



DIPARTIMENTO DI FARMACIA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO
XXIX CICLO

Ruolo del sistema endocannabinoide e delle molecole ad esso correlate nel controllo delle cellule non neuronalì in modelli di neurodegenerazione

Tutor:

Ch.mo Prof. Angelo A. Izzo

Coordinatore:

Ch.ma Prof. Maria Valeria D'Auria

Dottorando:

Dott. Andrea Guarino

Anno accademico 2016/2017

INDICE

Lista delle abbreviazioni	5
1. <u>INTRODUZIONE</u>	7
1.1 Malattie neurodegenerative	7
1.2 Cannabinoidi ed endocannabinoidi	8
1.3 Il Morbo di Parkinson	12
1.3.1 Ipotesi di eziopatogenesi: Cellule microgliali	14
1.3.2 Ipotesi di eziopatogenesi: Linfociti T	16
1.3.3 Ipotesi di eziopatogenesi: Astrociti	19
1.3.4 Trattamento farmacologico del morbo di Parkinson	21
1.4 Il Morbo di Alzheimer	22
1.4.1 Placche senili	23
1.4.2 Aggregati neuro fibrillari	26
1.4.4 Terapia farmacologica del morbo di alzheimer	27
1.4.5 Gli endocannabinoidi nel morbo di Alzheimer	29
1.4.6 Fitocannabinoidi non psicoattivi nel morbo di Alzheimer	30
1.4.7 Cannabidivarina	19
1.5 Obiettivo dello studio	32
2. <u>MATERIALI E METODI</u>	33
2.1 Modello animale di Parkinson	33

2.2 Rotarod	34
2.3 Modello di tossicità da β -amiloide	34
2.4 β -Amiloide	35
2.5 Cannabidiivarina	35
2.6 Y maze	36
2.7 Western Blot	36
2.8 Real time PCR	37
2.9 Citofluorimetria di flusso	37
2.10 Analisi statistica	38
3. <u>RISULTATI</u>	39
3.2 Modello di Parkinson	39
3.2.1 Alterazioni dell'espressione di recettori ed enzimi del sistema endocannabinoide nel modello sperimentale	39
3.2.2 MPTP attiva le microglia nel fenotipo M1 e aumenta la trascrizione di proteine che favoriscono la proliferazione dei linfociti Th1	44
3.2.3 Il CB ₂ -agonista HU-308 e l'inibitore della MAGL JZL-184 migliorano le performance motorie e riducono la morte neuronale indotta da MPTP.	46
3.2.4 HU-308 e JZL-184 riducono la neuroinfiammazione e l'attivazione delle microglia in topi trattati con MPTP	49
3.2.5 JZL-184 riduce il numero di linfociti T CD4 ⁺ nel mesencefalo	51
3.1 Modello di Alzheimer	53
3.1.1 La CBDV riduce l'attivazione gliale <i>in vivo</i>	53

3.1.2 La CBDV migliora le prestazioni cognitive in animali trattati con A β	56
4. <u>DISCUSSIONE</u>	58
4.1 Il morbo di Parkinson	58
4.2 Il morbo di Alzheimer: generalità	62
5. <u>CONCLUSIONI</u>	64
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	66

Lista delle abbreviazioni

2-AG	2-arachidonoilglicerolo
AD	Morbo di Alzheimer
AEA	Arachidonoiletanolammide
APP	<i>Amyloid precursor protein</i>
Aβ	β -amiloide
CBD	Cannabidiolo
CBDV	Cannabidivarina
COX-2	Cicloossigenasi 2
DAGLα	Diacilglicerolo lipasi α
DAGLβ	Diacilglicerolo lipasi β
eCS	Sistema endocannabinoide
FAAH	<i>Fatty acid amide hydrolase</i>
GABA	acido γ -amminobutirrico
GFAP	Proteina fibrillare acida della glia
GSK3	Glicogeno sintasi chinasi 3
IFNγ	Interferone γ
icv	Intracerebroventricolare
IL-1	Interleuchina 1
IL-4	Interleuchina 4
IL-5	Interleuchina 5
IL-6	Interleuchina 6
IL-10	Interleuchina 10
IL-12	Interleuchina 12
IL-13	Interleuchina 13
ip	Intraperitoneale
iNOS	Sintasi inducibile dell'ossido nitrico
MND	Malattie neurodegenerative
MPTP	1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidropiridina
NF-κB	Fattore nucleare- κ B
NMDA	N-Metil-D-aspartato
NO	Monossido di azoto
PD	Morbo di Parkinson
ROS	Radicali liberi dell'ossigeno
S100B	<i>S100 calcium-binding protein B</i>
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNC	Sistema nervoso centrale

SNpc	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
TCR	recettore dei linfociti T
TH	Tirosina idrossilasi
Th1	Linfociti T helper 1
Th17	Linfociti T helper 17
THC	Δ^9 -tetraidrocannabinolo
TNFα	Fattore di necrosi tumorale α
Treg	Linfociti T regolatori
TRPA1	Transient receptor potential ankyrin 1
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid type 1
TRPV2	Transient receptor potential vanilloid type 2
α-sin	α sinucleina

1. INTRODUZIONE

1.1 Malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative (MND) costituiscono un insieme di condizioni patologiche accomunate da una lenta, progressiva ed irreversibile perdita di neuroni e sinapsi in determinate aree del sistema nervoso centrale (SNC) (Slovronsky *et al.*, 2006). Sebbene le MND abbiano eziologie diverse, è possibile individuare alcuni elementi comuni, come ad esempio la morte neuronale, la presenza di infiammazione e gliosi, l'accumulo di proteine aberranti o caratterizzate da ripiegamenti anomali (Soto ed Estrada, 2008).

A seconda dell'area del sistema nervoso colpita dalla neurodegenerazione, peculiare di ogni patologia, si ha lo sviluppo di sintomi caratteristici: ad esempio, la perdita di motoneuroni corticali e spinali è alla base delle difficoltà motorie che si riscontrano nei pazienti affetti dalla corea di Huntington, mentre il morbo di Parkinson (PD) è caratterizzato da una degenerazione neuronale a livello della *substantia nigra*, infine la perdita di memoria tipica del morbo di Alzheimer (AD) è dovuta alla perdita di neuroni a livello dell'ippocampo e della corteccia cerebrale. Le cause esatte alla base delle MND il più delle volte non sono note, tuttavia sembrano abbracciare una vasta serie di fattori, sia genetici che ambientali, che agiscono provocando eventi che favoriscono lo sviluppo di neurotossicità, come ad esempio l'accumulo di proteine anomale e di loro aggregati, aumentato stress ossidativo, disfunzioni mitocondriali ed

infiammazione. Studi recenti suggeriscono che le cellule non neuronali, termine con cui si indicano tutte le cellule presenti nel SNC diverse dai neuroni, siano coinvolte nei meccanismi neurodegenerativi (Hui *et al.*, 2016) e, di conseguenza, il loro controllo farmacologico potrebbe rappresentare una strategia interessante nel trattamento di queste patologie.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di valutare l'effetto di molecole correlate al sistema endocannabinoide in due modelli animali utilizzati per lo studio, rispettivamente, di AD e PD, valutando gli effetti di tali molecole sulle cellule non neuronali ritenute maggiormente coinvolte nella fisiopatogenesi di queste patologie.

1.2 Cannabinoidi ed endocannabinoidi

La classe dei cannabinoidi racchiude una serie di composti chimici in grado di attivare i recettori cannabinoidi. In base alla loro origine, si possono suddividere in: fitocannabinoidi, di origine naturale, prodotti dalla *Cannabis Sativa*, endocannabinoidi, molecole prodotte in maniera endogena dall'organismo e cannabinoidi sintetici, di origine artificiale.

La *Cannabis Sativa*, nota anche come canapa, è una pianta appartenente alle famiglia delle cannabacee. Il suo uso come pianta medicinale è noto fin dall'antichità, sono state rinvenute indicazioni di utilizzo terapeutico della *Cannabis* in testi cinesi, indiani, assiri e di varie civiltà. In tempi più recenti la

canapa ha trovato numerosi impieghi a livello industriale: veniva usata per produrre fibre tessili, materiali plastici, carta, concimi naturali.

Per quanto riguarda la chimica dei componenti biologicamente attivi della canapa, i fitocannabinoidi, essi hanno generalmente una struttura terpenofenolica triciclica, sono insolubili in acqua ma solubili nei lipidi, in alcol ed in altri solventi organici polari (Vree *et al.*, 1972). La loro sintesi segue la via del deossixilulosio fosfato, ed inizia con la combinazione di geranyl pirofosfato ed acido olivetoico per formare cannabigerolo (CBG), il quale può essere convertito in cannabinolo o cannabidiolo (CBD), quest'ultimo viene trasformato in Δ^9 tetraidrocannabinolo (THC) tramite un processo di ciclizzazione molecolare. I cannabinoidi più rappresentati sono il CBD, il quale è privo di effetti psicoattivi, ed il THC, responsabile proprietà psicoattive della cannabis.

Sono state distinte due varietà naturali o chemotipi di *Cannabis* in base al rapporto di CBD e THC in esse contenuto: il chemotipo CBD, caratterizzato dalla presenza dell'enzima CBDA-sintasi, presenta un elevato rapporto CBD/THC, che risulta invece molto inferiore nel chemotipo THC, che presenta l'enzima THCA-sintasi (Small e Beckstead, 1973).

La ricerca sulle componenti molecolari attive della *Cannabis Sativa* iniziò nei primi anni del diciannovesimo secolo. In principio non si riuscì a purificarle ed identificarle, finchè nel 1940 si riuscì ad isolare il cannabinolo ed il CBD, il primo presenta solo una debole attività psicoattiva, il secondo ne è del tutto

privo. In seguito fu isolato il componente psicoattivo principale della cannabis, il THC, e ne fu identificata la struttura (Gaoni e Mechoulam, 1964).

Inizialmente si ritenne che l'attività farmacologica dei cannabinoidi, a causa della loro natura lipofila, fosse dovuta ad una perturbazione delle membrane cellulari, dunque con un meccanismo simile a quello degli anestetici generali. Questa ipotesi fu però messa in discussione quando si dimostrò che l'attività farmacologica dei cannabinoidi era altamente stereoselettiva (Mechoulam *et al.*, 1992), suggerendo quindi che vi fosse la mediazione di recettori specifici.

Sono stati in seguito individuati due recettori metabotropici per i cannabinoidi: *cannabinoid receptor type 1* (CB₁), recettore accoppiato ad una proteina G_i espresso nel SNC, specialmente nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo, nei gangli della base, nel cervelletto ed in alcuni tessuti nervosi periferici, come i nervi sensoriali e le fibre del sistema nervoso autonomo (Pertwee, 1997). L'attivazione di questo recettore porta alla chiusura di canali permeabili al calcio e all'apertura di canali ionici per il potassio (Bahr *et al.*, 2006), con conseguente iperpolarizzazione neuronale ed inibizione del rilascio di neurotrasmettitori quali l'acido γ -amminobutirrico (GABA), glutammato e serotonina dalla membrana presinaptica.

Il *cannabinoid receptor type 2* (CB₂), anch'esso accoppiato ad una proteina G_i, è stato ritenuto per lungo tempo un recettore esclusivamente periferico, essendo espresso principalmente su cellule del sistema immunitario quali linfociti B, linfociti T, cellule *natural killer*, monociti, macrofagi, tuttavia di recente è stato

individuato a livello del SNC, espresso dalle microglia (Maresz *et al.*, 2005). E' risaputo che l'attivazione di CB₂ generalmente provoca immunosoppressione (Cabral *et al.*, 1998), a livello periferico e, recentemente, alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato una stretta correlazione tra la sua overespressione a livello delle cellule gliali e la presenza di neuroinfiammazione (Mukhopadhyay *et al.*, 2006), suggerendo che la sua espressione possa costituire una risposta endogena di tipo protettivo a condizioni potenzialmente dannose; in esperimenti *in vitro* la sua attivazione ha provocato una riduzione di molecole proinfiammatorie (Molina-Holgado *et al.*, 1997; Puffenbarger *et al.*, 2000), elementi che potrebbero renderlo un possibile bersaglio farmacologico nella cura delle malattie neurodegenerative.

La scoperta di specifici recettori per i cannabinoidi aprì la strada all'identificazione degli endocannabinoidi, molecole di produzione endogena chimicamente molto differenti dai fitocannabinoidi, ma aventi effetti simili. Il primo ad essere individuato fu l'arachidonoiletanolamide, denominata dai suoi scopritori "anandamide" (AEA) (Devane *et al.*, 1992); la quale condivide molti degli effetti farmacologici del THC, nonostante rispetto ad esso abbia un'affinità moderata per i recettori ed un'emivita più breve (Smith *et al.*, 1994). In seguito fu individuato un secondo endocannabinoide: il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Sugiura *et al.*, 1995). Entrambi AEA e 2-AG vengono sintetizzati a partire da fosfolipidi, differenziandosi da altri neuromodulatori poiché non vengono immagazzinati in vescicole, ma prodotti *on demand* in seguito a stimoli

potenzialmente citotossici (Wagner *et al.*, 1997) e rilasciati all'esterno della cellula dove esplicano effetti ipotensivi, antiossidanti, anti-infiammatori, immunosoppressori ed antidolorifici (Calignano *et al.*, 1998).

Gli endocannabinoidi, i loro recettori e gli enzimi preposti al metabolismo degli stessi prendono il nome di sistema endocannabinoide (eCS). L'eCS è implicato nel controllo della memoria e dei movimenti, come dimostra la localizzazione dei recettori CB₁ nel cervelletto, nella corteccia e nell'ippocampo (Herkenham *et al.*, 1991), il che ha motivato differenti studi riguardo il suo possibile ruolo nelle degenerazioni di queste aree cerebrali, dunque in malattie quali il PD, la sclerosi laterale amiotrofica ed l'AD.

1.3 Il Morbo di Parkinson

Il PD è una malattia degenerativa del SNC a carico principalmente del sistema motorio, caratterizzata dalla presenza di rigidità muscolare, tremore e bradicinesia. I sintomi primari di questa patologia derivano da una insufficiente stimolazione della corteccia motoria da parte dei gangli della base.

Si tratta della seconda patologia neurodegenerativa più diffusa, affliggendo circa l'1% della popolazione oltre i 60 anni di età (De Lau e Breteler; 2006).

Venne descritto per la prima volta da James Parkinson nel 1817, ma solo dopo circa un secolo si iniziò a comprenderne le cause fisiopatologiche principali, quando, negli anni 60, quando Arvid Carlsson e collaboratori identificarono per la prima volta la dopamina all'interno del SNC (Carlsson *et al.*, 1969). Nei

pazienti affetti dal PD furono riscontrati livelli più bassi di dopamina, causati dalla morte dei neuroni dopaminergici all'interno della *substantia nigra pars compacta* (SNpc) appartenenti alla via dopaminergica nigrostriatale, responsabile del controllo dei movimenti.

Il PD può essere classificato principalmente in “idiopatico”, che rappresenta circa il 90% di tutti i casi di PD, e “familiare” (il rimanente 10% dei casi), in caso siano presenti alcune mutazioni genetiche che conferiscono un carattere ereditario a questa patologia. Attualmente sono state individuate sei mutazioni nel dell' α -Sinucleina (α -syn), proteina il cui accumulo nei cosiddetti “corpi di Lewy” costituisce una caratteristica peculiare del PD (Goedert *et al.*, 2013).

L' α -syn è una proteina di 14kDa altamente conservata nei vertebrati. È espressa principalmente nei terminali presinaptici dei neuroni dopaminergici del mesencefalo, della corteccia cerebrale, dell'ipotalamo e dell'ippocampo (Maroteaux *et al.*, 1988; Iwai *et al.*, 1995). Le funzioni fisiologiche e patologiche di questa proteina non sono state ancora del tutto chiarite, tuttavia è stato dimostrato che possa interagire con la membrana neuronale prevenendo la fusione con essa di vescicole intracellulari (DeWitt e Rhoades, 2013), mentre la sua l'aggregazione nei corpi di Lewy provoca degli effetti neurotossici che sono in grado, in modelli animali, di iniziare un processo patologico con le caratteristiche del PD (Recasens *et al.*, 2014).

La neuroinfiammazione è considerato un processo fondamentale nel meccanismo fisiopatologico del PD (Barcia *et al.*, 2012), e costituisce un

elemento comune anche ad altre patologie neurodegenerative, come l'AD (Yoshitama *et al.*, 2007), la sclerosi laterale amiotrofica (Frakes *et al.*, 2014) e la sclerosi multipla (Yoshida *et al.*, 2014).

Recenti ipotesi suggeriscono che le cellule non neuronali, come le microglia ed i linfociti, abbiano un ruolo essenziale nella patogenesi del PD, poichè sono in grado di sostenere, mediante il rilascio di mediatori flogogeni, la neuroinfiammazione e la conseguente neurodegenerazione tipiche di questa patologia.

1.3.1 Ipotesi di eziopatogenesi: cellule microgliali

Le microglia sono cellule residenti nel SNC che si occupano della prima e principale difesa immunitaria attiva.

Dopo essere state attivate subiscono una trasformazione morfologica che conferisce loro attività fagocitica e proinfiammatoria. In cervelli di pazienti affetti da PD sono stati riscontrati livelli eccessivi di attivazione di queste cellule (McGeer *et al.*, 1988).

La SN presenta la più elevata densità di cellule microgliali nel SNC (Kim *et al.*, 2000) e dunque risulta particolarmente suscettibile ad una potenziale azione neurotossica da parte di queste cellule, dato che i neuroni dopaminergici presentano quantità di glutazione intracellulare più basse rispetto ad altre aree della SN, il che riduce la loro capacità di contrastare lo stress ossidativo (Loeffler *et al.*, 1994).

L'attività delle cellule microgliali cambia a seconda del fenotipo funzionale che acquisiscono, determinando la morte o la sopravvivenza dei neuroni circostanti.

Le cellule microgliali possono presentare due fenotipi di attivazione, denominati rispettivamente M1 ed M2, caratterizzati dalla produzione di gruppi diversi di citochine (Pisanu *et al.*, 2014). Il fenotipo M1 è responsabile della produzione di citochine proinfiammatorie, tra cui TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e ROS, favorendo in tal modo la neurodegenerazione (Ferrari *et al.*, 2006; McCoy *et al.*, 2006) mentre il fenotipo M2 ha un ruolo immunosoppressivo ed antinfiammatorio, che esercita sia antagonizzando il fenotipo M1 che promovendo la riparazione tissutale, mediante la produzione di varie citochine, tra cui IL-4, IL-13, IL-10 e *transforming growth factor* β (TGF- β).

In modelli *in vivo* di PD è stato dimostrato che la presenza di proteine aberranti e la somministrazione di 1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP) porta all'aumento di microglia dal fenotipo M1 e alla riduzione di M2 (Zhang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2012; Ha *et al.*, 2012).

La differenza nel comportamento delle microglia è fortemente influenzata da citochine, neurotrasmettitori ed altre cellule con cui interagiscono.

Tra le principali cellule in grado di modulare il comportamento delle microglia vi sono astrociti, cellule epiteliali della barriera ematoencefalica (BEE), neuroni e linfociti T CD4+.

La morte neuronale, a sua volta, mediante il rilascio di varie sostanze, tra cui l' α sin, può aumentare il livello di attivazione microgliale, generando un circolo

vizioso che può alimentare i processi neurodegenerativi del PD (Dutta *et al.*, 2012). Difatti, le cellule microgliali attivate tendono ad accumularsi attorno agli aggregati di l' α sin, dalla quale vengono attivate, portando ad un aumento nella produzione e nel rilascio di citochine pro-infiammatorie (Zhang *et al.*, 2005).

1.3.2 Ipotesi di eziopatogenesi: Linfociti T

Per molti anni il SNC è stato considerato un sistema immuno-privilegiato, dunque si è sempre esclusa la presenza di cellule residenti dell'immunità. Di recente, tuttavia, numerosi studi hanno messo in discussione questa ipotesi: in condizioni fisiologiche, difatti, è stato dimostrato che i linfociti T CD4⁺ che esprimono il recettore delle cellule T (TCR) sono in grado di entrare nel SNC dove possono regolare diversi processi, quali la memoria, il *long term potentiation* ippocampale e la neurogenesi (Ziv *et al.*, 2006; Lewitus e Schwartz 2009; Yirmiya e Goshen, 2011; Baruch e Schwartz 2013; Radjavi *et al.*, 2013). In particolare, per quanto riguarda il PD, è stato dimostrato in studi *post-mortem* su pazienti affetti da PD che l'infiltrazione di queste cellule aumenta in maniera significativa nel SNC e che la loro presenza è un elemento indispensabile nello sviluppo di danno neuronale in un modello murino di PD indotto da MPTP (Brochard *et al.*, 2009).

I meccanismi alla base di questi effetti sono solo parzialmente conosciuti, diversi studi suggeriscono che, mediante la produzione di citochine, queste cellule siano in grado di modificare il comportamento delle cellule gliali

circostanti, il che ha delle conseguenze funzionali sul comportamento di aree specifiche del SNC (Derecki *et al.*, 2010; Baruch e Schwartz 2013).

I linfociti T CD4+ possono svolgere anche un ruolo patologico nel caso in cui vengano attivati in periferia e oltrepassino la BEE entrando nel SNC, dove possono favorire la neuroinfiammazione associata al PD e ad altre patologie neurodegenerative (Gonzales e Pacheco, 2014). In particolare, l'iniziale stress ossidativo presente in queste condizioni patologiche può risultare in modifiche covalenti di proteine del SNC, le quali possono acquisire proprietà antigeniche. I linfociti attivati possono migrare al SNC potenziando la funzione proinfiammatoria delle microglia e la conseguente neurodegenerazione (Benner *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2010; Gonzalez *et al.*, 2014).

Tra i linfociti T CD4+ sono distinguibili diverse sottopopolazioni le quali hanno ruoli diversi nel processo neurodegenerativo. In particolare i linfociti T *helper* 1 (Th1) ed i linfociti T *helper* 17 (Th17) favoriscono i processi neurodegenerativi in modelli animali di PD (Gonzalez and Pacheco 2014). Tra i meccanismi ritenuti responsabili di quest'effetto vi è la produzione di interferone γ (IFN γ) e TNF α , entrambi mediatori proinfiammatori neurotossici in grado inoltre di favorire l'assunzione, da parte delle microglia, del fenotipo proinfiammatorio M1 (Codarri *et al.*, 2011; Barcia *et al.*, 2012; Sica e Mantovani 2012). I linfociti T CD4+ possono inoltre avere effetti antiinfiammatori nel SNC se presenti come linfociti T *helper* 2 (Th2) e linfociti T regolatori (Treg) (Appel 2009). I linfociti Th2 sono in grado di indurre il fenotipo antiinfiammatorio M2 nelle microglia

diminuendo la presenza della controparte M1, il che risulta nella diminuzione di mediatori neurotossici e nell'aumento di fattori neurotrofici necessari per la neurogenesi e la riparazione tissutale (Appel 2009); tra le citochine principali prodotte dai Th2 ritenute responsabili di questi effetti vi sono IL-4, IL-5 ed IL-13 (Badie *et al.* 2002; Fontenot *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2010; Wing *et al.*, 2011).

I linfociti Treg esprimono proteine antiinfiammatorie, come IL-10 e TGF- β , attraverso le quali riducono sia l'attività delle microglia M1 che dei linfociti Th1 (Badie *et al.* 2002; Fontenot *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2010; Wing *et al.*, 2011).

La differenziazione dei linfociti verso questi isotipi cellulari è determinata principalmente dalle citochine a cui essi sono esposti: IL-12 è la principale citochina che favorisce il differenziamento verso i Th1, IL-4, oltre ad essere prodotta dagli stessi Th2 può promuovere la loro differenziazione, mentre il TGF- β induce la differenziazione dei Treg.

Tutte queste evidenze sperimentali, infine, giustificano il recente interesse che si è sviluppato in tempi recenti per il ruolo che i linfociti T CD4⁺ rivestono nei meccanismi fisiopatologici alla base del PD, poiché la loro presenza nel SNC di topi trattati con MPTP è indispensabile per lo sviluppo del danno neuronale (Brochard *et al.*, 2009) ed inoltre, come riportato in precedenza, a seconda della sottopopolazione più abbondante nel SNC queste cellule possono favorire i

processi neuroinfiammatori e neurodegenerativi (Th1) o, alternativamente, indurre una risposta neuroprotettiva (Th2, Treg) (Anderson *et al.*, 2014)

1.3.3 Ipotesi di eziopatogenesi: Astrociti

Numerosi studi sia *in vitro* che *in vivo* mostrano che gli astrociti sono coinvolti nel processo neuroinfiammatorio del PD.

Queste cellule si attivano in risposta a vari stimoli proinfiammatori, comprese le citochine prodotte dalle microglia attivate, in risposta alle quali rilasciano ulteriori proteine e molecole proinfiammatorie e neurotossiche dando luogo al processo di gliosi reattiva, il quale è stato riscontrato in cervelli di pazienti affetti da PD (Yamada *et al.*, 1992 Saijo *et al.*, 2009).

Come le microglia, queste cellule rispondono a stimoli infiammatori come IL-1 β and TNF- α producendo citochine proinfiammatorie (Saijo *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2013).

Inoltre, è stato dimostrato che *in vivo* l'iperespressione di α sin negli astrociti provoca astrogliosi e morte dei neuroni dopaminergici (Gu *et al.*, 2010).

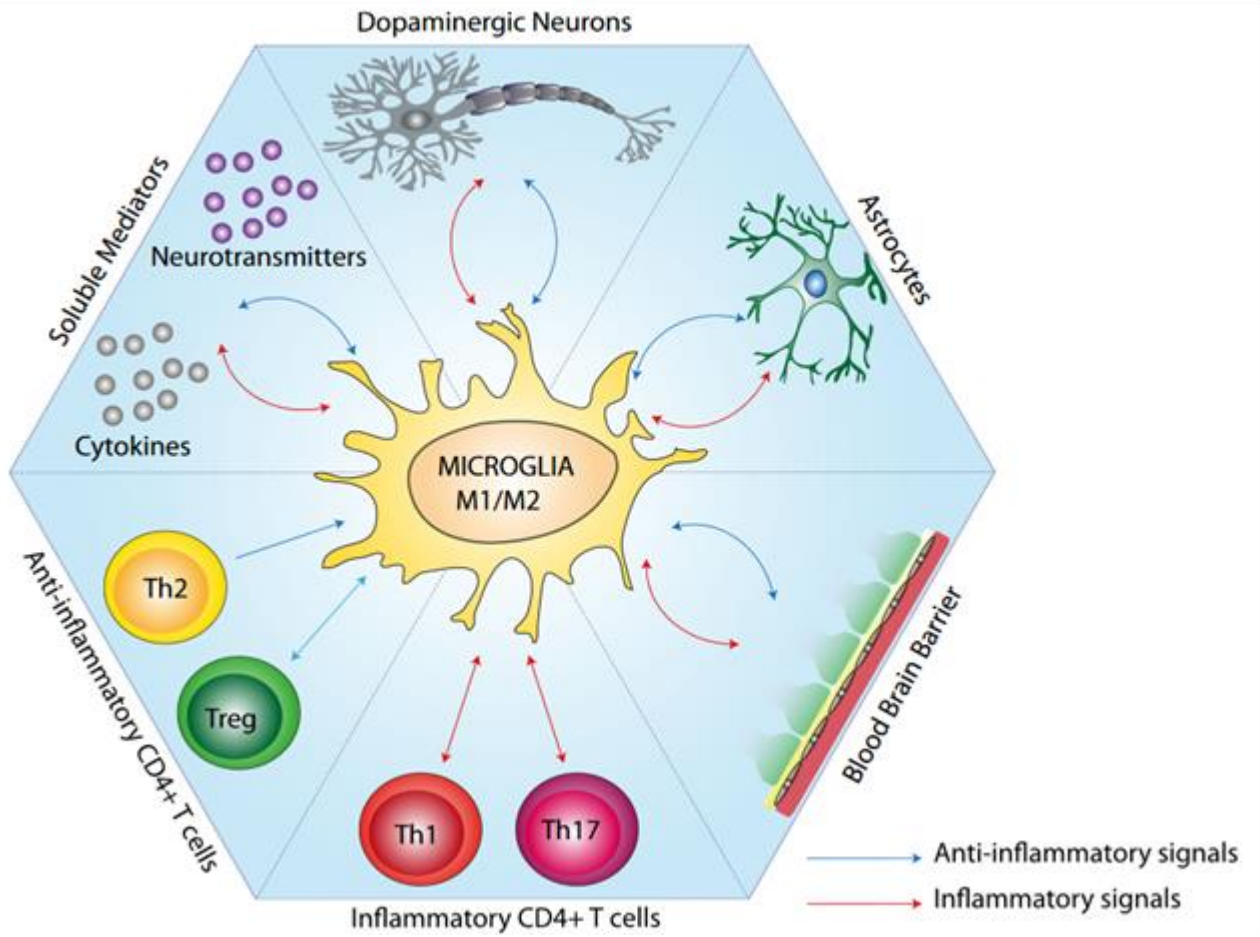


Figura 1 Ruolo delle cellule non neuronali nella neuroinfiammazione caratteristica del PD (tratto da Gonzalez *et al.*, 2015)

1.3.4 Trattamento farmacologico del morbo di Parkinson

Ad oggi la somministrazione di levodopa, precursore biosintetico della dopamina rappresenta la principale strategia terapeutica per questa patologia.

Questo approccio farmacologico, tuttavia, si limita alla mitigazione dei sintomi di questa patologia ma non contrasta la morte neuronale che ne è alla base; inoltre non è privo di effetti collaterali, difatti nei pazienti trattati con levodopa si manifestano l'effetto *on-off*, l'effetto *wearing off*, nausea, vomito e disordini psichici.

L'effetto *on-off* consiste nell'alternanza di periodi in cui il paziente effettua movimenti senza difficoltà (periodo *on*) a periodi in cui si presentano rigidità muscolare e difficoltà nell'iniziare movimenti (periodo *off*). Si pensa sia provocato dalle fluttuazioni nella concentrazione plasmatica della levodopa e dall'inefficace immagazzinamento della dopamina prodotta dai parte dei neuroni dopaminergici, i quali sono presenti in numero sempre più esiguo con l'avanzare della patologia. L'effetto *wearing off*, invece, rappresenta la perdita di efficacia di questo farmaco in stadi avanzati di questa patologia, in cui i neuroni dopaminergici, sono presenti in numero troppo limitato per controllare il tremore e gli altri sintomi, nonostante l'aumentata disponibilità di dopamina sintetizzata a partire dalla levodopa.

1.4 Il Morbo di Alzheimer

Descritto per la prima volta da Alois Alzheimer nel 1906, è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da un progressivo declino cognitivo e dalla morte dei neuroni colinergici a livello dell'ippocampo.

I primi sintomi che il paziente sviluppa sono spesso confusi con i normali sintomi dell'invecchiamento: il più comune è l'alterazione della memoria a breve termine, con conseguente incapacità di acquisire nuovi ricordi. Con il progredire della malattia si riscontrano alterazioni comportamentali, irritabilità, confusione, sbalzi di umore, difficoltà nel linguaggio e perdita della memoria a lungo termine (Tabert *et al.*, 2005). Tali sintomi, in particolare la perdita di memoria, sono dovuti ad una progressiva perdita di neuroni a livello dell'ippocampo, localizzato nella zona mediale del lobo temporale, il quale svolge un ruolo fondamentale nell'apprendimento e nella memoria a lungo termine.

I meccanismi fisiopatologici che portano allo sviluppo della malattia non sono stati del tutto delucidati, tuttavia si ritiene che siano innescati da una serie di fattori sia genetici che ambientali. Il rischio di sviluppare la malattia sembra fortemente legato all'età, difatti si stima che circa il 10% delle persone di età superiore a 65 anni, e circa il 25% delle persone di età superiore agli 80 anni sia affetto da AD (Herbert *et al.*, 2003). Inoltre in base all'età di insorgenza, sono distinguibili due sottotipi di AD: si parla di un sottotipo precoce se si manifesta prima dei 65 anni e di un sottotipo tardivo nel caso si sviluppi oltre i 65 anni ed una ulteriore distinzione può essere fatta in base alla presenza o all'assenza di

una componente ereditaria per lo sviluppo della malattia. In base a tale distinzione si stima che circa il 75% dei casi di AD sia di natura sporadica, mentre il 25% dei casi sia di natura familiare, dovuti cioè a mutazioni sui cromosomi 14 e 21, che costituiscono una importante predisposizione genetica allo sviluppo della malattia. Le forme familiari si possono a loro volta suddividere in forme precoci familiari (AD2), sviluppate da più individui della stessa famiglia prima dei 65 anni, e forme tardive familiari (AD1, AD3, AD4), se sviluppate oltre i 65 anni. Segni istopatologici caratteristici del AD sono le placche senili ed i grovigli neurofibrillari, entrambi composti da aggregati proteici.

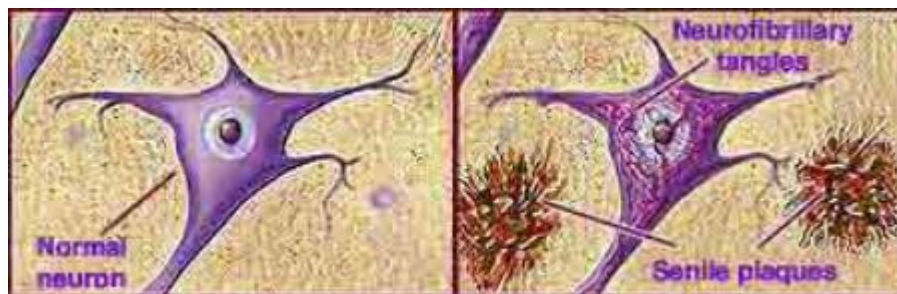


Figura 2 Rappresentazione degli aggregati proteici caratteristici del Morbo di Alzheimer

1.4.1. Placche senili

Le placche senili sono degli aggregati extracellulari costituiti da una parte esterna in cui si accumulano detriti neuronali, e da una parte centrale formata da aggregati di β -amiloide ($A\beta$), peptide derivante dall'errato processamento della *Amyloid Precursor protein* (APP), glicoproteina transmembranaria normalmente espressa dai neuroni (Walsh e Selkoe, 2007); la sua struttura presenta un lungo

dominio extracellulare all'N-terminale, un dominio transmembrana, che comprende al suo interno la sequenza amminoacidica corrispondente alla β -amiloide, ed un dominio C-terminale intracellulare. APP sembra avere funzioni neuroprotettive, neurotrofiche, di regolazione della concentrazione di calcio intracellulare mediante un meccanismo chinasi-dipendente (Mattson *et al.*, 1993), può inoltre fungere da canale trasportatore di cationi e da molecola di adesione (Shubert *et al.*, 1989; Thinakaran e Koo, 2008).

Il gene codificante per APP è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 21 (Goate *et al.*, 1991), esso genera una trascritto che può subire differenti processi di *splicing* alternativo portando alla formazione di isoforme differenti della proteina. Nel citoplasma APP è substrato principalmente di tre enzimi, denominati rispettivamente α , β e γ secretasi (Haas, 2004), seguendo due *pathway*, uno non-amiloidogenico ed uno amiloidogenico: nel primo caso si ha un'idrolisi da parte dell' α secretasi a livello del segmento transmembrana, nel mezzo della sequenza di A β (Esch *et al.* 1990; Sisodia *et al.*, 1990), generando un frammento solubile detto sAPP- α , ed un frammento transmembrana denominato C83, la cui successiva idrolisi da parte della γ secretasi produce il peptide P3, frammento non tossico di A β (Haas *et al.*, 1993). Il processo amiloidogenico, invece, inizia con un'idrolisi da parte della β secretasi, liberando sAPP- β , il frammento transmembranario residuo C99 è dunque bersaglio della γ secretasi, che può tagliarlo in vari punti, generando peptidi di lunghezza variabile.

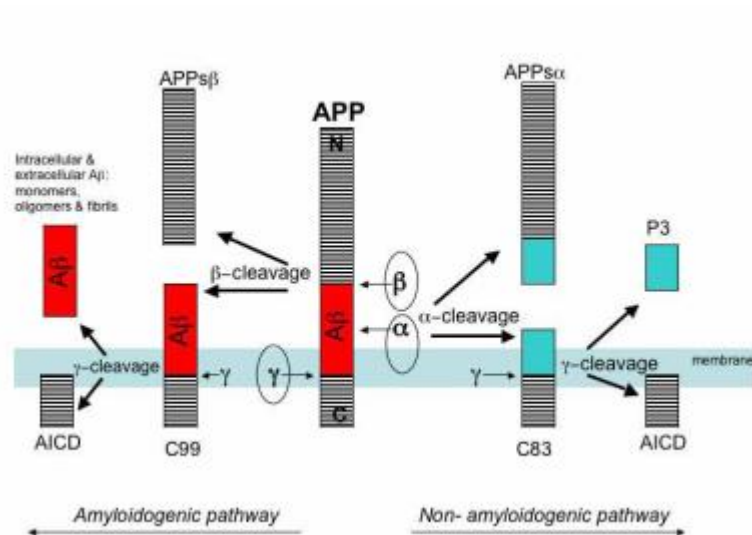


Figura 3. Idrolisi enzimatica di APP ad opera delle secretasi

Tra questi, il peptide A β di 42 amminoacidi risulta essere il pi \grave{u} tossico. L'eccessiva deposizione di A β nello spazio perineurale, che sembra essere legata ad una diminuzione della sua *clearance*, oppure ad una processazione di APP sbilanciata verso il *pathway* amiloidogenico tende a formare degli aggregati fibrillari dal diametro di 50-200 μ m, circondate da dendriti, assoni distrofici, cellule microgliali ed astrociti reattivi (Dickson, 1997).

1.4.2. Aggregati neurofibrillari

Oltre alle placche senili, l'AD presenta un altro elemento istopatologico caratteristico: i grovigli neurofibrillari. Questi sono degli aggregati intracellulari formati da filamenti a doppia elica della proteina τ , appartenente alla famiglia delle proteine associate ai microtubuli (Kosik *et al.*, 1986). La proteina τ partecipa alla polimerizzazione della tubulina, ed \grave{e} quindi coinvolta nella formazione e nella stabilizzazione dei microtubuli, elementi essenziali per il

mantenimento dell'integrità cellulare e per il trasporto assonale. I grovigli neurofibrillari portano al collasso dei microtubuli, compromettendo le funzioni sinaptiche e minando l'integrità strutturale dell'assone.

1.4.3. Terapia farmacologica del morbo di Alzheimer

Nonostante i recenti progressi nella comprensione dei processi di neurodegenerazione che sono alla base di AD, non sono ancora disponibili farmaci in grado di modificare il decorso clinico della malattia. L'approccio farmacologico attualmente adottato si propone di correggere gli squilibri dei neurotrasmettitori che si instaurano come conseguenza della morte neuronale. Si è rivelato efficace l'utilizzo degli inibitori delle acetilcolinesterasi, enzimi preposti all'idrolisi dell'acetilcolina con produzione di colina ed acetato. Inibendo questi enzimi si aumenta la concentrazione di acetilcolina negli spazi inter-sinaptici, potenziando l'azione del neurotrasmettitore e dunque l'attivazione post-sinaptica. Questa classe di farmaci si è dimostrata in grado di produrre un discreto miglioramento delle funzioni cognitive in pazienti affetti da AD di entità moderata, mentre resta in dubbio l'efficacia terapeutica sulle forme più severe.

Alcuni antiinfiammatori sono in grado di ritardare la neurodegenerazione; difatti numerosi mediatori dell'infiammazione, quali citochine e chemochine, sono frequentemente associati alla presenza di depositi di A β , favorendo l'aggregazione ed incrementandone la tossicità.

Un altro farmaco approvato nel trattamento dell'AD è la memantina, antagonista non competitivo del recettore dell' N- metildiaspartato (NMDA), il cui utilizzo è motivato dal fatto che nel SNC di pazienti affetti da AD è riscontrabile una deregolazione dell'omeostasi del calcio intracellulare, assieme ad una eccessiva attivazione del recettore NMDA (Sonkusare *et al.*, 2005), elementi che portano allo sviluppo di eccitotossicità. La memantina presenta una moderata affinità per il suo recettore, che blocca nel caso in cui sia presente un eccesso di glutammato ma, data la sua azione voltaggio dipendente, ne preserva l'attività fisiologica richiesta per garantire i processi di plasticità sinaptica coinvolti nell'apprendimento e nella memoria (Choan e Iqbal, 2006).

Attualmente nessun farmaco utilizzato in terapia sembra migliorare la prognosi della patologia, le strategie terapeutiche attuali sono finalizzate esclusivamente ad alleviarne i sintomi ed a rallentarne il decorso. Per tale motivo vi è dunque la necessità di introdurre in terapia nuove molecole in grado di intervenire sui meccanismi fisiopatologici alla base dell' AD, ed i cannabinoidi naturali e/o di sintesi, nonché molecole ad essi correlate, stanno suscitando un notevole interesse motivato dai loro effetti neuroprotettivi descritti in letteratura.

1.4.4 Gli endocannabinoidi nel morbo di Alzheimer

Diversi studi hanno rilevato alterazioni di vario tipo nel sistema endocannabinoide concomitanti con la presenza di AD.

Studi su cervelli *post-mortem* di individui affetti da AD hanno dimostrato che l'espressione dei recettori CB₁ e CB₂ è aumentata nella microglia situata a ridosso delle placche amiloidi (Ramirez *et al.*, 2005).

D'altro canto i recettori CB₁ e CB₂ sono stati trovati in forma nitrosilata nei pazienti affetti da AD, il che potrebbe impedirne l'accoppiamento alle proteine G effettrici, e dunque comprometterne la funzionalità.

Inoltre, l'espressione della *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), enzima responsabile del metabolismo degli endocannabinoidi, risulta aumentata a livello delle placche senili (Benito *et al.*, 2003).

Diversi studi sperimentali attribuiscono all' eCS un possibile ruolo neuroprotettivo nei confronti di diverse situazioni patologiche coinvolte nella patogenesi dell' AD, quali stress ossidativo, infiammazione ed eccitotossicità (Jackson *et al.*, 2005), suggerendo un suo possibile ruolo nell'ostacolare il processo neurodegenerativo e perciò offrire approcci terapeutici più efficaci nel trattamento di tale patologia (Pazos *et al.*, 2004).

L'interesse riguardo un possibile ruolo del sistema endocannabinoide nella terapia dell' AD è incrementato dal fatto che i suoi effetti farmacologici comprendono una serie di meccanismi propri di farmaci quali la memantina ed

alcuni farmaci antinfiammatori non steroidei, che ne hanno motivato l'utilizzo nella terapia di tale patologia. Evidenze sperimentali suggeriscono che l'attivazione dell'eCS possa avere un effetto neuroprotettivo in condizioni di eccitotossicità (Shen e Thayer, 1998) attraverso l'inibizione del rilascio di glutammato (Wang, 2003) e l'inibizione di canali voltaggio dipendenti permeabili al calcio. La produzione degli endocannabinoidi AEA e 2-AG in risposta ad aumentate concentrazioni di calcio intracellulare suggeriscono, anche in questo caso, un ruolo di controllo a feedback per fenomeni di eccitotossicità (Van Der Stelt *et al.*, 2006).

La gliosi e la degenerazione dei neuroni a livello dell'ippocampo causati da A β sono stati associati ad un aumento della produzione di 2-AG, il che potrebbe significare che il sistema endocannabinoide si possa attivare in risposta ad un danno neuronale, rappresentando un tentativo di neuroprotezione da parte dell'organismo. Tale ipotesi sembra confermata dal fatto che potenziando l'attività degli endocannabinoidi, mediante somministrazione di un inibitore del loro uptake, il VDM-11, si ottiene una riduzione della tossicità indotta da A β (Van Der Stelt *et al.*, 2006).

1.4.5 Fitocannabinoidi non psicoattivi nel morbo di Alzheimer

I fitocannabinoidi maggiormente presenti nella *cannabis* sono il THC, responsabile dei suoi effetti psicotropi ed il cannabidiolo (CBD), il cui studio risulta particolarmente interessante quale potenziale candidato per la terapia

farmacologica di varie patologie a causa della mancanza di effetti psicoattivi. Difatti, è stato dimostrato che il CBD ha effetti antiossidanti, antinfiammatori ed antiaggreganti (De filippis *et al.*, 2011; Esposito *et al.*, 2011). Il CBD ha dimostrato di avere effetti neuroprotettivi dovuti alle sue proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie ed antiapoptotiche. Gli effetti neuroprotettivi del CBD sembrano confermati anche in modelli in vivo: in topi soggetti a somministrazione di A β si è riscontrata un'attenuata attivazione delle cellule gliali ed un diminuito rilascio di mediatori proinfiammatori che si manifestavano in modo dose-dipendente (Esposito *et al.*, 2006).

La cannabidivarina (CBDV) è un fitocannabinoide isolato per la prima volta nel 1969 (Vollner *et al.*, 1969) la cui struttura è analoga a quella del CBD con il quale condivide la mancanza di effetti psicotropi, elementi che incoraggiano lo studio di tale molecola per un possibile impiego terapeutico. I meccanismi che sottendono agli effetti farmacologici della CBDV non sono stati del tutto chiariti, ma si ritiene che si esplicano con un meccanismo CB2- dipendente (Scutt e Williamson, 2007). Recentemente alcune evidenze sperimentali hanno suggerito che la CBDV possa agire da agonista per i canali *transient receptor potential ankyrin 1* (TRPA1), *transient receptor potential vanilloid receptor 1* (TRPV1) e *transient receptor potential vanilloid receptor 2* (TRPV2); inoltre la CBDV ha mostrato un effetto inibitorio *in vitro* sulla diacilglicerolo lipasi α (De Petrocellis *et al.*, 2011), enzima fondamentale nella sintesi del 2-arachidonoilglicerolo (Bisogno *et al.*, 2003). Sebbene questi effetti non siano

ancora stati confermati *in vivo*, mostrano la complessità del meccanismo di azione dei cannabinoidi non THC-correlati, che interagiscono con diversi bersagli, oltre che con i recettori per gli endocannabinoidi. Benchè i meccanismi molecolari alla base dell'attività della CBDV non siano stati del tutto chiariti, sono noti alcuni suoi effetti farmacologici: essa ha dimostrato, in maniera analoga ad altri fitocannabinoidi, di avere attività anticonvulsivante in vari modelli di epilessia (Hill *et al.*, 2012) e di stimolare il reclutamento di cellule staminali mesenchimali quiescenti dal midollo osseo (Scutt e Williamson, 2007).

1.5 Obiettivo dello studio

Il presente studio ha avuto come obiettivo la valutazione l'effetto di molecole correlate al sistema endocannabinoide sulle cellule non neuronali ritenute, ad oggi, maggiormente coinvolte nell'eziopatogenesi del morbo di Parkinson e del morbo di Alzheimer. Inizialmente nel modello murino di PD indotto da MPTP sono stati valutati gli effetti dell'inibizione dell'enzima MAGL, ottenuta mediante somministrazione di JZL-184, e dell'attivazione del recettore CB₂ da parte dell'agonista HU-308. In seguito è stato valutato l'effetto della cannabidivarina, fitocannabinoide non psicoattivo, in un modello chimico di AD.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Modello animale di Parkinson

Sono stati utilizzati topi C57/BL6 di età compresa tra 8-10 settimane (peso tra 22-30g).

Gli animali sono stati stabulati in gabbie di propilene con libero accesso a cibo ed acqua, con un ciclo giorno-notte di 12 ore (07.00-19.00), e temperatura dello stabulario di $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ed umidità relativa di $55\pm 10\%$. Gli animali hanno ricevuto 4 iniezioni intraperitoneali di 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetraidropiridina (MPTP) (20mg/kg) in topi C57/BL6. L'MPTP è una neurotossina che provoca una perdita di neuroni dopaminergici a livello della *substantia nigra* evocando i sintomi tipici del PD (Jackson-Lewis et al., 2007). Le somministrazioni sono state eseguite ogni 2 ore in un arco di tempo totale di 8 ore. Dopo 24 ore dall'ultima somministrazione di MPTP, gli animali hanno ricevuto una volta al giorno per via intraperitoneale HU-308 (2mg/kg, Tocris), agonista selettivo dei recettori CB2 o di JZL184 (1 mg/kg, Tocris), inibitore dell'enzima MAGL, precedentemente solubilizzati in soluzione fisiologica per iniezioni con DMSO 10%. Il settimo giorno dalla somministrazione di MPTP è stato effettuato il *rotarod test*. E' stata dunque effettuata l'eutanasia degli animali con CO₂ e ne sono stati prelevati i cervelli, in seguito ulteriormente dissezionati al fine di isolarne il mesencefalo.

2.2 Rotarod

Gli animali sono stati sottoposti al test del rotarod 7 giorni dopo la somministrazione di MPTP, nel quale è stato misurato il tempo che gli animali riuscivano a trascorrere in equilibrio su una barra rotante ad accelerazione costante. L'apparato era programmato per passare da una velocità di 4 rpm ad un massimo di 40 rpm in 5 minuti. Ogni animale è stato sottoposto a 3 prove consecutive, distanziate tra loro da un minimo di 30 minuti, ed il tempo massimo misurabile è stato fissato a 5 minuti. Per ogni animale il risultato finale è rappresentato dal tempo medio dei 3 test.

2.3 Modello di tossicità da β -amiloide

Gli esperimenti sono stati condotti su topi maschi C57/BL6 del peso di 25-30 grammi. L'operazione chirurgica necessaria alla somministrazione intracerebroventricolare (icv) è stata eseguita attenendosi al metodo descritto da Haley e McCormick (1957). Agli animali sono stati somministrati, rispettivamente, circa 5 μ L di A β (0.1 mg/kg) o PBS, la somministrazione è avvenuta nel ventricolo cerebrale sinistro, dunque a -2mm in senso antero posteriore e -2mm in senso medio laterale dal bregma, ed è stata effettuata utilizzando un ago con una battuta di 2mm con una velocità di circa 1 μ L/10 secondi (Martin-Moreno *et al.*, 2011).

Gli animali trattati con A β , dopo la somministrazione icv, sono stati sottoposti ad un ciclo di somministrazioni rispettivamente di CBDV ip (20mg/kg) e di una

soluzione di DMSO 10% V/V ip effettuate giornalmente per la prima settimana ed in giorni alterni per le 2 settimane successive, per un totale di 11 somministrazioni per animale in un intervallo di tempo di 20 giorni. Il giorno successivo all'ultima somministrazione gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia in ambiente saturo di CO₂ ed i cervelli sono stati prelevati e ne sono stati isolati gli ippocampi ipsolaterali per ulteriori indagini biochimiche.

2.4 β -Amiloide

La β -amiloide (Tocris) è stata disciolta in un volume di PBS sterile tale da ottenere una soluzione con concentrazione di 0,5 μ g/ μ L, che veniva dunque lasciata ad una temperatura di 37° per 24 ore, nelle quali era sottoposta a agitazione ogni 2 ore, in modo da favorire la formazione di strutture aggregate.

2.5 Cannabidivarina

La dose di CBDV somministrata è di 20mg/kg disciolta in una soluzione di DMSO al 10% V/V, soluzione salina 89% V/V, Tween 0.1% V/V; soluzione risultante è stata sottoposta a 3 cicli di sonicazione della durata di 20 secondi ciascuno.

2.6 Y maze

Per valutare le capacità cognitive e mnemoniche dei topi trattati con β amiloide è stato effettuato il Y maze test. I topi venivano posti nel labirinto singolarmente e venivano registrate per 5 minuti il numero di alternanze corrette effettuate durante il percorso, dove un'alternanza corretta rappresenta l'entrata consecutiva in tutte e tre le braccia del labirinto.

2.7 Western Blot

L'espressione di proteine pro-infiammatorie ed associate alle cellule non neuronali è stata valutata mediante la tecnica del western blot, effettuata sugli estratti proteici tissutali ottenuti dal mesencefalo dei topi trattati con MPTP.

Le proteine degli estratti sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su una membrana di nitrocellulosa, dopodichè le membrane sono state trattate con anticorpi primari specifici per CB₁, CB₂, MAGL, cicloossigenasi 2 (COX-2), proteina fibrillare acida della glia (GFAP), *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba1), Tirosina Idrossilasi (TH) e actina. Successivamente sono stati aggiunti gli opportuni anticorpi secondari marcati con *horse radish peroxydase* (HRP) ed il segnale è stato rilevato mediante la metodica dell'*enhanced chemiluminescence*.

2.8 Real time PCR

Immediatamente dopo l'eutanasia degli animali, i campioni di mesencefalo sono stati posti in una soluzione di RNA ladder (Sigma-Aldrich) e congelati a -80° prima di essere ulteriormente processati. L'mRNA totale è stato estratto utilizzando un PureLink RNA Micro Scale Kit (Invitrogen) e retrotrascritto mediante l'uso di iScript mix (Biorad).

Le analisi di PCR quantitativa sono state effettuate in un apparato per PCR real-time CFX384 (Bio-Rad) mediante l'utilizzo di SsoAdvanced SYBR Green supermix (Biorad), utilizzata seguendo le istruzioni del produttore, e di primer specifici. Ogni campione è stato analizzato in quadruplicato e ne sono stati determinati i cicli soglia (Ct). Il Ct medio di ogni gruppo sperimentale è stato normalizzato utilizzando un gene di *housekeeping* (la proteina ribosomiale S16) mediante la formula del $2^{-\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

2.9 Citofluorimetria di flusso

Immediatamente dopo l'eutanasia i mesencefali sono stati cellularizzati utilizzando un *neural tissue dissociation kit* (Miltenyi) utilizzato secondo la metodica prevista dal produttore, ed incubati per 15 minuti con anticorpi marcati con sonde fluorescenti specifici rispettivamente per CD3, CD4, CXCR3, CXCR4, FoxP3. Prima di incubare le cellule con l'anticorpo anti Foxp3, queste sono state sottoposte a fissazione e permeabilizzazione (Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set; eBioscience, utilizzato secondo le istruzioni riportate

dal produttore) al fine di permettere l'accesso al nucleo cellulare agli anticorpi. I campioni sono stati dunque analizzati mediante un citofluorimetro C6 BD Accuri (BD). Il *gating* dei linfociti è stato posizionato sulle cellule CD3/CD4 positive e la conta dei subset (Th1, Th2, Treg) è stata eseguita all'interno di tale *gate*.

2.10 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad Prism 6.0. I risultati sono stati espressi come la media \pm SEM di n esperimenti. Per determinare la significatività statistica è stato utilizzato il t test di Student per comparare la media di un singolo trattamento con la media di un gruppo di controllo, ed il one-way ANOVA seguito dal test Turkey per comparare trattamenti multipli. I risultati con $P < 0.05$ sono stati considerati significativi.

3. RISULTATI

3.1 Modello di Parkinson

3.2.1 Alterazioni dell'espressione di recettori ed enzimi del sistema endocannabinoide nel modello sperimentale

Al fine di valutare le variazioni indotte da MPTP nella trascrizione dei geni dei principali recettori ed enzimi del sistema endocannabinoide, sono stati effettuati esperimenti di real-time PCR e di western blot. Tra i geni oggetto di analisi, abbiamo riscontrato un aumento significativo, nei topi trattati con MPTP, dei geni *cnr2*, codificante per il recettore CB₂ (Figura 4), FAAH e *abdh4*, enzimi coinvolti rispettivamente nella degradazione (Figura 5A) e nella sintesi (figura 5B) dell'anandamide, e di *abdh12* e MAGL (entrambi responsabili della degradazione del 2-AG).

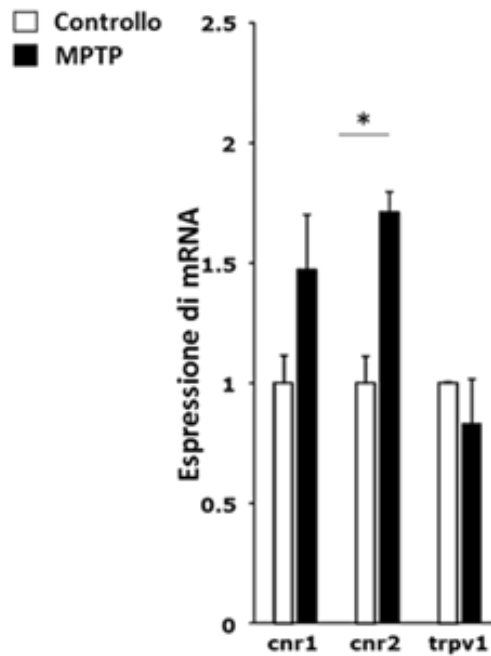


Figura 4. Espressione dell'mRNA dei geni per recettori del sistema endocannabinoide (CB₁, CB₂ e TRPV1) nel mesencefalo di topi trattati con MPTP. I risultati sono stati normalizzati con la formula del $2^{-\Delta(\text{CT})}$ ed espressi come media \pm SEM (n=5). * P < 0,05 vs controllo

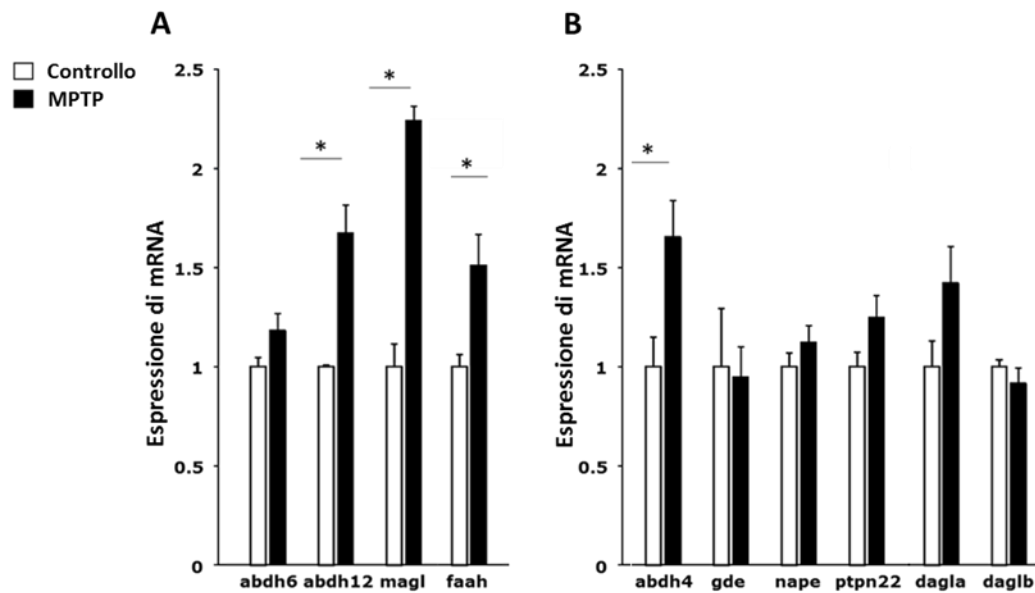


Figura 5. Espressione dell'mRNA dei geni codificanti per gli enzimi di degradazione (A) ed enzimi di sintesi (B) degli endocannabinoidi nel mesencefalo di topi trattati con MPTP. I risultati sono stati normalizzati con la formula del $2^{-\Delta(CT)}$ ed espressi come media \pm SEM (n=5). * P < 0,05 vs controllo

Mediante western blot è stata valutata l'espressione proteica dei recettori CB₁ e CB₂ e di MAGL (Figura 6). Mentre l'espressione di CB₁ non ha mostrato alterazioni in seguito al trattamento con MPTP, l'espressione di CB₂ e di MAGL risultano significativamente aumentate (Figura 7).

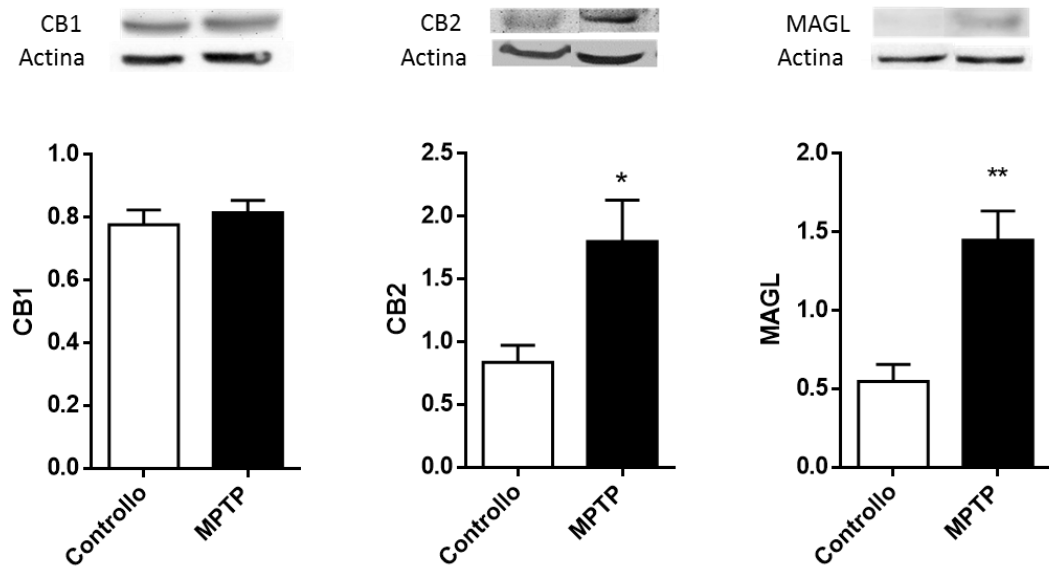


Figura 6: Espressione dei recettori CB₁, CB₂ e dell'enzima MAGL nel mesencefalo di topi trattati con MPTP, valutata mediante western blot. Il composto MPTP non ha provocato variazioni nell'espressione del recettore CB₁, mentre ha incrementato l'espressione del recettore CB₂ e dell'enzima MAGL. I risultati sono stati normalizzati sul segnale della β -actina (media \pm SEM, n=5).
* $P < 0,05$ vs controllo

3.2.2 MPTP attiva le microglia nel fenotipo M1 e aumenta la trascrizione di proteine che favoriscono la proliferazione dei linfociti Th1

Per avere informazioni sulla risposta delle cellule non neuronali al trattamento con MPTP, sono state condotte delle analisi di real-time PCR per quantificare il livello di trascrizione di vari geni coinvolti nella loro attivazione. Tra i geni oggetto di analisi, abbiamo riscontrato, nel mesencefalo di topi trattati con MPTP, un aumento significativo nella trascrizione dei geni codificanti per arginasi 1 (Arg1) (figura 7A), proteina espressa dalle microglia nello stato proinfiammatorio M1, una significativa diminuzione della trascrizione dell'mRNA di FIZZ1 (figura 7B) proteina espressa dalle microglia nello stato anti-infiammatorio M2, un aumento della trascrizione di IL-12 (figura 7C) una delle principali citochine che media la difesa immunitaria contro i parassiti intracellulari, la quale polarizza la risposta linfocitaria verso la sottopopolazione Th1, e di tbet (figura 7D), principale fattore trascrizionale dei linfociti Th1.

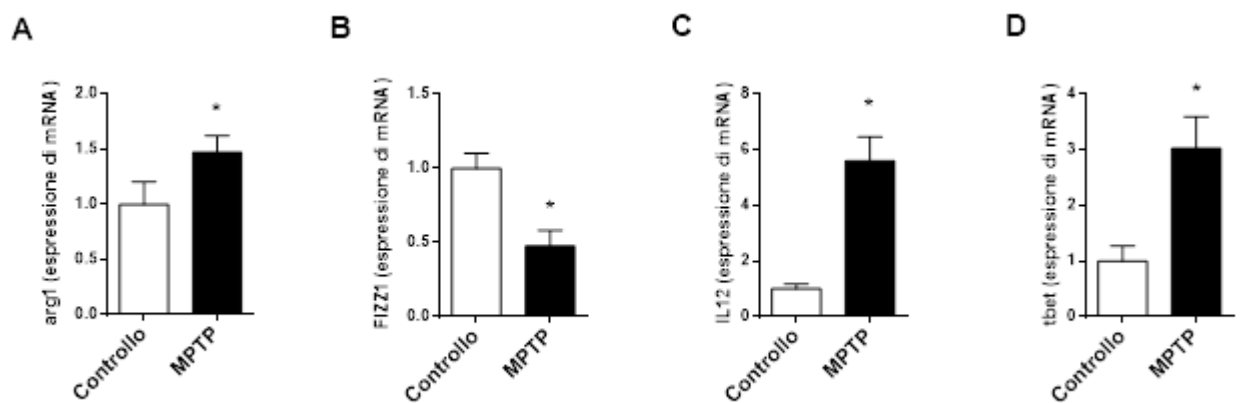


Figura 7. Espressione dell'mRNA di geni associati all'attivazione delle microglia e dei linfociti T CD4⁺ nel mesencefalo di topi trattati con MPTP. Tra i vari geni analizzati, il composto MPTP ha indotto un aumento nella trascrizione di arg1 (A) ed una riduzione dell'mRNA codificante per fizz1 (B), indicando un aumento delle microglia nel fenotipo M1 ed una riduzione di microglia nel fenotipo M2. Inoltre, l'MPTP ha aumentato la trascrizione di IL-12 (C), citochina che promuove la proliferazione dei linfociti Th1, e del loro principale fattore trascrizionale tbet (D). I risultati sono stati normalizzati con la formula del $2^{-\Delta(\text{CT})}$ ed espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. * P < 0,05 vs controllo

3.2.3 Il CB₂-agonista HU-308 e l'inibitore della MAGL JZL-184 migliorano le performance motorie e riducono la morte neuronale indotta da MPTP.

Per valutare l'effetto neuroprotettivo di HU-308 e di JZL-184 è stata valutata, mediante la tecnica del western blot, l'espressione della tirosina idrossilasi, i cui livelli all'interno del SNC sono direttamente correlabili al numero dei neuroni dopaminergici. I topi trattati con MPTP alla dose di 20 mg/kg mostrano una diminuzione significativa nell'espressione della tirosina idrossilasi rispetto ai topi trattati con il solo veicolo (figura 8). Il trattamento con JZL184 e con HU308 ripristina i valori alterati da MPTP, suggerendo che entrambi abbiano un effetto neuroprotettivo.

Per valutare se questi effetti fossero accompagnati da un effettivo miglioramento delle funzioni motorie è stato effettuato il test del rotarod, misurando il tempo in cui gli animali riuscivano a mantenersi in equilibrio su una barra rotante avente un'accelerazione costante. Mentre gli animali, trattati con MPTP hanno mostrato una notevole compromissione delle capacità motorie, la somministrazione ip di HU-308 alla dose di 2 mg/kg e di JZL-184 alla dose di 1 mg/kg ha indotto miglioramenti delle funzioni motorie (figura 9).

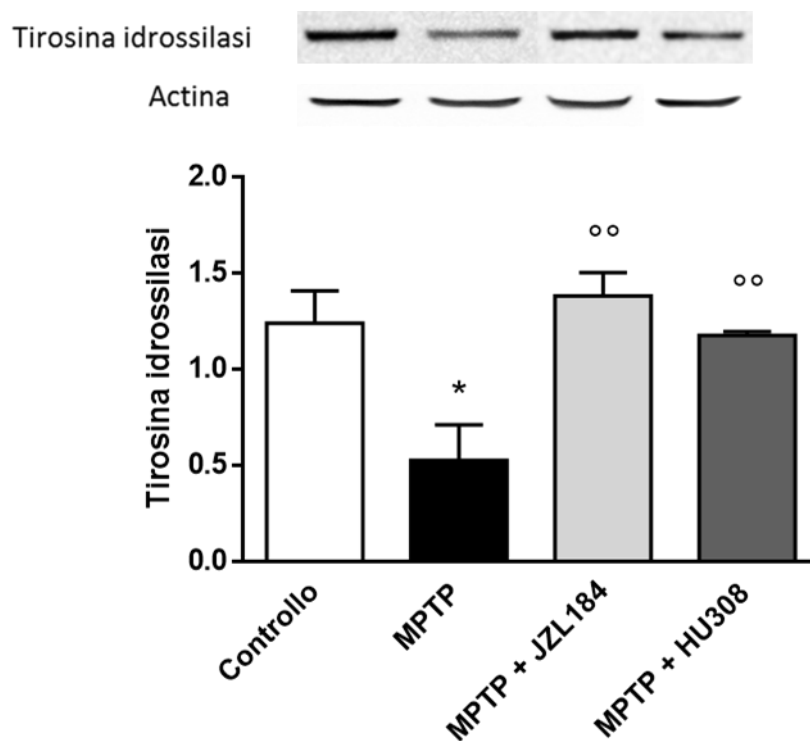


Figura 8. Variazioni nell'espressione di tirosina idrossilasi nel mesencefalo di topi trattati con MPTP, HU-308 (agonista CB₂) e JZL-184 (inibitore dell'enzima MAGL) valutata mediante western blot. Il composto MPTP riduce l'espressione di questo marker dei neuroni dopaminergici, mentre gli animali trattati con JZL-184 (1mg/kg) e HU-308 (2mg/kg) presentano livelli di tirosina idrossilasi nel mesencefalo simili a quelli degli animali di controllo. I risultati sono stati normalizzati sul segnale della β -actina e sono espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. * P < 0,05 vs control; ° P < 0,05 vs MPTP; °° P < 0,01 vs MPTP.

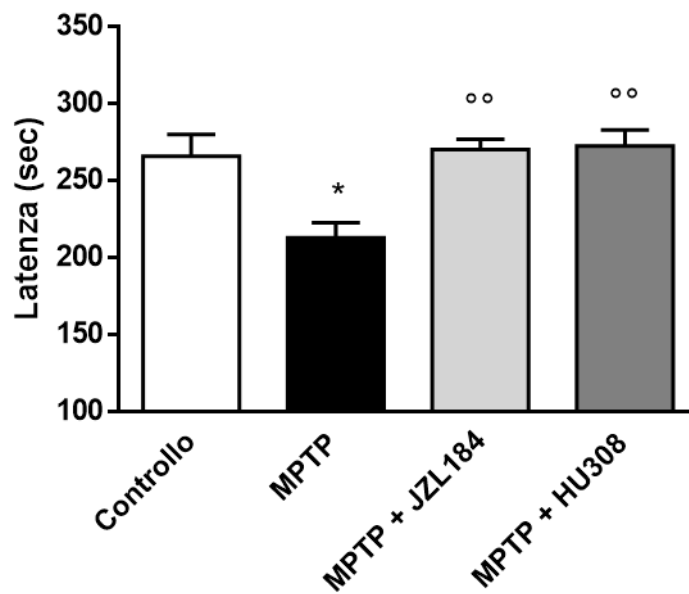


Figura 9. Performance motorie nel test del rotarod. Il composto MPTP ha ridotto le performance motorie degli animali, effetto revertito da JZL184 (1mg/kg) e HU308 (2mg/kg). I risultati sono espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. ** $P < 0,01$ vs controllo; °° $P < 0,01$ vs MPTP

3.2.4 HU-308 e JZL-184 riducono la neuroinfiammazione e l'attivazione delle microglia in topi trattati con MPTP

Al fine di valutare gli effetti di HU-308 e JZL-184 sulla gliosi e sull'infiammazione nel mesencefalo, è stata valutata l'espressione di Iba1, GFAP e COX-2 mediante western blot.

La proteina Iba1 è risultata iperespressa in seguito al trattamento con MPTP, indicando un aumento della proliferazione delle cellule microgliali, mentre gli animali che hanno ricevuto MPTP più, rispettivamente, JZL184 ed HU308, mostrano livelli di Iba 1 paragonabili a quelli degli animali di controllo (figura 10A).

Per valutare il livello di proliferazione delle cellule astrogliali nel mesencefalo è stata quantificata l'espressione della proteina GFAP, espressa in maniera selettiva dagli astrociti. I topi trattati con MPTP mostrano livelli significativamente aumentati di GFAP nel mesencefalo, mentre la somministrazione ip di HU-308 e JZL-184 non ha provocato variazioni significative (figura10B).

Infine, la somministrazione di MPTP ha aumentato in maniera significativa l'espressione di COX-2, che invece risulta ridotta dalla somministrazione concomitante di HU308 e JZL184 a livelli paragonabili a quelli del gruppo di controllo (figura 10C).

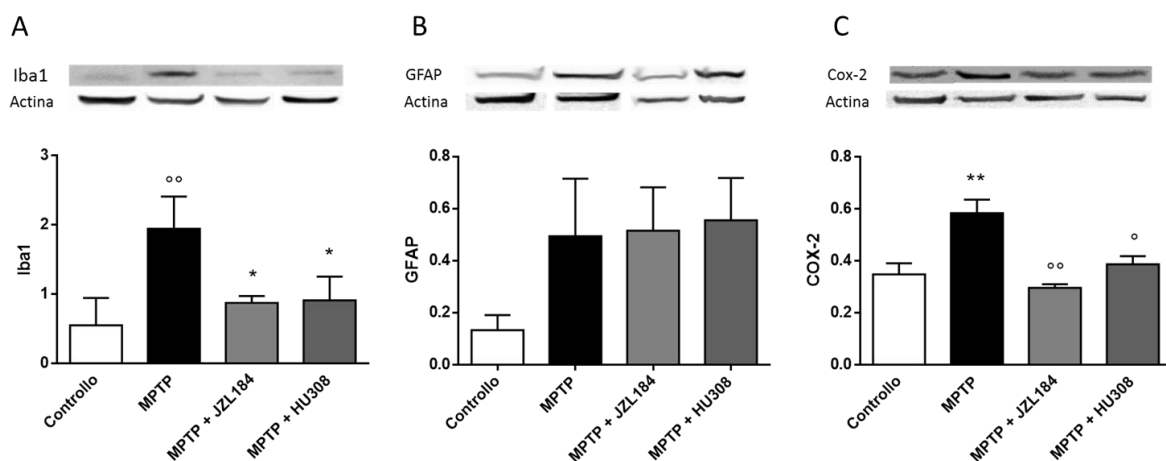


Figura 10 Effetto dell'agonista CB₂ HU-308 (2 mg/kg) e dell'inibitore dell'enzima MAGL JZL-184 (1 mg/kg) sull'espressione di Iba1 (A), GFAP (B) e COX-2 (C) nel mesencefalo di topi trattati con MPTP valutata mediante western blot. MPTP provoca un aumento dell'espressione della proteina microgliale iba1, della proteina astrogliale GFAP e di COX-2, mentre il trattamento con HU-308 e JZL-184 ha ridotto l'espressione di Iba1 e COX-2, ma non ha provocato variazioni nell'espressione di GFAP. I risultati sono stati normalizzati sul segnale della β actina e rappresentano la media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. * P < 0,05 vs controllo; ** P < 0,01 vs controllo ° P < 0,05 vs MPTP; °° P < 0,01 vs MPTP

3.2.5 JZL-184 riduce il numero di linfociti T CD4⁺ nel mesencefalo

Al fine di quantificare l'abbondanza dei linfociti T CD4⁺ e delle sottopopolazioni Th1, Th2 e Treg nel mesencefalo di topi trattati con MPTP ed MPTP in combinazione con, rispettivamente, JZL184 e HU308, i tessuti sono stati sottoposti a citofluometria di flusso. Il numero di linfociti T CD4⁺ tende ad aumentare, anche se non in maniera significativa, negli animali trattati con MPTP (figura 11A), mentre JZL184 ne riduce la percentuale rispetto agli animali trattati con MPTP. La sottopopolazione Th1, la quale secondo recenti evidenze svolge un importante ruolo neurotossico nel PD, risulta aumentata in seguito al trattamento con MPTP mentre il JZL184 ne ripristina i livelli fisiologici (Figura 11B). Per quanto riguarda i linfociti Th2 e Treg, non abbiamo riscontrato variazioni significative nei vari gruppi sperimentali, fatta eccezione per una riduzione dei linfociti Th2 indotta da JZL184 rispetto agli animali trattati con MPTP (dati non mostrati).

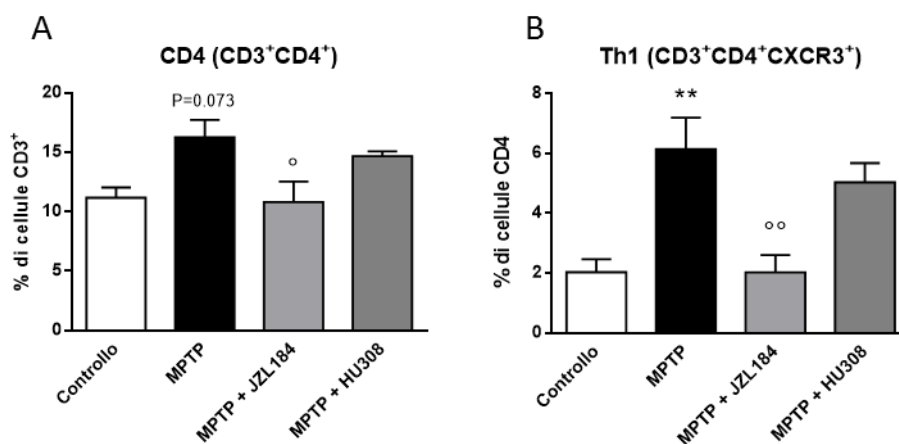


Figura 11. Percentuali di cellule CD4 e Th1 nel mesencefalo di topi trattati con MPTP, HU-308 e JZL-184 valutate mediante citofluorimetria di flusso. Il trattamento con MPTP ha incrementato il numero di cellule CD4⁺ ed il numero di linfociti Th1, entrambi invece ridotti dal trattamento con JZL-184. I risultati sono espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. * P < 0,05 vs Controllo; ** P<0,01 vs Controllo; ° P < 0,05 vs MPTP; °° P < 0,01 vs MPTP.

3.1 Modello di Alzheimer

3.1.1 La CBDV riduce l'attivazione gliale *in vivo*

L'attivazione e la proliferazione gliale *in vivo* sono state valutate quantificando l'espressione della proteina S100B mediante un saggio ELISA. Inoltre, l'espressione della proteina astrogliale GFAP, utilizzata come *marker* di proliferazione, è stata valutata mediante western blot.

In animali trattati che hanno ricevuto A β (icv) alla dose di 0.1 mg/kg l'espressione di S100B risultava significativamente aumentata rispetto al gruppo di controllo (animali che ricevevano solo veicolo icv (figura 5A).

Il trattamento ip con CBDV alla dose di 20 mg/kg riduceva l'espressione di S100B a valori paragonabili a quelli del gruppo di controllo (figura 12A) suggerendo dunque un marcato effetto sull'attivazione e proliferazione delle cellule gliali da parte di tale molecola.

L'espressione della proteina GFAP ha mostrato un andamento analogo, infatti essa risultava incrementata in risposta al trattamento con A β rispetto al gruppo di controllo, mentre tale aumento era ridotto significativamente nei topi trattati con CBDV alla dose di 20mg/kg (figura 12B).

Per confermare la risposta gliotica alla β amiloide e l'effetto della CBDV, è stata valutata l'espressione della COX-2, *marker* pro-infiammatorio. Il trattamento

con CBDV alla dose di 20mg/kg provocava una riduzione significativa dell'espressione di COX-2 (figura 5C).

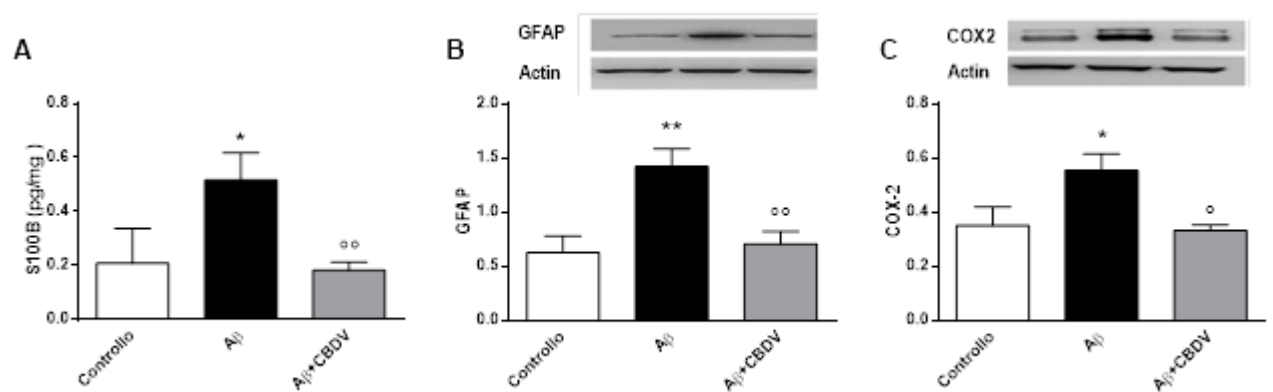


Figura 12. Effetto di CBDV (20mg/kg) sull'espressione di S100B (A), GFAP (B) e COX-2 (C) in ippocampi di topi in cui è stata indotta tossicità da β amiloide. I livelli di S100B sono stati valutati mediante un saggio ELISA, mentre l'espressione di GFAP e COX-2 è stata analizzata mediante western blot e normalizzata sull'espressione della β -actina. Le proteine S100B e GFAP, utilizzate quali marker di gliosi, così come l'enzima proinfiammatorio COX-2, risultano overesprese in seguito al trattamento con A β , effetto ridotto in maniera significativa dalla CBDV. I risultati sono espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. *P<0,05 vs controllo, ^oP<0,05 vs β amiloide, ^{oo}P<0,01 vs β amiloide.

3.1.2 La CBDV migliora le funzioni cognitive in animali trattati con A β

Il trattamento con CBDV ha inoltre migliorato le performance degli animali nel Y-maze test. Nei nostri esperimenti, mentre gli animali trattati con sola A β mostravano una compromissione delle funzioni cognitive, gli animali che hanno ricevuto anche CBDV ip hanno mostrato un comportamento simile agli animali di controllo (figura 13).

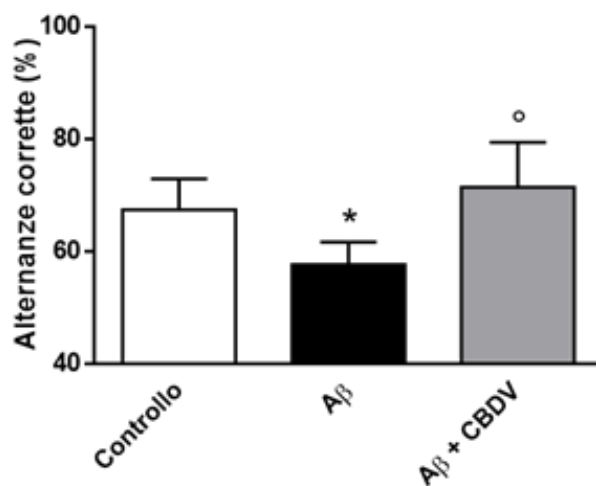


Figura 13. Funzioni cognitive valutate mediante il Y maze test. Gli animali che hanno ricevuto A β icv (0.1 mg/kg) mostrano una riduzione nelle funzioni cognitive, mentre i topi trattati con A β e CBDV (20 mg/kg) mostrano capacità mnemoniche simili a quelle del gruppo di controllo. I risultati sono espressi come media \pm SEM di 5 esperimenti indipendenti. *P<0,05 vs controllo, ° P<0,01 vs β amiloide (n=5).

4. DISCUSSIONE

Le malattie neurodegenerative costituiscono un insieme di condizioni patologiche accomunate da una lenta, progressiva ed irreversibile perdita di neuroni e sinapsi in determinate aree del SNC (Slovronsky *et al.*, 2006). La morte neuronale caratteristica di queste patologie è accompagnata dalla presenza di fenomeni infiammatori e dalla presenza di aggregati proteici peculiari di ogni patologia (Soto ed Estrada, 2008).

Di recente ha suscitato interesse lo studio del ruolo delle cellule non neuronali in queste patologie; infatti è stato dimostrato che sia le cellule gliali, come le microglia e le astroglia, che altre cellule provenienti dal torrente ematico, come i linfociti, possono contribuire alla neurodegenerazione in modelli animali (Blochard *et al.*, 2008; Hui *et al.*, 2016). Di conseguenza, il controllo farmacologico delle cellule non neuronali potrebbe rappresentare una strategia interessante nel trattamento di queste patologie.

4.1 Il morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson attualmente rappresenta la seconda patologia neurodegenerativa più diffusa (De Lau e Breteler, 2006), la quale è provocata dalla morte dei neuroni dopaminergici nella SNpc (Fearnley e Lees, 1991). Le opzioni terapeutiche disponibili ad oggi sono costituite esclusivamente da trattamenti sintomatici che puntano all'attenuazione dei suoi sintomi ma non

intervengono sui meccanismi fisiopatogenetici, che si è iniziato a comprendere solo di recente.

Le cellule gliali ed i linfociti sembrano rivestire un ruolo fondamentale nella neurodegenerazione di questa patologia. I dati presenti in letteratura suggeriscono l'instaurarsi di un meccanismo di natura immunologica che viene innescato dall' α -sin, il quale porta all'attivazione delle microglia tramite MHCII e dei linfociti T CD4⁺ (Blochard *et al.*, 2008; Harms *et al.*, 2013).

La modulazione del sistema endocannabinoide è ritenuta una strategia potenzialmente interessante nella terapia del PD, poiché nei gangli della base e nel cervelletto, aree del SNC preposte al controllo dei movimenti, vi è una presenza significativa dei recettori CB2 e TRPV1 (Herkenham *et al.*, 1991) e la trasmissione del sistema endocannabinoide risulta alterata, in tali aree, in pazienti affetti da PD (Lastres-Becker *et al.*, 2003). Inoltre, diverse evidenze sperimentali dimostrano che i cannabinoidi di origine naturale hanno effetti modulatori sulle aree cerebrali preposte al controllo dei movimenti (Muller-Vahl *et al.*, 1999). Oltre a questi effetti benefici sui sintomi del PD, il controllo del sistema endocannabinoide permette una riduzione della neuroinfiammazione caratteristica di questa patologia mediante la riduzione dell'espressione di molecole proinfiammatorie (Molina-Holgado *et al.*, 2003).

L' eCS esercita un controllo diretto sulle cellule non neuronali modulandone lo stato di attivazione. Infatti, le cellule gliali possono esprimere sia CB₁ che CB₂, la cui attivazione modula negativamente l'attività pro-infiammatoria delle

cellule non neuronali (Massi *et al.*, 2008). Inoltre, è stato dimostrato che agonisti dei recettori CB₁ e CB₂, possono ridurre l'attivazione delle cellule endoteliali indotta da stimoli pro-infiammatori (Wilhelmsen *et al.*, 2014). Di recente è stato dimostrato che, il WIN55,212-2, agonista non selettivo per i recettori CB₁ e CB₂, è in grado di ridurre la tossicità indotta da MPTP nel topo, diminuendo l'attivazione delle cellule gliali con un meccanismo CB₂-dipendente (Price *et al.*, 2009).

Nel modello sperimentale da noi utilizzato, il sistema endocannabinoide presenta diversi segni di disregolazione a livello del mesencefalo. Difatti, gli enzimi abdh12 e MAGL, responsabili della degradazione dell'endocannabinoide 2-AG, il quale fisiologicamente ha effetti antiinfiammatori (Alhouayek *et al.*, 2014) ed il recettore CB₂, la cui attivazione è associata allo spegnimento della risposta flogogena (Turcotte *et al.*, 2016), risultano overespressi in seguito alla somministrazione di MPTP.

Il composto MPTP nel nostro modello ha inoltre provocato un'attivazione delle cellule microgliali, valutata mediante l'aumento della trascrizione della proteina arginasi 1, indicando un aumento del numero di cellule microgliali aventi fenotipo M1 (neurotossico). Al contrario, la trascrizione della proteina FIZZ1 (marker delle microglia nello stato anti-infiammatorio M2) risulta ridotta in seguito alla somministrazione di MPTP. Inoltre, l'aumento della citochina IL-12 e del fattore trascrizionale T-bet, rispetto al gruppo di controllo, suggerisce una attivazione della risposta linfocitaria Th1-mediata. Questi dati di biologia

molecolare ci hanno portato ad utilizzare nei nostri esperimenti farmacologici un agonista del recettore CB₂ (HU-308) ed un inibitore della MAGL (JZL-184) per valutare se queste molecole potessero avere un effetto neuroprotettivo e se questo effetto potesse essere, almeno in parte, attribuibile all'inibizione delle cellule non neuronali. Nei nostri esperimenti, entrambi i farmaci si sono dimostrati neuroprotettivi poiché prevengono la riduzione dell'espressione, nel mesencefalo, della tirosina idrossilasi, *marker* dei neuroni dopaminergici, suggerendo un effetto positivo sui fenomeni neurodegenerativi indotti dall'MPTP.

A conferma dell'effetto protettivo sui neuroni, abbiamo valutato le *performance* motorie degli animali mediante il test del rotarod. Gli animali trattati con MPTP hanno mostrato delle compromissioni motorie rispetto agli animali di controllo, condizione migliorata in maniera significativa in seguito alla somministrazione di JZL-184 ed HU-308. Entrambi i farmaci hanno provocato effetti inibitori sulla proliferazione delle cellule microgliali, valutata come espressione di Iba1, il che è stato accompagnato da una riduzione dell'infiammazione mesencefalica, essendo l'espressione di COX-2 significativamente più bassa nei topi trattati con JZL-184 ed HU-308 rispetto agli animali che hanno ricevuto solo MPTP. Questi effetti, tuttavia, non sembrano coinvolgere le cellule astrogliali, poiché l'aumento di GFAP che si verifica in seguito alla somministrazione di MPTP non viene alterato dalla somministrazione concomitante di JZL-184 o HU-308.

Infine, il JZL-184, ma non HU-308, ha ridotto in maniera significativa la percentuale di linfociti T CD4⁺ totali e delle sottopopolazioni Th1 e Th2 presenti nel mesencefalo di topi trattati con MPTP, suggerendo un effetto immunosoppressivo su queste cellule, che di recente sono state indicate tra le principali cellule non neuronali responsabili della neurodegenerazione del PD.

In conclusione, nel modello animale di PD da noi utilizzato, l'agonista del recettore CB₂ HU-308 e l'inibitore dell'enzima MAGL JZL-184 hanno mostrato effetti neuroprotettivi nella tossicità da MPTP, riducendo la morte neuronale e migliorando le prestazioni motorie. Entrambi i farmaci hanno mostrato un effetto inibente sulla microglia, precedentemente attivata in seguito alla somministrazione di MPTP, effetto accompagnato da una riduzione della neuroinfiammazione. Il JZL-184, inoltre, ha ridotto la quantità di linfociti CD4 e di linfociti Th1 nel mesencefalo, dimostrando dunque di poter modificare quelli che sono ritenuti, ad oggi, i principali meccanismi fisiopatologici del PD, ovvero l'attivazione gliale, l'infiammazione e l'infiltrazione dei linfociti Th1 nel SNC.

4.2 Morbo di Alzheimer

Il morbo di Alzheimer è la patologia neurodegenerativa più diffusa. I sintomi principali comprendono alterazioni comportamentali, irritabilità, confusione, sbalzi di umore, difficoltà nel linguaggio e perdita della memoria a lungo termine (Tabert *et al.*, 2005). La neurodegenerazione colpisce neuroni e sinapsi a livello dell'ippocampo, che costituisce un'area cerebrale essenziale

nell'apprendimento e nella memoria a lungo termine (Scoville e Milner, 1957). Segni istopatologici caratteristici del morbo di Alzheimer sono le placche senili, aggregati extracellulari della proteina β amiloide (Hardy e Allson, 1991). Si ritiene che le cellule gliali giochino un ruolo cruciale nello sviluppo di questa patologia, poiché mentre in condizioni fisiologiche svolgono una funzione di supporto per i neuroni, se attivate possono produrre radicali liberi dell'ossigeno e molecole proinfiammatorie, contribuendo al progredire del danno neuronale (Arolt e Rothermundt, 2003; Lam *et al.*, 2001).

Attualmente vi è un vivo interesse nello studio dei fitocannabinoidi non psicoattivi nel morbo di Alzheimer, a causa dei loro effetti anti-infiammatori ed anti-gliotici. Difatti, è stato precedentemente dimostrato, in studi condotti nel nostro Dipartimento, che il CBD ha effetti sedativi, ipnotici, antiepilettici, anticonvulsivanti, antiossidanti ed antinfiammatori (Iuvone *et al.*, 2009). Gli effetti neuroprotettivi del CBD sembrano confermati anche in modelli *in vivo*: in topi soggetti a somministrazione di $A\beta$ si è riscontrata un'attenuata attivazione delle cellule gliali ed un diminuito rilascio di mediatori dell'infiammazione (Esposito *et al.*, 2006).

Questo ha incoraggiato ulteriori studi delle molecole correlate strutturalmente al CBD, e tra le molecole da noi precedentemente testate *in vitro*, la più attiva è risultata essere la CBDV, che è stata dunque sottoposta ad ulteriori indagini *in vivo*. I meccanismi che sottendono agli effetti farmacologici della CBDV non

sono stati del tutto chiariti, ma si ritiene che si esplichino alcune azioni, almeno in parte, con un meccanismo CB₂- dipendente (Scutt e Williamson, 2007).

La CBDV, utilizzata nei nostri esperimenti alla dose di 20mg/kg, ha ridotto l'espressione delle proteine astrogliali S100B e GFAP, entrambe precedentemente overesprese negli ippocampi di topi trattati con A β icv, suggerendo che questa molecola sia in grado di ridurre l'attivazione e la proliferazione degli astrociti indotta da A β . Difatti, i topi trattati con A β e CBDV mostrano livelli ridotti di neuroinfiammazione, valutata come espressione della proteina COX-2, rispetto agli animali che hanno ricevuto la sola A β . Questi effetti neuroprotettivi, inoltre, sono accompagnati da un miglioramento delle prestazioni cognitive nel Y maze test, poiché, mentre i topi trattati con sola A β mostrano una riduzione delle capacità mnemoniche, gli animali trattati con CBDV hanno un comportamento simile agli animali di controllo.

5. CONCLUSIONI

In ultima analisi, possiamo affermare che l'utilizzo di molecole correlate al sistema endocannabinoide possa rappresentare una valida strategia nella terapia dell'AD e del PD. Infatti, oltre a ridurre i fenomeni neuroinfiammatori ed i deficit cognitivi (AD) e motori (PD), tali molecole sono in grado di inibire le cellule ritenute, ad oggi, maggiormente coinvolte in queste patologie. Nello specifico, la cannabidivarina ha provocato effetti antigliotici sugli astrociti;

inoltre, l'inibizione della MAGL mediante JZL-184 e l'attivazione del recettore CB₂ da parte di HU-308 ha portato alla riduzione della proliferazione delle cellule microgliali. Infine, il JZL-184 ha ridotto in maniera significativa la presenza di linfociti CD4⁺ nel mesencefalo di topi trattati con MPTP. Collettivamente, i nostri risultati hanno fornito ulteriori spunti in relazione al ruolo dei cannabinoidi nelle malattie neurodegenerative e nella neuroinfiammazione.

6. BIBLIOGRAFIA

Alhouayek M, Masquelier J, Muccioli GG. Controlling 2-arachidonoylglycerol metabolism as an anti-inflammatory strategy. Drug Discov Today. 2014;19(3):295-304.

Anderson KM, Olson KE, Estes KA, Flanagan K, Gendelman HE, Mosley RL. Dual destructive and protective roles of adaptive immunity in neurodegenerative disorders. Transl Neurodegener. 2014 Nov 13;3(1):25.

Arolt V, Rothermundt M. Depressive disorders with somatic illnesses. Nervenarzt. 2003 Nov; 74 (11): 1033-1052.

Appel SH. CD4+ T cells mediate cytotoxicity in neurodegenerative diseases. J Clin Invest, 2009. 119:13–15.

Badie B, Bartley B, Schartner J. Differential expression of MHC class II and B7 costimulatory molecules by microglia in rodent gliomas. J Neuroimmunol. 2002 Dec;133(1-2):39-45.

Bahr BA, Karanian DA, Makanji SS, Makriyannis A. Targeting the endocannabinoid system in treating brain disorders. Expert Opin Investig Drugs 2006;15:351–365.

Barcia C, Ros CM, Annese V, Gomez A, Ros-Bernal F, Aguado-Llera D, Martinez-Pagan ME, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT (2012) IFN-gamma signaling, with the synergistic contribution of TNF-alpha, mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. Cell Death Dis 3:e379

Baruch K, Schwartz M. CNS-specific T cells shape brain function via the choroid plexus. Brain Behav Immun. 2013 Nov;34:11-6.

Benner EJ, Banerjee R, Reynolds AD, Sherman S, Pisarev VM, Tshiperson V, Nemachek C, Ciborowski P, Przedborski S, Mosley RL, Gendelman HE. Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. PLoS One. 2008 Jan 2;3(1):e1376.

Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. J Neurosci 23: 11136–11141.

Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A et al. (2003). Cloning of the first *sn1-DAG* lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163: 463–468.

Brochard V, Combadière B, Prigent A, Laouar Y, Perrin A, Beray-Berthet V, Bonduelle O, Alvarez-Fischer D, Callebert J, Launay JM, Duyckaerts C, Flavell RA, Hirsch EC, Hunot S. Infiltration of CD4⁺ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *J Clin Invest*. 2009 Jan;119(1):182-92.

Cabral GA, Dove Pettit DA. Drugs and immunity: cannabinoids and their role in decreased resistance to infectious disease. *J Neuroimmunol* 1998;83:116–123.

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*, 1998 Jul 16;394(6690):277-81.

Carlsson A, Fuxe K, Hamberger B, Malmfors T. Effect of a new series of bicyclic compounds with potential thymoleptic properties on the reserpine-resistant uptake mechanism of central and peripheral monoamine neurones in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol*. 1969 May;36(1):18-28.

Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B (2011) ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12:560–567

De Filippis D, Esposito G, Cirillo C, Cipriano M, De Winter BY, Scuderi C, Sarnelli G, Cuomo R, Steardo L, De Man JG, Iuvone T. Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One*. 2011;6(12):e28159.

De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allara M, Bisogno T, Petrosino S et al.. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*, 2011. 163: 1479–1494.

De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006 Jun;5(6):525-35.

Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinlan KM, Czeh G, Lynch KR, Kipnis J. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med*. 2010 May 10;207(5):1067-80.

Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Jarbe TU, Eisen MS, Mechoulam R. A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1992 May 29; 35 (11): 2065-9

DeWitt D. C., Rhoades E. (2013). α -Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry* 52, 2385–2387.

Dickson DW The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997 Apr;56(4):321-39.

Dutta G, Barber DS, Zhang P, Doperalski NJ and Liu B: Involvement of dopaminergic neuronal cystatin C in neuronal injury-induced microglial activation and neurotoxicity. *J Neurochem* 122: 752-763, 2012

Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. 1990. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248: 1122–1124.

Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, Cipriano M, Carratù MR, Iuvone T, Steardo L. Cannabidiol reduces $A\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR γ involvement. *PLoS One.* 2011;6(12):e28668.

Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo AA, Iuvone T. The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med (Berl).* 2006 Mar;84(3):253-8.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991 Oct;114 (Pt 5):2283-301.

Ferrari CC, Pott Godoy MC, Tarelli R, Chertoff M, Depino AM, Pitossi FJ. Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1beta in the substantia nigra. *Neurobiol Dis.* 2006;24:183–93.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.

Frakes AE, Ferraiuolo L, Haidet-Phillips AM, Schmelzer L, Braun L, Miranda CJ, Ladner KJ, Bevan AK, Foust KD, Godbout JP, Popovich PG, Guttridge DC, Kaspar BK (2014) Microglia induce motor neuron death via the classical NF-kappaB pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 81:1009–1023

Garden GA, Moller T. Microglia biology in health and disease. *J neuroimmune pharmacol.* 2006 Jun; 1(2):127-37 .

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86,1646.

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW. Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 1995 Mar;20(3):269-87

Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991; 349:704–706.

Goedert M., Spillantini M. G., Del Tredici K., Braak H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 13–24. 10.

González H, Pacheco R. T-cell-mediated regulation of neuroinflammation involved in neurodegenerative diseases. *J Neuroinflammation.* 2014 Dec 2;11:201.

González H, Contreras F, Pacheco R. Regulation of the Neurodegenerative Process Associated to Parkinson's Disease by CD4+ T-cells. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 Dec;10(4):561-75.

Gu XL, Long CX, Sun L, Xie C, Lin X, Cai H. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain.* 2010;3:12.

Ha SK, Moon E, Lee P, Ryu JH, Oh MS, Kim SY. Acacetin attenuates neuroinflammation via regulation the response to LPS stimuli in vitro and in vivo. *Neurochem Res.* 2012;37:1560–7)

Haass C. 2004. Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23: 483–488.

Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ. 1993. Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann NY Acad Sci* 695: 109–116.

Haley TJ, McCormick WG. Pharmacological effect produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *Brit. J. pharmacol.* 12:12-15 (1957).

Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991 Oct;12(10):383-8.

Harms AS, Cao S, Rowse AL, Thome AD, Li X, Mangieri LR, Cron RQ, Shacka JJ, Raman C, Standaert DG. MHCII is required for α -synuclein-induced activation of microglia, CD4 T cell proliferation, and dopaminergic neurodegeneration. *J Neurosci.* 2013 Jun 5;33(23):9592-600.

Herbert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003). Alzheimer's disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archiv Neurol* 60: 1119–1122.

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: 563–583.

Hill AJ, MS Mercier, Hill TDM, Glyn SE, Jones NA, Yamasaki Y, Futamura T, Duncan M, Stott CG, Stephens GJ, Williams CM and Whalley BJ. Cannabidiol is anticonvulsant in mouse and rat. *British Journal of Pharmacology* (2012) 167 1629–1642

Hui CW, Zhang Y, Herrup K. Non-Neuronal Cells Are Required to Mediate the Effects of Neuroinflammation: Results from a Neuron-Enriched Culture System. *PLoS One.* 2016 Jan 20;11(1):e0147134..

Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA. Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from *Cannabis sativa*, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem.* 2004 Apr;89(1):134-41.

Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H. A., et al. . (1995). The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475.

Jackson SJ, Diemel LT, Pryce G, Baker D (2005). Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J Neurol Sci* 233: 21–25.

Kim HG, Ju MS, Ha SK, Lee H, Kim SY, Oh MS. Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull.* 2012;35:1287–94.

Kim WG, Mohny RP, Wilson B, et al. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci.* 2000;20:6309–16.

Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE. Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci.* 2005;25: 8240–8249.

Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Nacl Acad Sci USA.* 1986 jun; 83(11):4044-8

Lam AG, Koppal T, Akama KT, Guo L, Craft JM, Samy B, Schavocky JP, Watterson DM, Van Eldik LJ. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor Nf-kappaB. *Neurobiol aging.* 2001 sept; 22 (5): 765-72

Lastres-Becker I, de Miguel R, De Petrocellis L, Makriyannis A, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J. Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *J Neurochem.* 2003 Mar;84(5):1097-109.

Lewitus GM, Schwartz M. Behavioral immunization: immunity to self-antigens contributes to psychological stress resilience. *Mol Psychiatry.* 2009 May;14(5):532-6.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001Dec;25(4):402-8.

Loeffler DA, DeMaggio AJ, Juneau PL, et al. Effects of enhanced striatal dopamine turnover in vivo on glutathione oxidation. *Clin Neuropharmacol.* 1994;17:370–9.

Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 2005;95:437–445.

Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE. Beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993 Oct; 16(10): 409-14

Maroteaux L., Campanelli J. T., Scheller R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8, 2804–2815.

Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramiretz BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, De Ceballos ML. Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol.* 2011 Jun; 79 (6) : 964- 73

McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Szymkowski DE, Smith CG, Botterman BR, et al. Blocking soluble tumor necrosis factor signaling with dominant-negative tumor necrosis factor inhibitor attenuates loss of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2006;26:9365–75.

McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988;38:1285–91.

McGeer EG, McGeer PL. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:741–749.

Mechoulam R. *Cannabinoid geometry and biological activity.* CRC Press, Boca Raton 1992, FL, pp 1-33.

Molina-Holgado F, Lledo A, Guaza C (1997). Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* 8: 1929–1933.

Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ. Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci.* 2003; 23:6470–6474.

Müller-Vahl KR, Kolbe H, Schneider U, Emrich HM. Cannabis in movement disorders. *Forsch Komplementarmed.* 1999 Oct;6 Suppl 3:23-7.

Mukhopadhyay S, Das S, Williams EA, Moore D, Jones JD, Zahm DS et al. (2006). Lypopolysaccharide and cyclic AMP regulation of CB2 cannabinoid receptor levels in rat brain and mouse RAW 264.7 macrophages. *J Neuroimmunol* 181: 82–92.

Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY. Astrocytes accumulate Ab 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 2003 May 9; 971 (2): 197-209.

Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J (2004). Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci* 75: 1907–1915.

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997;74:129–180.

Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 2008; 153:199–215.

Pisanu A, Lecca D, Mulas G, Wardas J, Simbula G, Spiga S, et al. Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;71:280–91.

Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Wagner R, Ferri C. The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia* 9 (2013) 63–75

Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA (2000). Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* 29: 58–69.

Radjavi A, Smirnov I, Kipnis J. Brain antigen-reactive CD4+ T cells are sufficient to support learning behavior in mice with limited T cell repertoire. *Brain Behav Immun.* 2014 Jan;35:58-63.

Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 2005;25:1904–1913.

Recasens A., Dehay B., Bove J., Carballo-Carbajal I., Dovero S., Perez-Villalba A., et al. . (2014). Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann. Neurol.* 75, 351–362.

Reynolds AD, Stone DK, Hutter JA, Benner EJ, Mosley RL, Gendelman HE. Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J Immunol*. 2010 Mar 1;184(5):2261-71.

Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*. 2009;137:47–5.

Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1957 Feb;20(1):11-21.

Scutt A, Williamson EM. Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcif Tissue Int*, 2007. 80: 50–59.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):787-95.

Sisodia S, KooE, Beyreuther, Price D. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, 27 April 1990: Vol. 248 no. 4954 pp. 492-495

Small E, Beckstead H. Cannabinoid phenotypes in cannabis sativa. *Nature* 1973: (245); 143-8

Small, E. and H. D. Beckstead. 1973. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis. *Lloydia* 36: 144–165.

Shen M, Thayer SA (1998). Cannabinoid receptor agonists protect cultured mouse hippocampal neurons from excitotoxicity. *Brain Res* 783: 77–84.

Shubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G. The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* .1989 Dec;3(6):689-94

SmithPB, Compton DR, Welch SP, Razdan RK, Mechoulam R, Martin BR. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol exp ther*. 1994 Jul; 270 (1): 219-17

Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P (2005). Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope. *Pharmacol Res* 51: 1–17.

- Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: New concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* 2006;1:151–170.
- Soto C, Estrada LD. Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol* 2008;65:184–189.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Oct 4;215(1):89-97
- Tabert MH, Liu X, Doty RL, Serby M, Zamora D, Pelton GH, Marder K, Albers MW, Stern Y, Devanand DP (2005). A 10-item smell identification scale related to risk for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 58(1): 155–160.
- Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General anesthetics inhibit LPS-induced IL-1beta expression in glial cells. *PLoS One*. 2013;8:e82930
- Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008 Oct 31; 283(44):29615-9
- Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. The CB(2) receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4449-4470.
- Van Der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Mathias I, Petrosino S, De Filippis D et al. (2006). Endocannabinoids and b-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci* 63: 1410–1424.
- Vree TB, Breimer DD, Van Ginneken CA, Van Rossum JM. Identification in hashish of tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol analogues with a methyl side chain. *J Pharm Pharmacol*. 1972 Jan; 24 (1): 7-12.
- Vollner L, Bieniek D, Korte F (1969). [Hashish. XX. Cannabidivarin, a new hashish constituent]. *Tetrahedron Lett* 3: 145–147.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007). Ab oligomers: a decade of discovery. *J Neurochem* 101: 1172–1184.
- Wang SJ (2003). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of glutamate release from rat hippocampal synaptosomes. *Eur J Pharmacol* 469: 47–55.

Wing K, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Cell-autonomous and -non-autonomous roles of CTLA-4 in immune regulation. *Trends Immunol.* 2011 Sep;32(9):428-33.

Yamada T, Kawamata T, Walker DG, McGeer PL. Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol.* 1992;84:157–62.

Yoshida Y, Yoshimi R, Yoshii H, Kim D, Dey A, Xiong H, Munasinghe J, Yazawa I, O'Donovan MJ, Maximova OA, Sharma S, Zhu J, Wang H, Morse HC 3rd, Ozato K (2014) The transcription factor IRF8 activates integrin-mediated TGF-beta signaling and promotes neuroinflammation. *Immunity* 40:187–198

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53:337–351

Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 2011 Feb;25(2):181-213.

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 2006 Feb;9(2):268-75.

Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, et al. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2005;19:533–42.