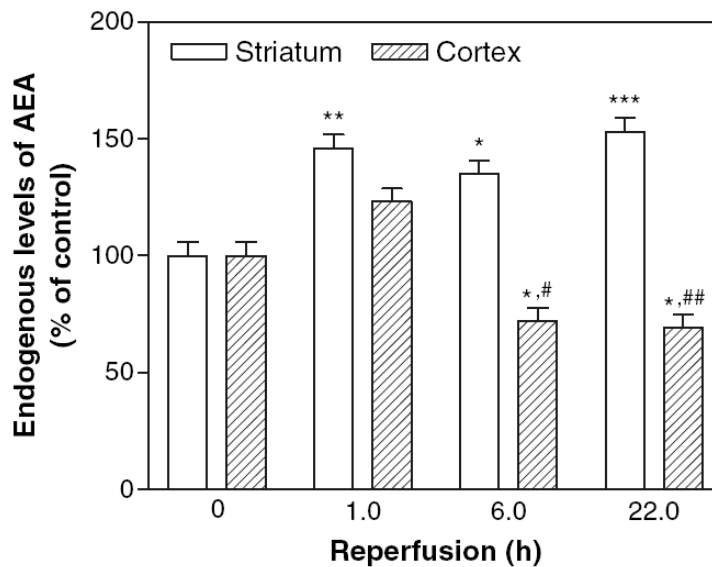


Figura 15. Livelli endogeni dell'AEA nello striato e nella corteccia ischemici di ratti sottoposti a 2h di MCAo seguita o non da 1h di riperfusione. I ratti sham sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica ma senza occlusione della MCA. E₂ (0.20 mg/Kg i.p) è stato somministrato un ora prima del MCAo. I valori sono espressi come media ± S.D (n=3) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test. *P < 0.01 verso Sham; #P < 0.01 verso MCAo; §P < 0.05 verso MCAo.

L'aumento dei livelli endogeni dell'AEA rilevato nello striato di ratti sottoposti a 2 h di MCAo risultava essere persistente anche a tempi superiori di riperfusione che seguivano le 2 h di MCAo. Al contrario, i livelli corticali di AEA, che non cambiavano significativamente dopo 1 h di riperfusione, erano significativamente ridotti dopo 6h o 22h di riperfusione (Fig. 16).



*Figura 16. Livelli endogeni dell'AEA nello striato ischemico e nella corteccia di ratti sottoposti a 2h di MCAo seguita da 0,1, 6 e 22h di riperfusione (100% di campioni della fig.1A). I valori sono espressi come media \pm S.D (n=3) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test. *P < 0.05, ** P < 0.001 verso 0h di riperfusione; # P < 0.01 e ##P < 0.001 verso 1h di riperfusione.*

Al fine di valutare se tale aumento dei livelli endogeni dell'AEA, conseguente all'occlusione della MCA, potesse contribuire al danno ischemico cerebrale oppure, al contrario, potesse essere un meccanismo endogeno neuroprotettivo, abbiamo analizzato l'effetto di antagonisti ed agonisti del recettore CB1 sul danno ischemico. Da questa analisi è risultato che, la somministrazione dell'antagonista del recettore CB1, SR141716 (3mg/Kg, i.p., 15 minuti prima del MCAo), provocava una riduzione

significativa del volume d'infarto cerebrale, misurato dopo 22h di ri-perfusione (Fig.17 A-C). Invece, il pretrattamento con l'agonista del recettore cannabinoide, R-(+)-WIN-55,212-2 (1mg/Kg, i.p., 15 minuti prima del MCAo), non influenzava in alcun modo il volume d'infarto cerebrale prodotto dalla transitoria occlusione della MCA (Fig. 17D).

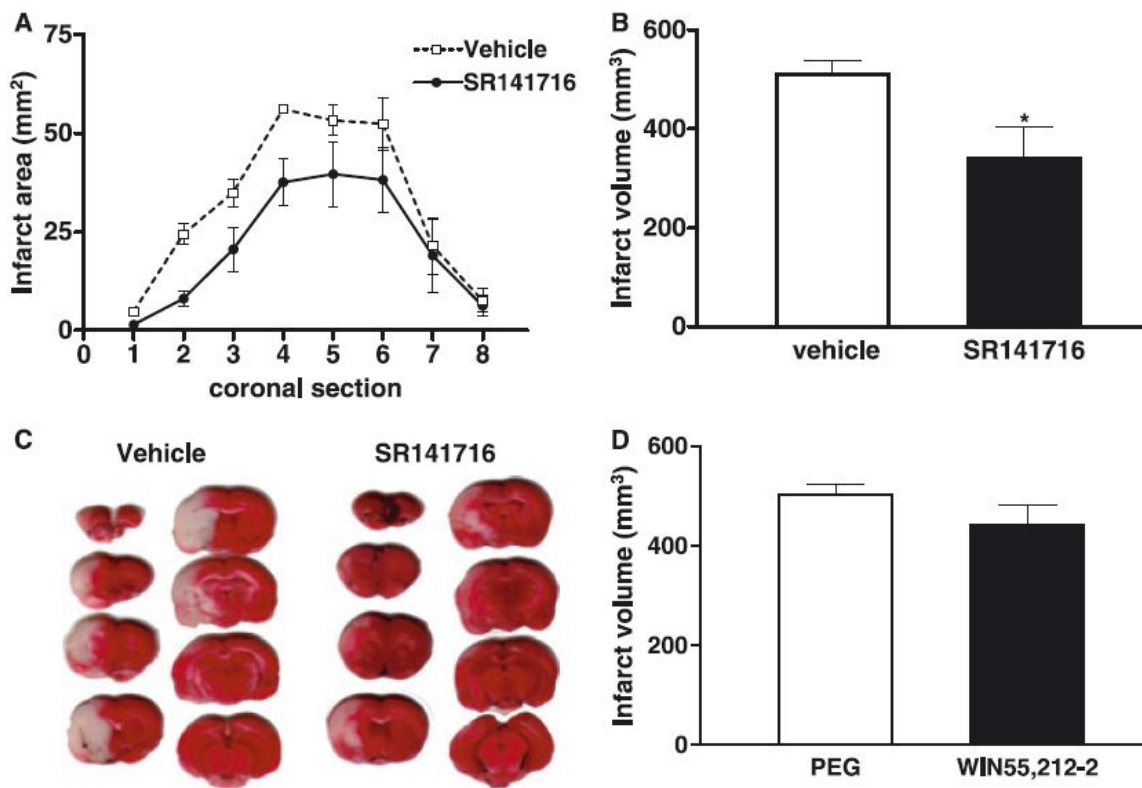
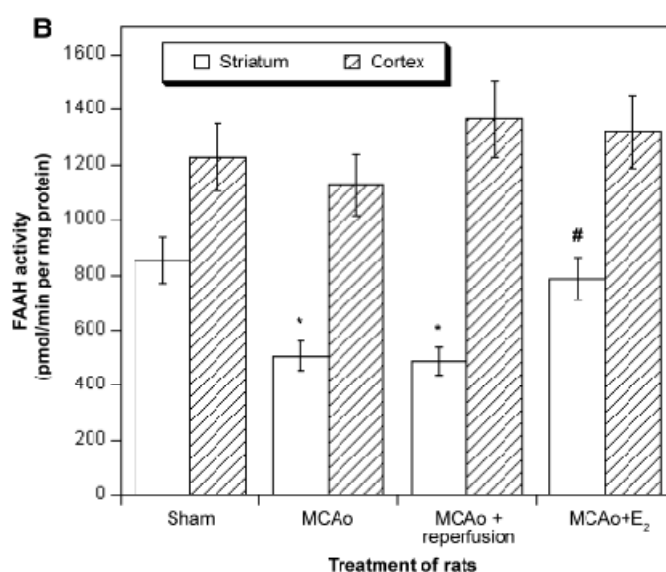


Figura 17. L'SR141716, antagonista selettivo del recettore CB1, ma non il WIN55,212-2, agonista del recettore CB1, riduce la dimensione dell'area d'infarto cerebrale conseguente a tMCAo. L'arteria cerebrale media destra è stata occlusa per 2 h con un filo di nylon per sutura ed il volume d'infarto cerebrale è stato misurato dopo 22h di ri-perfusione. I cervelli prelevati sono stati sezionati ognuno in otto fettine coronali consecutive (spessore 2 mm) a partire dal polo frontale e sono stati incubati in TTC, che conferisce colorazione rossa ai tessuti non ischemici ma non alle aree ischemiche.(C). Il volume dell'area infartuata è stato calcolato sommando l'area infartuata delle otto sezioni (A) e moltiplicando il valore ottenuto per lo spessore delle sezioni. I ratti hanno ricevuto il veicolo (olio vegetale n= 5) o l'SR141716 (3 mg/kg, n=4) i.p., 15 minuti prima del MCAo (A-C). In un altro set di esperimenti, i ratti hanno ricevuto il veicolo (propilenglicole, n=7) o il WIN55,212-2 (1 mg/kg) n=7) i.p., 15 minuti prima del MCAo (D). I risultati sono stati espressi come media \pm S.E.M e i valori sono stati paragonati tramite t-test. *P < 0.05 vs veicolo.

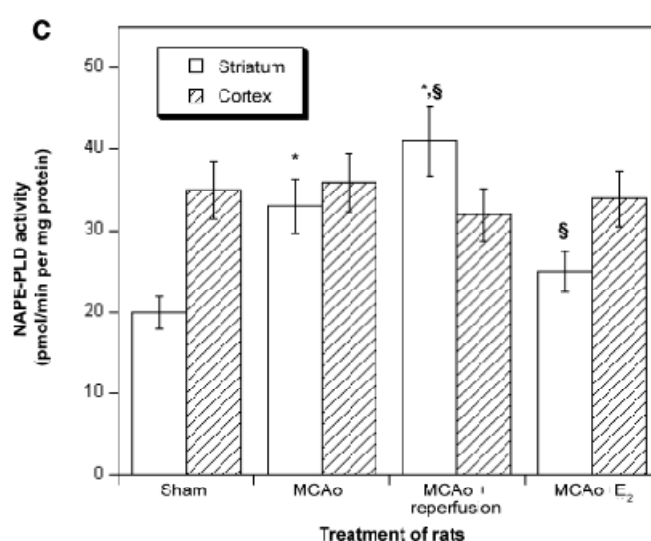
3.2 - Effetti del 17 β -estradiolo sull'attività della FAAH e della NAPE-PLD

Al fine di valutare se i cambiamenti nei livelli endogeni dell'AEA, ischemia-indotti, fossero associati ad un'alterazione del metabolismo degli endocannabinoidi abbiamo, quindi, misurato l'attività della FAAH, enzima responsabile della degradazione dell'endocannabinoide, e della NAPE-PLD, enzima addetto invece alla sintesi dell'AEA, nelle corteccie e negli striati di ratti sottoposti a ischemia cerebrale focale. Da quest'analisi è emerso che 2h di MCAo, seguita o non da 1 h di riperfusione, provocavano una significativa riduzione dell'attività della FAAH nello striato, ma non nella corteccia, ipsilaterale al danno ischemico (Fig. 18).



*Figura 18. Attività della FAAH nello striato e nella corteccia ischemici di ratti sottoposti a 2h di MCAo, seguita o non da 1h di riperfusione. I ratti sham sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica ma senza occlusione della MCA. E2 (0.20 mg/Kg i.p) è stato somministrato un ora prima del MCAo. I valori sono espressi come media \pm S.D (n=3) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test. *P < 0.01 verso Sham; #P < 0.01 verso MCAo; §P < 0.05 verso MCAo.*

Gli aumentati livelli dell'AEA nello striato ischemico erano associati, inoltre, ad un significativo incremento dell'attività della NAPE-PLD, misurata dopo 2 h di MCAo (Fig.19). Molto interessanti, il ripristino del flusso sanguigno per 1h, dopo le 2 h di ischemia, risultava in un più pronunciato aumento dell'attività della NAPE-PLD, rispetto all'attività enzimatica misurata in striati di ratti sottoposti a 2h di MCAo senza riperfusione (Fig.19).



*Figura 19. Attività della NAPE-PLD nello striato e nella corteccia ischemici di ratti sottoposti a 2h di MCAo, seguita o non da 1h di riperfusione. I ratti sham sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica ma senza occlusione della MCA. E₂ (0.20 mg/Kg i.p) è stato somministrato un ora prima del MCAo. I valori sono espressi come media ± S.D (n=3) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test. *P < 0.01 verso Sham; #P < 0.01 verso MCAo; §P < 0.05 verso MCAo.*

Al contrario, l'ischemia cerebrale focale sembrava non influenzare l'attività della NAPE-PLD nella corteccia cerebrale, e ciò era coerente con la mancanza di cambiamenti significativi nei livelli endogeni dell'AEA determinati nelle regioni ischemiche corticali (Fig.15).

Inoltre, l'attività della FAAH e della NAPE-PLD ritornavano ai livelli basali (Sham) quando ai ratti veniva somministrata una dose neuroprotettiva di E₂ (0.20 mg/Kg i.p.) 1 h prima della MCAo (Figure 18,19).

3.3 - Effetti del 17-βestradiolo sull'espressione e sul contenuto del recettore CB1 e della FAAH

Diversamente dal metabolismo degli endocannabinoidi, che appariva evidentemente modificato in seguito all'ischemia cerebrale focale, il contenuto di recettori CB1, determinato tramite tecnica ELISA, nelle corteccie e negli striati di ratti sottoposti a 2h di MCAo, non subiva nessun cambiamento, dopo le 2 h di ischemia seguita o non da 1 h di riperfusione (Fig. 20). Al contrario, il contenuto striatale dell'enzima metabolico FAAH veniva significativamente ridotto da 2 h di MCAo, con o senza 1 h di riperfusione (Fig. 20). Quest'ultimo dato è in accordo con la ridotta attività della FAAH che si osservava nello striato ischemico di ratti sottoposti a MCAo (Fig.18). Di notevole interesse è, inoltre, il fatto che sebbene l'ischemia cerebrale non alterava l'espressione del recettore cannabinoide CB1, il pre-trattamento con E2 provocava comunque una significativa riduzione (45%) del binding dell'AEA al recettore CB1 nello striato, ma non nella corteccia ipsilaterale al danno ischemico. Invece, il contenuto di recettore CB1 non era in alcun modo influenzato dal pre-trattamento con l'ormone estrogenico (Fig.20).

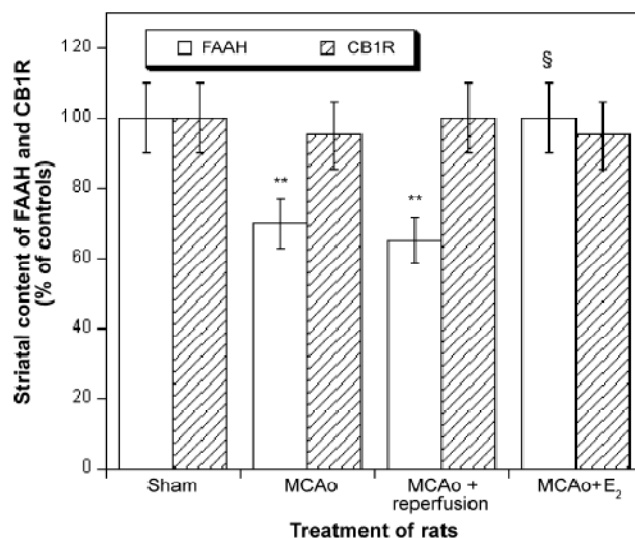


Figura 20. Contenuto di recettore CB1 e di FAAH misurato, tramite tecnica ELISA, nello striato di ratti sottoposti a 2h di MCAo, seguita o non da 1h di ri-perfusione. I ratti Sham sono stati sottoposti alla stessa procedura chirurgica senza l'occlusione della MCA. E₂(0.20mg/Kg, i.p.) è stato somministrato 1h prima della MCAo. I valori sono stati espressi come media \pm S.D (n=4) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test. **P < 0.05 verso Sham; §P < 0.05 verso MCAo.

3.4 - Gli effetti neuroprotettivi del 17 β -estradiolo sono ER mediati

Nel corso dei nostri studi, abbiamo rilevato, interessantiemente, che l'estradiolo non era in grado di modulare significativamente i livelli dell'AEA, della FAAH, della NAPE-PLD e del binding al recettore CB1, misurati nello striato di ratti sham, pre-trattati con l'E2 o con il veicolo, rispettivamente, 3 h prima del sacrificio (Tab.III). Ciò suggerisce, quindi, che le alterazioni neuropatologiche osservate nel sistema endocannabinoide, in seguito a MCAo, sono funzionali alla sua modulazione da parte degli estrogeni nell'ambito del loro meccanismo neuroprotettivo.

	Vehicle	E ₂
Endogenous AEA [pmol·(mg protein) ⁻¹]	35 ± 3	30 ± 9
FAAH activity [pmol·min ⁻¹ ·(mg protein) ⁻¹]	820 ± 80	884 ± 90
NAPE-PLD activity [pmol·min ⁻¹ ·(mg protein) ⁻¹]	22 ± 3	25 ± 3
CB1 receptor binding [fmol·(mg protein) ⁻¹]	190 ± 20	180 ± 20

Tab.III Effetto della somministrazione acuta di E2 sul sistema endocannabinoide in striati di ratti sham. I ratti sono stati trattati con E2 (0.20 mg /Kg, i.p) oppure con veicolo (olio vegetale, 1mL/Kg, i.p), 3 h prima dell'operazione sham. I valori sono stati espressi come media ± S.D (n=3) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test.

La modulazione del sistema endocannabinoide da parte dell'E₂ nello striato ischemico del ratto sembra coinvolgere l'attivazione del recettore intracellulare estrogenico (ERs), dal momento che la somministrazione di un antagonista specifico del recettore estrogenico di tipo α , l'ICI 182,780 (0.25 mg/Kg i.p, 1 h prima dell'E₂) si dimostrava in grado di antagonizzare, significativamente, gli effetti dell'E₂ (0.2 mg/Kg, i.p. 1 h prima del MCAo) sui livelli endogeni dell'AEA, sull'attività della FAAH e della NAPE-PLD e sul binding al recettore CB1 nello striato (Figura 21).

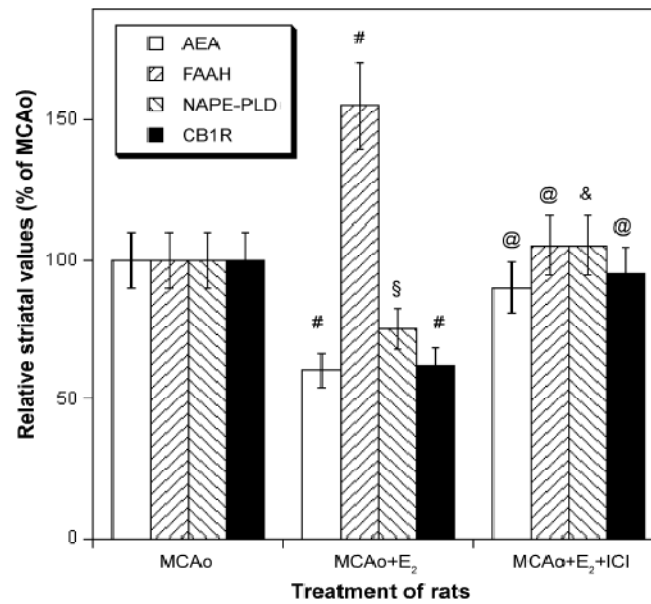


Figura 21. Gli effetti dell'E₂ sul sistema endocannabinoide nello striato di ratti sottoposti a MCAo sembrano essere mediati dall'attivazione del recettore estrogenico, E_α, dal momento che tali effetti sono tutti revertiti dalla somministrazione dell'ICI 182,780 (0.25 mg/Kg i.p, 1 h prima dell'E₂), antagonista puro del ER. I valori sono stati espressi come media ± S.D (n=4) e sono stati analizzati tramite Mann-Whitney U-test. #P < 0.01 verso MCAo, §P < 0.05 verso MCAo, @P < 0.01 versus MCAo + E₂; &P < 0.05 versus MCAo + E₂.

CAPITOLO 4 – DISCUSSIONE

I risultati mostrati in questo studio dimostrano che un insulto ischemico cerebrale di tipo focale, indotto tramite l'occlusione transitoria dell'arteria cerebrale media, determina un incremento significativo dei livelli di AEA nello striato ischemico (~3 volte maggiori del controllo; $P < 0.01$) ma non nella corteccia; tale incremento è accompagnato anche da un alterato metabolismo degli endocannabinoidi che è caratterizzato da un aumento dell'attività della FAAH, enzima metabolico, e da una riduzione dell'attività della NAPE-PLD. Interessantemente, abbiamo osservato che la riperfusione induceva un aumento dei livelli striatali di AEA maggiore rispetto a quello rilevato dopo le 2 h di MCAo senza riperfusione; ciò suggerisce, quindi, che il ripristino dell'apporto sanguigno, dopo un insulto ischemico, potrebbe contribuire alla modulazione del sistema endocannabinoide. Quest'ultima ipotesi è supportata anche dall'evidenza che l'incremento nell'attività della NAPE-PLD risulta più pronunciato, quando le 2 h di MCAo sono fatte seguire da 1 h di riperfusione, comparato con l'attività enzimatica misurata dopo la sola MCAo. Pertanto, possiamo supporre che il precoce incremento dei livelli endogeni dell'AEA osservato nello striato, che comprende la maggior parte del core ischemico (*Memezawa et al., 1992*), possa rappresentare un importante meccanismo che sta alla base del danno cerebrale prodotto dall'ischemia focale. Questo effetto, inoltre, sembra coinvolgere l'attivazione dei recettori per i cannabinoidi dal momento che il pretrattamento con un antagonista del recettore CB1, l'SR141716, conferisce neuroprotezione in ratti sottoposti ad una transitoria occlusione dell'arteria cerebrale media. Il precoce

innalzamento dei livelli dell'AEA era stato già precedentemente riportato nell'intero cervello di ratti in seguito a ischemia cerebrale focale transitoria (*Muthian et al., 2004*); in tale studio, però, non era stata data alcuna informazione nè sulle alterazioni indotte dall'insulto ischemico nelle differenti regioni cerebrali, nè sui possibili effetti della MCAo sui livelli endogeni dell'AEA. L'incremento dei livelli endogeni dell'AEA che noi abbiamo osservato nello striato ischemico non si verifica, invece, nella corteccia cerebrale di ratti sottoposti a MCAo. L'assenza di cambiamenti dei livelli corticali degli endocannabinoidi può essere spiegato dalla diversa suscettibilità che le differenti aree cerebrali hanno verso l'insulto ischemico; probabilmente, le 2h di MCAo non sono sufficienti a produrre nella regione di penombra lo stesso aumento significativo nei livelli di AEA che si verifica, invece, nel core ischemico.

È ormai noto, dalla letteratura, che i livelli endogeni dell'AEA sono incrementati in seguito a diversi tipi di danno cerebrale che comprendono: l'ischemia indotta da decapitazione (*Schmid et al., 1995*), l'eccitotossicità "in vivo" NMDA-indotta (*Hansen et al., 2001*), l'eccitazione neuronale indotta dal kainato (*Marsicano et al., 2003*) e, più notoriamente, l'occlusione dell'arteria cerebrale media (*Muthian et al., 2004*). È stato suggerito, perciò, che questo aumento dell'AEA associato al danno ischemico possa rappresentare un possibile meccanismo neuroprotettivo nei confronti del danno ischemico nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) (*Mechoulam et al., 2002*). Nonostante sia stato dimostrato che la somministrazione per via esogena di endocannabinoidi sia in grado di proteggere i neuroni attraverso vari meccanismi, ancora, il ruolo degli endocannabinoidi rilasciati per via endogena sul danno

neuronal è oggetto di ipotesi controverse (*Van der Stelt & Di Marzo, 2005*). Infatti, recenti studi hanno paradossalmente suggerito che gli endocannabinoidi rilasciati endogenamente possono essere tossici per i neuroni in modelli animali di neurodegenerazione acuta. In accordo con ciò, è stato osservato che la somministrazione di un antagonista del recettore cannabinoide CB1, l'SR141716, è in grado di conferire una significativa risposta neuroprotettiva in ratti adulti sottoposti ad occlusione della MCA sia permanente che transitoria (*Berger et al., 2005, Muthian et al., 2004*). Questo è concorde con i nostri dati, i quali dimostrano che la somministrazione sistemica di un antagonista del recettore cannabinoide CB1, l'SR141716, determina una significativa riduzione del volume d'infarto cerebrale indotto tramite MCAo, suggerendo così che gli aumentati livelli di AEA osservati durante le prime fasi dell'insulto ischemico cerebrale possono innescare una serie di eventi neurodegenerativi attraverso l'attivazione dei recettori CB1.

I recettori CB1 sono localizzati prevalentemente sulle terminazioni nervose presinaptiche, e la loro stimolazione può indurre sia effetti inibitori, attraverso il blocco del rilascio di glutammato, che effetti eccitatori attraverso il blocco del rilascio di acido 4-aminobutirrico (GABA), a seconda dei circuiti neuronali che vengono attivati (*Howlett et al., 2004, Shlicker & Kathmann 2001*). Infatti, se da un lato l'inibizione del rilascio di glutammato è stato suggerito rappresentare un meccanismo cruciale nella neuroprotezione mediata dagli endocannabinoidi (*Nagayama et al., 1999, Ameri et al., 1999*), dall'altra parte, la riduzione, CB1-indotta, dell'effetto

inibitorio GABAergico nello striato (*Centonze et al., 2004*) potrebbe al contrario rappresentare un meccanismo alla base della neurodegenerazione.

Di notevole interesse è il fatto che, a dispetto del danno neuronale acuto che si verifica nello striato ischemico di ratti in seguito a MCAo, nelle nostre condizioni sperimentali abbiamo osservato che né l'espressione del recettore CB1 né la capacità di binding al ligando, vengono compromesse. Pertanto, sebbene non si possa escludere che l'AEA svolga la sua azione neurotossica attraverso l'attivazione di targets molecolari diversi dal recettore CB1, i nostri dati conducono tutti all'idea che la sua azione neurotossica sia mediata dall'attivazione del recettore CB1 dal momento che il blocco del recettore con l'antagonista CB1, SR141716, riduce significativamente il volume d'infarto cerebrale indotto dalla MCAo.

Gli aumentati livelli di N-aciletanolamine osservato in seguito ad un danno cerebrale, è stato suggerito possa dipendere dall'accumulo dei corrispondenti precursori NAPE (*Hansen et al., 2001, Berger et al., 2004*). Nel seguente lavoro abbiamo osservato che, parallelamente agli aumentati livelli di AEA, si ha un incremento significativo dell'attività dell'enzima addetto alla sintesi dell'AEA, NAPE-PLD, e una riduzione dell'attività e dell'espressione dell'enzima idrolizzante l'AEA, FAAH. Quindi, ciò lascia supporre che l'accumulo di AEA endogena che si osserva durante l'ischemia cerebrale focale può derivare da uno specifico meccanismo che coinvolge l'alterato metabolismo degli endocannabinoidi.

È ormai accettato che gli estrogeni proteggono il cervello dal danno indotto dall'ischemia focale (*Amantea et al., 2005*). Allo stato attuale non ci sono, però,

informazioni sulla possibile modulazione del sistema endocannabinoide da parte dell'E2 nel cervello in particolari condizioni neuropatologiche.

Nel presente lavoro di tesi, abbiamo dimostrato che la somministrazione di una dose farmacologica di E2 in ratti maschi adulti previene l'incremento dei livelli endogeni di AEA prodotto nello striato dalla MCAo, effetto che sembra essere mediato dalla modulazione sia della NAPE-PLD che della FAAH. Infatti, l'attività di entrambi gli enzimi raggiunge valori basali (Sham) quando ai ratti viene somministrata una dose neuroprotettiva dell'ormone. Il pretrattamento con l'E2 riduce, inoltre, anche la capacità di binding dell'AEA al recettore CB1 nello striato ischemico suggerendo che questo possa contribuire alla neuroprotezione riducendo la capacità dei cannabinoidi endogeni di evocare risposte CB1-mediate. In tale lavoro riportiamo, anche, l'osservazione originale che l'E2 incrementa l'attività della FAAH e riduce quella della NAPE-PLD attraverso un meccanismo ER-dipendente dal momento la somministrazione di un antagonista puro del recettore estrogenico ER α , l'ICI 182 780, è in grado di revertire tutti gli effetti dell'ormone sul sistema endocannabinoide. In conclusione, il seguente studio dimostra che l'ischemia cerebrale focale, prodotta dalla occlusione transitoria della MCAo, determina una modulazione significativa del sistema endocannabinoide, che si verifica precocemente dopo 2 h dall'induzione del danno, e che continua poi anche durante i primi stadi di riperfusione dello striato ischemico. La down regulation dell'attività della FAAH e l'upregulation dell'attività della NAPE-PLD che si osserva nello striato ischemico provocano complessivamente

un incremento dei livelli endogeni dell'AEA, che a sua volta gioca un ruolo fondamentale nella fisiopatologia del danno che si verifica nel cervello ischemico.

Di notevole interesse è, però, la scoperta che i possibili effetti neurotossici provocati dall'incremento dei livelli endogeni dell'AEA, indotti dalla MCAo, possono essere bloccati in maniera significativa dal 17β -estradiolo probabilmente attraverso un meccanismo ER dipendente. Quindi, questo studio, documenta per la prima volta la capacità degli estrogeni di modulare il sistema endocannabinoide nel cervello, sotto particolari condizioni patologiche quali l'ischemia cerebrale, suggerendo la possibilità di una sua azione cruciale nella neuroprotezione, ormone-mediata, dopo un danno di tipo ischemico.

Elenco delle pubblicazioni e delle comunicazioni a congressi

AMANTEA D. , SPAGNUOLO P. , BARI M. , FEZZA F. , MAZZEI C. , TASSORELLI C. , MORRONE L. A. , CORASANITI M. T. , MACCARRONE M. , BAGETTA G. Modulation of the endocannabinoid system by focal brain ischemia in the rat is involved in neuroprotection afforded by 17beta-estradiol. *FEBS J*, 2007, Vol. 274, n. 17, pp. 4464-4775.

AMANTEA D. , MAZZEI C. , SPAGNUOLO P. , BARI M. , BAGETTA G. , CORASANITI M. T. , MACCARRONE M. Modulation of the endocannabinoid system is implicated in the neuroprotection afforded by 17beta-estradiol (E2) against brain damage caused by transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in rat". Atti del convegno 5th Forum of European Neuroscience", Vienna, Austria, 8-12 July, 2006, 2006, Vol. 3, pp. A237.1-

MAZZEI C. , AMANTEA D. , SPAGNUOLO P. , BARI M. , BAGETTA G. , CORASANITI M. T. , MACCARRONE M. Modulation of the endocannabinoid system is implicated in the neuroprotection afforded by 17beta-estradiol (E2) against brain damage caused by transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in rat". Contributo a IX WORKSHOP ON APOPTOSIS IN BIOLOGY AND MEDICINE: Neuroinflammation in neuronal death and repair, Parghelia (VV), 13-16 Settembre 2006.

MAZZEI C. , FEZZA F. , GASPERI V. , MACCARRONE M. Radiochromatographic assay of N-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D activity". *Analytical biochemistry : methods in the biological sciences*, NuovaSerie, 2005, Vol. 339, n. 1, pp. 113-120.

AMANTEA D. , MAZZEI C. , BARI M. , SPAGNUOLO P. , PASQUARIELLO N. , CORASANITI M. T. , BAGETTA G. , MACCARRONE M. Neuroprotection afforded by 17beta-estradiol in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion implicates modulation of fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity". Atti del convegno "British Pharmacological Society Winter Meeting", London (UK), 20-22 December, 2005,

2005, Vol. 3(4), pp. 164P-

AMANTEA D. , MAZZEI C. , PELLE C. , BARI M. , GASPERI V. , CORASANITI M. T. , MACCARRONE M. , BAGETTA G. Evidence to implicate the endocannabinoid system in the neuroprotection afforded by 17-beta-estradiol in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion". Contributo a VIII Workshop on Apoptosis in Biology and Medicine: Plasticity in pain and death, Hotel Porto Pirogòs- Parghelia (VV), 25-26 Maggio 2005.

FEZZA F. , SPAGNUOLO P. , MAZZEI C. , MACCARRONE M. Radiochromatographic assay of N-Acyl-phosphatidyl ethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD) activity". Atti del convegno "Second European workshop on cannabinoid research", Busto Arsizio (Va), 28-29 Aprile, 2005, 2005, pp. –

MACCARRONE M. , BARI M. , MAZZEI C. , FINAZZI AGRO A. Differential regulation of the FAAH promoter in the human neuroimmune axis". Contributo a First International Porto Pirogòs Conference on Advances in Neuroscience, Hotel Porto Pirogòs- Parghelia (VV), 22-25 Settembre 2004.

BIBLIOGRAFIA

- AGRATI P, GARNIER M, PATRONE C, POLLIO G, SANTAGATI S, VEGETO E. & MAGGI A. (1997). SK-ER3 neuroblastoma cells as a model for the study of estrogen influence on neural cells. *Brain Res. Bull.* **44**, 519-523.
- ALBERS G.W., GOLDBERG M.P. & CHOI D.W. (1989). N-methyl-D-aspartate antagonist: ready for clinical trial in brain ischemia? *Ann. Neurol.* **25**, 398-403.
- ALBERTS G.W., AMARENCO P., EASTON J.D., SACCOR.L. & TEAL P. (2001). Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Chest* **119**, 300S-320S.
- ALKAYED NJ, GOTO S, SUGO N, JOH H-D, KLAUS J, CRAIN BJ, BERNARD O, TRAYSTMAN RJ & HURN PD. (2001). Estrogen and Bcl-2: gene induction and effect of transgene in experimental stroke. *J Neurosci*; **21**:7543–50.
- AMANTEA D., RUSSO R., BAGETTA G. & CORASANITI M.T. (2005a). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacol. Res.* **52**, 119-132.
- AMERI A, WILHELM A & SIMMET T. (1999) Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* **126**, 1831–1839.
- ANURADHA P, KHAN SM, KARTHIKEYAN N. & THAMPAN RV. (1994). The nonactivated estrogen receptor (naER) of the goat uterus is a tyrosine kinase. *Arch Biochem Biophys.* **309**(2):195-204.
- ARREAZA G. & DEUTSCH DG. (1999). Deletion of a proline-rich region and a transmembrane domain in fatty acid amide hydrolase. *FEBS Lett.* **2**;454(1-2):57-60.

- AZCOITA I, SIERRA A. & GARCIA-SEGURA LM. (1999). Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J Neurosci Res*; **58**:815–22.
- AZCOITIA I, SIERRA A. & GARCIA-SEGURA LM. (1998). Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport*; **9**(13):3075-9.
- BAGETTA G., CHIAPPETTA O., AMANTEA D., IANNONE M., ROTIROTI D., COSTA A., NAPPI G. & CORASANITI M.T. (2004) Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci Lett* **368**, 87-91.
- BARRETT-CONNOR E. & KRITZ-SILVERSTEIN D. (1993) Estrogen replacement therapy and cognitive function in older women. *J Am Med Assoc* **269**, 2637-2641.
- BEAULIEU, P., BISOGNO, T., PUNWAR, S., FARQUHAR-SMITH, W. P., AMBROSINO, G., DI MARZO, V. & RICE, A. S. C. (2000). Role of the endogenous cannabinoid system in the formalin test of persistent pain in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **396** :85-92.
- BEHL C., SKUTELLA T., LEZOUALCH F., POST A., WIDMANN M., NEWTON C.J. & HOLSBOER F. (1997) Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol.*, **51**, 535-541.
- BEHL C. & HOLSBOER F. (1999). The female sex hormone estrogen as a neuroprotectant. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 441-444.
- BELCREDITO S, VEGETO E, BRUSADELLI A, GHISLETTI S, MUSSI P, CIANA P. & MAGGI A. (2001) Estrogen neuroprotection: the involvement of the Bcl-2 binding protein BNIP2. *Brain Res Brain Res Rev*; **37**(1-3):335-42.
- BELTRAMO M, DE FONSECA FR, NAVARRO M, CALIGNANO A, GORRITI MA, GRAMMATIKOPOULOS G, SADILE AG, GIUFFRIDA A. & PIOMELLI D.

- (2000) Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci.*; **20**(9):3401-7.
- BERGER C, SCHMID P, SCHABITZ W-R, WOLF M, SCHWAB S & SCHMID HH (2004) Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem.*, **88**, 1159–1167.
 - BERRENDERO, F., SEPE, N., RAMOS, J. A., DI MARZO, V. & FERNANDEZ-RUIZ, J. J. (1999). Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain and early postnatal period. *Synapse*, **33**: 181-191.
 - BHAT RV, SHANLEY J, CORRELL MP, FIELES WE, KEITH RA, SCOTT CW & LEE CM. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **97**(20):11074-9.
 - BI R, BROUTMAN G, FOY MR, THOMPSON RF & BAUDRY M. (2000) The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **97**(7):3602-7.
 - BICKNELL RJ. (1998) Sex-steroid actions on neurotransmission. *Curr Opin Neurol*; **11**:667–71.
 - BIDAUT-RUSSELL M, DEVANE WA & HOWLETT AC. (1990) Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem.*; **55**(1):21-6.
 - BISOGNO T., MELCK D., DE PETROCELLIS L. & DI MARZO V. (1999). Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells. *J Neurochem.* **72**: 2113-2119.

- BISOGNO T., SEPE N., MELCK D., MAURELLI S., DE PETROCELLIS L. & DI MARZO V. (1997). Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J.* **322**: 671-677.
- BLANCHET PJ, FANG J, HYLAND K, ARNOLD LA, MOURADIAN MM & CHASE TN. (1999) Short-term effects of high-dose 17beta-estradiol in postmenopausal PD patients: a crossover study. *Neurology.*, **53**(1):91-5.
- BLUM-DEGEN D, HAAS M, POHLI S, HARTH R, ROMER W, OETTEL M, RIEDERER P & GOTZ ME. (1998). Scavestrogens protect IMR 32 cells from oxidative stress-induced cell death. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **152**(1):49-55.
- BOGDANOV MB, FERRANTE RJ, MUELLER G, RAMOS LE, MARTINOU JC & BEAL MF. (1999) Oxidative stress is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *Neurosci Lett*; **262**:33–6.
- BOUABOULA M, POINOT-CHAZEL C, BOURRIÉ B, CANAT X, CALANDRA B, RINALDI-CARMONA M, LE FUR G & CASELLAS P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor *Biochem J.*; **312** (Pt 2):637-41.
- BRINTON RD. (2004) Impact of estrogen therapy on Alzheimer's disease: a fork in the road? *CNS Drugs.*; **18**(7):405-22.
- BRUCE-KELLER AJ, KEELING JL, KELLER JN, HUANG FF & CAMONDOLA S, MATTSON MP. (2000). Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*; **141**:3646–56
- CADAS, H., GAILLET, S., BELTRAMO, M., VENANCE, L. & PIOMELLI, D. (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J. Neurosci.* **16**, 3934–3942.

- CANTLEY LC. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*; **296**(5573):1655-7.
- CARDONA-GOMEZ GP, MENDEZ P & GARCIA-SEGURA LM. (2002) Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res.*; **107**(1):80-8.
- CARDONA-GOMEZ P, PEREZ M, AVILA J, GARCIA-SEGURA LM & WANDOSELL F. (2004) Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and betacatenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci.*; **25**(3):363-73.
- CASTELLANO, C., CABIB, S., PALMISANO, A., DI MARZO, V. & PUGLISI-ALLEGRA S. (1997). The effects of anandamide on memory consolidation in mice involve both D1 e D2 dopamine receptors. *Behavioural Pharmacology*, **8**: 707-712.
- CENTONZE D, BATTISTA N, ROSSI S, MERCURI NB, FINAZZI- AGRO` A, BERNARDI G, CALABRESI P & MACCARRONE M (2004) A critical interaction between dopamine D2 receptors and endocannabinoids mediates the effects of cocaine on striatal GABAergic transmission. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1488–1497.
- CHEN J., ZHANG Z.G., LI Y., WANG Y., WANG L., JIANG H., ZHANG C., LUM., KATAKOWSKI M., FELDKAMP C.S. & CHOPP M. (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol* **53**, 743–751.
- CHOI DW. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.*; **18**(2):58-60.
- COHEN P. & FRAME S. (2001) The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; **2**(10):769-76.

- COLLIN, C., DEVANE, W. A., DAHL, D., LEE, C. J., AXELROD, J. & ALKON, D. L. (1995). Long-term synaptic transformation of hippocampal CA1 gamma-aminobutyric acid synapses and the effect of anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 10167-10171.
- COTA D. & WOODS SC. (2005) The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.*; **12**:338-351.
- COWLEY SM & PARKER MG. (1999) A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; **69**(1-6):165-75.
- CRAVATT, B. F., GIANG, D. K., MAYFIELD, S. P., BOGER, D. L., LERNER, R. A. & GILULA, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.*, **384**: 83-87.
- CROSS DA, ALESSI DR, COHEN P, ANDJELKOVICH M. & HEMMINGS BA. (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*; **378**(6559):785-9.
- CYR M, CALON F, MORISSETTE M, DI PAOLO T. (2002) Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Psychiatry Neurosci.*; **27**(1):12-27.
- DE PETROCELLIS L, CASCIO MG & DI MARZO V. (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol.*, **141**:765-774.
- DEL ZOPPO G., GINIS I., HALLENBECK J.M., IADECOLA C., WANG X. & FEUERSTEIN G.Z. (2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol.* **10**, 95-112.
- DEMUTH DG & MOLLEMAN A. (2006) Cannabinoid signaling. *Life Sci.*; **78**:549-563.

- DENTON RR, KOSZEWSKI NJ & NOTIDES AC. (1992) Estrogen receptor phosphorylation. Hormonal dependence and consequence on specific DNA binding. *J Biol Chem.*; **267**(11):7263-8.
- DESAGHER S. & MARTINOU JC. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **10**:369–77.
- DEUTSCH DG, GLASER ST, HOWELL JM, KUNZ JS, PUFFENBARGER RA, HILLARD CJ & ABUMRAD N. (2001). The cellular uptake of anandamide is coupled to its breakdown by fatty-acid amide hydrolase. *J Biol Chem.*; **276**(10):6967-73.
- DEVANE, W. A. & AXELROD, J. (1994). Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous ligand for the cannabinoid receptor, by brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 6698-6701.
- DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A & MECHOULAM R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–1949.
- DI MARZO V, BIFULCO M & DE PETROCELLIS L. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 771–784.
- DI MARZO V, BISOGNO T, SUGIURA T, MELCK D & DE PETROCELLIS L. (1998). The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J.*; **331** (Pt 1):15-9.
- DI MARZO V. & MATIAS I. (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci.*; **8**(5):585-589.

- DI MARZO V., BERRENDERO F., BISOGNO, T., GONZALES S., CAVALIERE P., ROMERO J., CEBEIRA M., RAMOS J. A. & FERNANDEZ-RUIZ J. J. (2000). Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta-9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J. Neurochem.*, **74**: 1627-1635.
- DI MARZO V., DE PETROCELLIS L., BISOGNO T. & MELCK, D. (1999). Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids*, **34**: S319-325.
- DI MARZO V., HILL M. P., BISOGNO T., CROSSMAN A. R. & BROTCHE J. M. (2000). Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.*, **14**: 1432-1438.
- DI MARZO V., MELCK D., BISOGNO T. & DE PETROCELLIS L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.*, **21**: 521-528.
- DLUZEN DE, MCDERMOTT JL & LIU B. (1996) Estrogen alters MPTP-induced neurotoxicity in female mice: effects on striatal dopamine concentrations and release. *J Neurochem*; **66**:658–66.
- DLUZEN DE. (2000) Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol.*; **29**(5-6):387-99.
- DUBAL DB, SHUGHRUE PJ, WILSON ME, MERCHENTHALER I, WISE PM. (1999) Estradiol modulates Bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptor. *J Neurosci*; **19**:6385–93.
- DUENAS M, TORRES-ALEMAN I, NAFTOLIN F, GARCIA-SEGURA LM. (1996) Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience.*; **74**(2):531-9.

- FELDER CC, BRILEY EM, AXELROD J, SIMPSON JT, MACKIE K & DEVANE WA. (1993) Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **90**(16):7656-60.
- FELDER, C. C., NIELSEN, A., BRILEY, E. M., PALKOVITS, M., PRILLER, J., AXELROD, J., NGUYEN, D. N., RICHARDSON, J. M., RIGGIN, R. M., KOPPEL, G. A., PAUL, S.M. & BECKER, G.W. (1996). Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.*, **393**: 231-235.
- FERNANDEZ-GALAZ MC, MORSCHL E, CHOWEN JA, TORRES-ALEMAN I, NAFTOLIN F & GARCIA-SEGURA LM. (1997) Role of astroglia and insulin-like growth factor-I in gonadal hormone dependent synaptic plasticity. *Brain Res Bull*; **44**:525–31.
- FERNANDEZ-GALAZ MC, NAFTOLIN F & GARCIA-SEGURA LM. (1999) Phasic synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle depends on insulin like growth factor-I receptor activation. *J Neurosci Res*; **55**:286–92.
- FERNANDEZ-RUIZ, J. J., MUNOZ, R. M., ROMERO, J., VILLANUA, M. A., MAKRIYANNIS, A. & RAMOS, J. A. (1997). Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: evidence for the presence of CB1 receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem. Pharmacol.*, **53**: 1919-1927.
- FRICK KM, FERNANDEZ SM & BULINSKI SC. (2002) Estrogen replacement improves spatial reference memory and increases hippocampal synaptophysin in aged female mice. *Neuroscience.*; **115**(2):547-58.

- FRIDE, E. & MECHOULAM, R. (1993). Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur. J. Pharmacol.*, **231** : 313-314.
- FUKUNAGA K. & MIYAMOTO E. (1998) Role of MAP kinase in neurons. *Mol Neurobiol.*; **16**(1):79-95.
- GAONI Y. & MECHOULAM, R. (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646–1647.
- GARCIA-SEGURA LM, AZCOITIA I & DON CARLOS LL. (2001) Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*; **63**:29–60.
- GARCIA-SEGURA LM, CARDONA-GOMEZ F, NAFTOLIN F & CHOWEN JA. (1998) Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *NeuroReport*; **9**:593–7.
- GARCIA-SEGURA LM, WOZNIAK A, AZCOITIA I, RODRIGUEZ JR, HUTCHISON RE & HUTCHISON JB. (1999) Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience.*; **89**(2):567-78.
- GARDNER, E. L. & VOREL, S. R. (1998). Cannabinoid transmission and reward-related events. *Neurobiol. Dis.*, **5**: 502-533.
- GERDEMAN GL, RONESI J & LOVINGER DM. (2002). Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci.*; **5**(5):446-51.
- GIBBS RB & GABOR R. (2003) Estrogen and cognition: applying preclinical findings to clinical perspectives. *J Neurosci Res.*; **74**(5):637-43.

- GIBBS RB. (1999) Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res*; **844**:20–7.
- GIUFFRIDA, A., PARSONS, L.H., KERR, T. M., RODRIGUEZ, DE FONSECA, F., NAVARRO, M. & PIOMELLI, D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signalling in dorsal striatum. *Nature Neurosci.* **2**: 358-363.
- GLASS, M., BROTHIE, J. M. & MANEUF, Y. P. (1997). Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia. *Eur. J. Pharmacol.*, **9** : 199-203.
- GOLLAPUDI L & OBLINGER MM. (1999b) Estrogen and NGF synergistically protect terminally differentiated, ER α -transfected PC12 cells from apoptosis. *J Neurosci Res.*; **56**(5):471-81.
- GOLLAPUDI L & OBLINGER MM. (1999a). Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ER α): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J Neurosci Res*; **56**:99–108.
- GONZALES S., MANZANARES J., BERRENDERO F., WENGER T., CORCHERO J., BISOGNO T., ROMERO J., FUENTES J.A., DI MARZO V., RAMOS J.A. & FERNANDEZ-RUIZ J.J. (1999). Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology*, **70**: 137-145.
- GOODENOUGH S, SCHAFER M, BEHL C. (2003) Estrogen-induced cell signalling in a cellular model of Alzheimer's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.*; **84**(2- 3):301-5.
- GOODMAN Y, BRUCE AJ, CHENG B, MATTSON MP. (1996) Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem*; **66**:1836–44.

- GOPARAJU SK, UEDA N, TANIGUCHI K & YAMAMOTO S. (1999) Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.*, **57**(4):417-23.
- GRADY D, RUBIN SM, PETITTI DB, FOX CS, BLACK D, ETTINGER B, ERNSTER VL & CUMMINGS SR. (1992) Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.*; **117**(12):1016-37.
- GREEN PS, GRIDLEY KE & SIMPKINS JW. (1996) Estradiol protects against beta-amyloid (25-35)-induced toxicity in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.*; **218**(3):165-8.
- GRUNDY RI, RABUFFETTI M. & BELTRAMO M. Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol.*; **24**(1-3):29-51.
- HANSEN HH, SCHMID PC, BITTIGAU P, LASTRES-BECKER I, BERRENDERO F, MANZANARES J, IKONOMIDOU C, SCHMID HH, FERNANDEZ-RUIZ JJ & HANSEN HS (2001) Anandamide, but not 2-arachidonoil-glycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* **78**, 1415–1427.
- HAO S., AVRAHAM Y., MECHOULAM R. & BERRY, E.M., (2000). Low dose anandamide affects food intake, cognitive function, neurotransmitter and corticosterone levels in diet-restricted mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **392**: 147-156.
- HART M.N., SOKOLL M.D., DAVIES L.R. & HENRIQUEZ E. (1978) Vascular spasm in cat cerebral cortex following ischemia. *Stroke* **9**, 52-57.
- HENDERSON VW. (1997) Estrogen replacement therapy for the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *CNS Drugs*; **8**:343–51.
- HERKENHAM M, LYNN AB, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR & RICE KC. (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.*; **11**(2):563-83.

- HERKENHAM, M. in *Cannabinoid Receptors* (Pertwee, R. G. ed. Academic Press) (1995), 145-166.
- HILLARD, C.J. & JARRAHIAN A. (2000). The movement of N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*. **108**: 123-134.
- HILLARD, C. J., EDGEMOND, W. S., JARRAHIAN, A. AND CAMPBELL, W. B. (1997). Accumulation of N-arachidonoyl ethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.*, **69**: 631-638.
- HOFFMAN AF & LUPICA CR. (2000) Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci.*; **20**(7):2470-9.
- HONDA K., SHIMOHAMA S., SAWADA H., KIHARA T., NAKAMIZO T., SHIBASAKI H. & AKAIKE A. (2001) Nongenomic antiapoptotic signal transduction by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* **64**, 466-475.
- HORWITZ KB, JACKSON TA, BAIN DL, RICHER JK, TAKIMOTO GS & TUNG L. (1996) Nuclear receptor coactivators and corepressors. *Mol Endocrinol.*, **10**(10):1167-77.
- HOWARD S, BOTTINO C, BROOKE S, CHENG E, GIFFARD RG & SAPOLSKY R. (2002) Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. *J Neurochem*; **83**:914-23.
- HOWLETT A.C. & MUKHOPADHYAY S. (2000) Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem Phys Lipids*; **108**(1-2):53-70.
- HOWLETT, A. C. & FLEMING, R. M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membrane. *Mol. Pharmacol.*, **26**: 532-538.

- HUANG CC, LO SW & HSU KS. (2001) Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. *J Physiol.*; **532**(Pt 3):731-48.
- HUANG Y, HUANG YL, ZHANG S, ZHU YC & YAO T. (2004) Estradiol acutely attenuates glutamate-induced calcium overload in primarily cultured rat hippocampal neurons through a membrane receptor-dependent mechanism. *Brain Res*; **1026**:254–60.
- IADECOLA C. (1997) Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends in Neurosciences* **20**, 132-139.
- IVANOVA T, MENDEZ P, GARCIA-SEGURA LM & BEYER C. (2002) Rapid stimulation of the PI3- kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *J Neuroendocrinol.*; **14**(1):73-9.
- JARRAHIAN, A., MANNA, S., EDGEMOND, W. S., CAMPBELL, W. B. & HILLARD, C. J. (2000). Structure-activity relationships among anandamide head group analogs for the anandamide transporter. *J. Neurochem.*, **74**: 2597-2606.
- JEZIERSKI MK & SOHRABJI F. (2000) Region- and peptide-specific regulation of the neurotrophins by estrogen. *Mol Brain Res*; **85**:77–84.
- JUAN-PICÓ P, FUENTES E, BERMÚDEZ-SILVA FJ JAVIER DÍAZ-MOLINA F, RIPOLL C, RODRÍGUEZ DE FONSECA F. & NADAL A. (2006) Cannabinoid receptors regulate CA^{2+} signals and insulin secretion in pancreatic β -cells. *Cell Calcium.*; **39**:155-162.
- KAWAI K, NITECKA L, RUETZLER CA, NAGASHIMA G, JOÓ F, MIES G, NOWAK TS JR, SAITO N, LOHR JM & KLATZO I. (1992) Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal changes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **12**, 238-249.

- KELLY MJ & WAGNER EJ. (1999) Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab.*; **10**(9):369-374.
- KIM HE, YOON SY, LEE JE, CHOI WS, JIN BK, OH TH, MARKELONIS GJ, CHUN SY & OH YJ. (2001) MPP(+) downregulates mitochondrially encoded gene transcripts and their activities in dopaminergi neuronal cells: protective role of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*; **286**:659–65.
- KLEIN, T.W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 400–411.
- KODAKI, T. & YAMASHITA, S. (1997) Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain. *J. Biol. Chem.* **272**, 11408–11413.
- KOGA D., SANTA T., HAGIWARA K. IMAI K, TAKIZAWA H, NAGANO T, HIROBE M, OGAWA M, SATO T. & INOUE K. (1995) High-performance liquid chromatography and fluorometric detection of arachidonylethanolamide (anandamide) and its analogues, derivatized with 4-(N-chloroformylmethyl-N-methyl)amino-7-N,N-dimethylaminosulphonyl-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-COCl). *Biomed. Chromatogr.* **9**, 56-57.
- KOGA, D., SANTA, T., FUKUSHIMA, T., HOMMA, H. & IMAI, K. (1997). Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J. Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications*, **69**: 7-13.
- KONDO, S., KONDO, H., NAKANE, S., KODAKA, T., TOKUMURA, A., WAKU, W. & SUGIURA, T. (1998). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett.*, **429**: 152-156.

- KORPATCHEV W.G., SYSENKOV S.P. & THIELIZ P.S. (1982) Modelirowanije kliniczeskoj smerti I postreanimatioznoj belezni u krys. *Patol. Fiziol. Exp. Ter.* **3**, 78-80.
- KREITZER AC & REGEHR WG. (2001) Cerebellar depolarization-induced suppression of inhibition is mediated by endogenous cannabinoids. *J Neurosci.* **15**;21(20).
- KROEMER G. & REED J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* **6**, 513-519.
- KUIPER GG, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S & GUSTAFSSON JA. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **93**(12):5925-30.
- KUNOS G & BATKAI S. (2001) Novel physiologic functions of endocannabinoids as revealed through the use of mutant mice. *Neurochem Res.*; **26**:1015-1021.
- KURAHASHI Y., UEDA N., SUZUKI H., SUZUKI M. & YAMAMOTO S. (1997). Reversible hydrolysis and synthesis of anandamide demonstrated by recombinant rat fatty-acid amide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **237**: 512-515.
- KURIHARA R, TOHYAMA Y, MATSUSAKA S., NARUSE H, KINOSHITA E, TSUJIOKA T, KATSUMATA Y & YAMAMURA H. (2006) Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem.*; **28**:12908-12918.
- LANDSMAN R.S., BURKEY T.H., CONSROE P., ROESKE W.R. & YAMAMURA H.I. (1997). SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **334**: R1-R2.
- LANG W., QIN S., HILL C., LIN W.A.G., KHANOLKAR A.D., MAKRIYANNIS A. (1996) High-performance liquid chromatographic determination of anandamide amidase activity in rat brain microsomes. *Anal. Biochem.* **238**, 40-45.

- LEDENT, C., VALVERDE, O., COSSU, G., PETITET, F., AUBERT, J. F., BESLOT, F., BOHME, G. A., IMPERATO, A., PEDRAZZINI, T., ROQUES, B. P., VASSART, G., FRATTA, W. & PARMENTIER, M. (1999). Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, **283**: 401-404.
- LEE J.M., GRABB M.C., ZIPFEL G.J. & CHOI D.W. (2000). Brain tissue responses to ischemia. *J. Clin. Invest.* **106**(6), 723-731.
- LI H., COLBOURNE F., SUN P., ZHAO Z., BUCHAN A.M. & IADECOLA C. (2000) Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke* **31**, 176-182.
- LI Y., POWERS C., JIANG N. & CHOPP M. (1998) Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neurol. Sci.* **156**, 119-132.
- LIAO SL, CHEN WY & CHEN CJ. (2002) Estrogen attenuates tumor necrosis factor-alpha expression to provide ischemic neuroprotection in female rats. *Neurosci Lett*; **330**:159–62.
- LONGA E.Z., WEISTEIN P.R., CARLSON S. & CUMMINS R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84-91.
- MACCARRONE M, DE FELICI M, BARI M, KLINGER F, SIRACUSA G. & FINAZZI-AGRÒ A. (2000) Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur J Biochem.*; **267**(10):2991-7.
- MACCARRONE M, DE PETROCELLIS L, BARI M, FEZZA F, SALVATI S, DI MARZO V. & FINAZZI-AGRÒ A. (2001) Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys.*; **393**(2):321-8.
- MACCARRONE M, VALENSISE H, BARI M, LAZZARIN N, ROMANINI C & FINAZZI-AGRÒ A. (2001) Progesterone up-regulates anandamide hydrolase in

- human lymphocytes: role of cytokines and implications for fertility. *J Immunol.*; **166**(12):7183-9.
- MACCARRONE M, VAN DER STELT M, ROSSI A, VELDINK GA, VLIEGENTHART JF & AGRÒ AF. (1998). Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem.*; **273**(48):32332-9.
 - MACCARRONE M. (2005). Central and peripheral interaction between endocannabinoids and steroids, and implications for drug dependence. *Life Sci.* **77**, 1559-1568.
 - MACCARRONE M. & FINAZZI-AGRÒ A. (2003) The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **10**, 946-955.
 - MACCARRONE M., BARI M., BATTISTA N. & FINAZZI-AGRÒ A. (2002) Estrogen stimulates arachidonoyl ethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation. *Blood* **100**, 4040-4048.
 - MACCARRONE M., BARI M. & FINAZZI-AGRÒ A. (1999) A sensitività and specific radiochromatographic assay of fatty acid amide hydrolase activity. *Ana. Biochem.* **267**, 314-318.
 - MACCARRONE, M., BARI, M., LORENZON, T., BISOGNO, T., DI MARZO, V. & FINAZZI-AGRÒ, A. (2000). Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **275**: 13484-13492.
 - MAEJMA T, HASHIMOTO K, YOSHIDA T, AIBA K & KANO M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron.*; **31**:463-475.
 - MAGGI A, CIANA P, BELCREDITO S. & VEGETO E. (2004) Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu Rev Physiol.*; **66**:291-313.

- MALLET, P.E. & BENINGER, R. J. (1998). The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacol.*, **140**: 11-19.
- MARKGRAF C.G., KRAYDIECH S., PRADO R., WATSON B.D., DIETRICH W.D. & GINSBERG M.D. (1993) Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar-Kyoto rats. *Stroke* **24**, 286–293.
- MARSICANO G, GOODENOUGH S, MONORY K, HERMANN H, EDER M, CANNICH A, AZAD SC, CASCIO MG, GUTIERREZ SO, VAN DER STELT M. LÓPEZ-RODRIGUEZ ML, CASANOVA E, SCHÜTZ G, ZIEGLGÄNSBERGER W, DI MARZO V, BEHL C. & LUTZ B. (2003) CB1cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**, 84–88.
- MARTIN, B. R. & LINCHTMAN, A. H. (1998). Cannabinoid transmission and pain perception. *Neurobio. Dis.*, **5**: 447- 461.
- MASCIA, M. S. OBINU, M. C., LEDENT, C., PARMENTIER, M., BOHME, G. A., IMPERATO, A. & FRATTA, W. (1999). Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **383** : R1-R2.
- MATSUDA L.A., LOLAIT S.J., BROWNSTEIN M.J., YOUNG A.C. & BONNER T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**:561-564.
- MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR & COMPTON DR. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.*; **50**(1):83-90.

- MECHOULAM R, PANIKASHVILI D & SHOHAMI E (2002) Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med* **8**, 58–61.
- MEMEZAWA H, SMITH ML & SIESJO BK (1992) Penumbra tissue salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **23**, 552–559.
- MENDEZ P, AZCOITIA I. & GARCIA-SEGURA LM. (2003) Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.*; **112**(1-2):170-6.
- MENG, I. D., MANNING, B. H., MARTIN, W. J. & FIELDS, H. L. (1998). An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature*, **395**: 381-383.
- MIES G., IJIMA T. & HOSSMANN K.A. (1993) Correlation between peri-infarct DC shift and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* **4**, 709-711.
- MILNER TA, MCEWEN BS, HAYASHI S, LI CJ, REAGAN LP & ALVES SE. (2001). Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites. *J Comp Neurol.*; **429**(3):355-71.
- MOSS RL & GU Q. (1999) Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons. *Steroids*; **64**:14–21.
- MUNRO S., THOMAS K.L. & ABU-SHAAR M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**: 61-65.
- MURPHY M.P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**(2-3), 401-414.
- MUTHIAN S, RADEMACHER DJ, ROELKE CT, GROSS GJ & HILLARD CJ (2004) Anandamide content is increased and CB₁ cannabinoid receptor blockade is protective during transient, focal cerebral ischemia. *Neuroscience* **129**, 743–750.

- NADAL A, ROPERO AB, LARIBI O, MAILLET M, FUENTES E. & SORIA B. (2000). Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **97**(21):11603-8.
- NAGAYAMA T, SINOR AD, SIMON RP, CHEN J, GRAHAM SH, JIN K & GREENBERG DA (1999). Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* **19**, 2987–2995.
- NILSEN J. & BRINTON RD. (2003) Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**:2842–7.
- NILSEN J, CHEN S. & BRINTON RD. (2002) Dual action of estrogen on glutamate-induced calcium signalling: mechanisms requiring interaction between estrogen receptors and src/mitogen activated protein kinase pathway. *Brain Res*, **930**:216–34.
- NUNEZ E, BENITO C, PAZOS MR BARBACHANO A, FAJARDO O, GONZÁLEZ S, TOLÓN RM & ROMERO J. (2004) Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse.*; **53**:208-213.
- PAGOTTO U, MARSICANO G, COTA D, LUTZ B. & PASQUALI R. (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.*; **27**:73-100.
- PATRICELLI MP, LASHUEL HA, GIANG DK, KELLY JW & CRAVATT BF. (1998). Comparative characterization of a wild type and transmembrane domain-deleted fatty acid amide hydrolase: identification of the transmembrane domain as a site for oligomerization. *Biochemistry*; **37**(43):15177-87.
- PERTWEE, R. G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol. Ther.*, **74**: 129-180.

- PERTWEE, R.G. (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb. Exp. Pharmacol.* **168**, 1–51.
- PIKE CJ. (1999). Estrogen modulates neuronal Bcl-XL expression and betaamyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J Neurochem*; **72**:1552–63.
- PIOMELLI, D., BELTRAMO, M., GLASNAPP, S., LIN, S. Y., GOUTOPOULOS, A., XIE, X. Q. & MAKRIYANNIS, A. (1999). Structural determinants for recognition and traslocation by the anandamide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 5802-5807.
- RAZANDI M, PEDRAM A, GREENE GL & LEVIN ER. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol.*; **13**(2):307-19.
- REED JC. (2002) Apoptosis-based therapy. *Nat Rev Drug Discov*; **1**:111–21.
- RESNICK SM & MAKI PM. (2001) Effects of hormone replacement therapy on cognitive and brain aging. *Ann N Y Acad Sci.*; **949**:203-14.
- RINALDI-CARMONA M, CALANDRA B, SHIRE D, BOUABOULA M, OUSTRIC D, BARTH F,CASELLAS P, FERRARA P & LE FUR G. (1996) Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther.*; **278**(2):871-8.
- RISSMAN EF, EARLY AH, TAYLOR JA, KORACH KS, LUBAHN DB. (1997) Estrogen receptors are essential for female sexual receptivity. *Endocrinology*; **138**:507–10.
- RODRIGUEZ DE FONSECA, F., DEL ARCO, I., MARTIN-CALDERON, J. L., GORRITI, M. A. & NAVARRO, M. (1998). Role of the cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobio. Dis.*, **5**: 483-501.

- ROTHWELL P.M. (2001) The high cost of not founding stroke research: a comparison with heart disease and cancer. *Lancet* **357**, 1612-16.
- SAFE S. (2001) Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. *Vitam Horm.*; **62**:231-52.
- SCHEID MP & WOODGETT JR. (2001) PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; **2**(10):760-8.
- SCHLICKER E & KATHMANN M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 565–572.
- SCHMID P.C., KREBSBACH R.J., PERRY S.R., DETTMER T.M., MAASSON J.L. & SCHMID H.H. (1995) Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain *N*-acylethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* **375**, 117-120.
- SIMPKINS JW, RAJAKUMAR G, ZHANG YQ, SIMPKINS CE, GREENWALD D, YU CJ, ET AL. (1997a). Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am J Med* **103**:19S–25S.
- SIMPKINS JW, RAJAKUMAR G, ZHANG YQ, SIMPKINS CE, GREENWALD D, YU CJ, ET AL. (1997a). Estrogens may reduce mortality and ischemic damage caused by middle cerebral artery occlusion in the female rat. *J Neurosurg*; **87**:724–30.
- SIMS N.R. & ANDERSON M.F. (2001) Mitochondrial contribution to tissue damage in stroke. *Neurochemistry inter.* **40**, 511-526.
- SINGER CA, FIGUEROA-MASOT XA, BATCHELOR RH & DORSA DM. (1999) The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci*; **196**:2455–63.

- SINGER CA, ROGERS KL & STRICKLAND TM. (1996) Estrogen protects primary cortical neurons from glutamate toxicity. *Neurosci Lett*; **212**:13–6.
- SINGH M, SETALO G, GUAN X, WARREN M. & TORAN-ALLERAND CD. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signalling pathways. *J Neurosci*; **19**:1179–88.
- SRIBNICK EA, RAY SK, NOWAK MW, LI L & BANIK NL. (2004) 17 β -Estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J Neurosci Res*; **76**:688–96.
- STELLA N., SCHWEITZER P. & PIOMELLI D. (1997). A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, **388**:773-778.
- SUGIURA T., KONDO S., SUKAGAWA A., NAKANE S., SHINODA A., ITOH K., YAMASHITA A. & WAKU K. (1995). 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **215**:89-97.
- SUGIURA, T., KONDO S, SUKAGAWA A, NAKANE S, SHINODA A, ITOH K, YAMASHITA A. & WAKU K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89–97.
- TANDA, G., PONTIERI, F. E. & DI CHIARA, G. (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science*, **276**: 2048-2050.
- TERRANOVA, J. P., STORME, J. J., LAFON, N., PERIO, A., RINALDI-CARMONA, M., LE FUR, G. & SOBRIE, P. (1996). Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Psychopharmacology*, **126**: 165-172.

- TORAN-ALLERAND CD, GUAN X, MACLUSKY NJ, HORVATH TL, DIANO S, SINGH M, CONNOLLY ES JR, NETHRAPALLI IS & TINNIKOV AA. (2002). RE-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development after ischemic brain injury. *J Neurosci*; **22**:8391–401.
- TOUNG TJ, TRAYSTMAN RJ & HURN PD. (1998). Estrogen-mediated neuroprotection after experimental stroke in male rats. *Stroke*; **29**:1666–70.
- TSAI MJ & O'MALLEY BW. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.*; **63**:451-86.
- UEDA, N., KURAHASHI, Y., YAMAMOTO, S. & TOKUNAGA, T. (1995). Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J. Biol. Chem.*, **270**: 23823-23827.
- VAN DER STELT M & DI MARZO V (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromol Med*, **7**, 37–50.
- VAN DER STELT M, TREVISANI M, VELLANI V., DE PETROCELLIS L, SCHIANO MORIELLO A, CAMPI B, MCNAUGHTON P, GEPETTI P. & DI MARZO V. (2005). Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying CA^{2+} influx via TRPV1 channels. *EMBO J.*; **24**:3026-3037.
- VAN DER STELT M, VELDHUIS WB, BÄR PR, VELDINK GA, VLIAGENTHART JF & NICOLAY K. (2001). Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci.*; **21**(17):6475-9.
- VAN SICKLE MD, DUNCAN M, KINGSLEY PJ, MOUIHATE A, URBANI P, MACKIE K, STELLA N, MAKRIYANNIS A, PIOMELLI D, DAVISON JS, MARNETT LJ, DI MARZO V, PITTMAN QJ, PATEL KD & SHARKEY KA. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**, 329–332.

- VEGETO E, BELCREDITO S, ETTERI S, GHISLETTI S, BRUSADELLI A, MEDA C, KRUST A, DUPONT S, CIANA P, CHAMBON P & MAGGI A. (2003). Estrogen receptor-alpha mediates the brain anti-inflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**:9614–9.
- VEGETO E, BONINCONTRO C, POLLIO G, SALA A, VIAPPIANI S, NARDI F, BRUSADELLI A, VIVIANI B, CIANA P & MAGGI A. (2001) Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci.* **21**(6):1809-18.
- VELASCO I, TAPIA R & MASSIEU L. (1996). Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J Neurosci Res.*; **44**(6):551-61.
- VOSSLER MR, YAO H, YORK RD, PAN MG, RIM CS & STORK PJ. (1997). cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell.*; **89**(1):73-82.
- WALEH N.S., CRAVATT B.F., APTE-DESHPANDE A., TERAIO A. & KILDUFF T.S. (2002) Transcriptional regulation of the mouse fatty acid amide hydrolase gene. *Gene* **291**, 203-210.
- WALKER, J.M., HUANG, S. M., STRANGMAN, N. M.,TSOU, K. & SANUDO-PENA, M. C. (1999). Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 12198-12203.
- WANG H, DEY SK & MACCARRONE M. (2006). Jeckyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endocrine Rev.*;(e-pub):1-71.
- WANG L, ANDERSSON S, WARNER M & GUSTAFSSON JA. (2003). Estrogen receptor (ER) beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**:703–8.

- WANG Y., LIU Y., ITO Y. ITO Y, HASHIGUCHI T, KITAJIMA I, YAMAKUCHI M, SHIMIZU H, MATSUO S, IMAIZUMI H & MARUYAMA I (2001). Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxin shock. *Ana. Biochem.* **294**:73-82.
- WEAVER CE, PARK-CHUNG M, GIBBS TT & FARB DH. (1997). 17 β -Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res*; **761**:338–41.
- WICKENS, A. P. & PERTWEE, R. G. (1993). Delta-9-tetrahydrocannabinol and anandamide enhance the ability of muscimol to induce catalepsy in the globus pallidus of rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **250** : 205-208.
- WILSON RI & NICOLL RA. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* **296**(5568):678-82.
- WOOLLEY CS, WEILAND NG, MCEWEN BS & SCHWARTZKROIN PA. (1997) Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci*; **17**:1848–59
- WOOLLEY CS, WEILAND NG, MCEWEN BS & SCHWARTZKROIN PA. (1997). Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. *J Neurosci* **17**:1848–59.
- YANG SH, LIU R, PEREZ EJ, WEN Y, STEVENS SM JR, VALENCIA T, BRUNZINKERNAGEL AM, PROKAI L, WILL Y, DYKENS J, KOULEN P. & SIMPKINS JW.(2004). Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **101**(12):4130-5.

- ZEEVALK GD & NICKLAS WJ. (1992) Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg²⁺ block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism. *J Neurochem.*; **59**(4):1211-20.
- ZHANG L, RUBINOW DR, XAING G, LI BS, CHANG YH, MARIC D, et al. Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. *Neuroreport* ., **12**:1919–23.
- ZHANG Y, CHAMPAGNE N, BEITEL LK, GOODYER CG, TRIFIRO M & LEBLANC A. (2004). Estrogen and androgen protection of human neurons against intracellular amyloid beta1–42 toxicity through heat shock protein 70. *J Neurosci*; **24**:5315–21.
- ZHAO L, WU T & BRINTON DR. (2004). Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons.. *Brain Res* 2004;**1010**: 22–34.
- ZHENG J, RAMIREZ VD. (1999) Rapid inhibition of rat brain mitochondrial proton F₀F₁-ATPase activity by estrogens: comparison with Na⁺, K⁺-ATPase of porcine cortex. *Eur J Pharmacol.*; **368**(1):95-102.
- ZHOU Y, WATTERS JJ & DORSA DM. (1996). Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology*; **137**(5):2163-6.