

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

DIPARTIMENTO DI FARMACIA



TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZA DEL FARMACO

**RUOLO DELLA PALMITOILETANOLAMIDE
NEL CONTROLLO DEI PROCESSI DI
NEUROINFIAMMAZIONE E
NEURODEGENERAZIONE**

Coordinatore

Ch.ma Prof.ssa

M.Valeria D'Auria

Tutor

Ch.mo Prof.

Antonio Calignano

Candidata: Dott.ssa Carmen Avagliano

XXVI CICLO 2011-2014

*Se non puoi essere una via maestra, sii un sentiero.
Se non puoi essere il sole, sii una stella.
Sii sempre il meglio di ciò che sei.*

Martin Luther King

Ai miei genitori

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 6
1.1 La Palmitoiletanolamide (PEA)	pag. 7
1.1.1 Biosintesi ed inattivazione della PEA	pag. 9
1.1.2 Target della PEA	pag.11
1.2 Recettore attivato dalla proliferazione perossisomiale di tipo α (PPAR- α)	pag.16
1.3 Ruolo della PEA nell'inflammazone e nella risposta adattativa nel SNC	pag.19
1.4 La PEA nel dolore cronico ed acuto	pag.23
1.5 Ruolo della PEA nelle patologie del SNC	pag.26
1.6 Caratteristiche comuni delle malattie degenerative dell'AD e del PD	pag.30
2. SCOPO DEL LAVORO	pag.35
3. MATERIALI	
3.1 Colture cellulari	pag.36
3.2 Animali	pag.37
3.3 Sostanze	pag.37
4. METODI	
4.1 Analisi Western Blot dei lisati di SH-SY5Y differenziate	pag.39
4.2 Immunofluorescenza sulle cellule SH-SY5Y differenziate	pag.40

4.3	Test di vitalità cellulare	
4.3.1	Trypan Blue Exclusion Assay	pag.41
4.3.2	Saggio dell'MTT	pag.41
4.4	Trasfezione delle cellule Neuro-2a	pag.42
4.5	Immunofluorescenza delle cellule Neuro-2a trasfettate	pag.43
4.6	Analisi Western Blot di lisati cerebrali	pag.44
4.7	Analisi del passo (misura della <i>stride length</i>)	pag.44
4.8	Protocollo sperimentale utilizzato per il modello <i>in vivo</i> di PD	pag.45
4.8.1	Test del rotarod	pag.46
4.8.2	Test dell'apomorfina	pag.47
4.9	Protocollo sperimentale utilizzato per il modello <i>in vivo</i> di AD	pag.47
4.9.1	Y- Maze test (Performance dell'alternanza spontanea)	pag.49
4.9.2	Morris Water-Maze (Memoria spaziale e test mnemonici)	pag.50
4.9.3	Water-Maze (Working Memory)	pag.51
4.9.4	NOR Test	pag.52
4.9.5	Analisi Western Blot di lisati ippocampali	pag.53
4.9.6	Misura della perossidazione lipidica	pag.54
4.10	Analisi Statistica	pag.55
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	pag.56
5.	CONCLUSIONI	pag.86
6.	BIBLIOGRAFIA	pag.97

1. Introduzione

Nell'ambito dello studio del controllo dell'infiammazione, negli ultimi anni la ricerca di base ha guardato con enorme interesse al ruolo degli acidi grassi e dei loro derivati. Tra questi vi sono le aciletanolammidi (AEs).

La presenza di tali derivati lipidici a livello cerebrale nei mammiferi era nota da decenni, ma solo negli ultimi anni sono state delineate le funzioni biologiche delle AEs più abbondanti (Hansen et al., 2000).

La loro presenza, come quella dei loro precursori nel siero e nei tessuti, e le loro proprietà farmacologiche hanno indicato tali molecole come regolatori locali endocrini di funzioni periferiche: perciò le AEs sono state definite *Autacoid Local Injury Antagonism Amides* o *ALLAmides* (Aloe et al., 1993).

Il loro possibile ruolo come neuromodulatori è stato suggerito da diversi gruppi di ricerca, dopo la scoperta della presenza di AEs in parecchie aree cerebrali sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Balvers et al., 2013). Infatti tutte le AEs si accumulano in caso di danno neuronale, in particolare la palmitoiletanolamide (PEA) e l'oleoiletanolamide (OEA), che possiedono anche effetti neuroprotettivi (Hansen et al., 2002).

1.1 La Palmitoiletanolamide (PEA)

La PEA (Fig.1) è l'amide tra l'acido palmitico e l'etanolina, è abbondante nel sistema nervoso centrale (SNC), è prodotta in maniera cospicua dalle cellule gliali (Hansen et al., 2000; Walter et al., 2002; Muccioli e Stella, 2008) ed è un importante mediatore che agisce sia a livello centrale che periferico (Lo Verme et al., 2005a; D'Agostino et al., 2009).

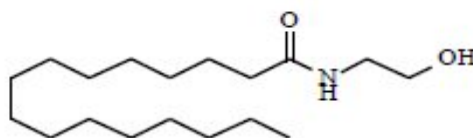


Fig.1 La Palmitoiletanolamide (PEA)

Tale aciletanolamide è stata identificata più di 60 anni fa nella frazione lipidica purificata del tuorlo d'uovo (Coburn et al., 1954) come responsabile dell'azione anti-piretica osservata in bambini con febbre reumatica, come pure nell'olio di arachidi e nelle lecitina di soia. Solo successivamente la PEA fu identificata come il componente attivo della frazione lipidica (Kuehl et al, 1957).

Negli anni successivi è stato riportato che la PEA era in grado di ridurre reazioni allergiche e l'infiammazione *in vivo* (Benvenuti et al., 1968; Perlik et al., 1971), insieme ai sintomi influenzali nell'uomo (Kahlich et al., 1979). Tuttavia l'interesse per tale aciletanolamide diminuì per circa 20

anni, fino a quando si scoprì che uno dei suoi analoghi strutturali, l'anandamide (AEA), era il ligando endogeno dei recettori dei cannabinoidi, target del Δ^9 -tetraidrocannabinolo, presente nella marijuana (Devane et al., 1992). Da questo momento in poi le proprietà della PEA sono state studiate con crescente interesse. Oltre alle sua ormai nota attività anti-infiammatoria, la PEA è in grado di indurre analgesia (Calignano et al., 1998, 2001; Jaggar et al., 1998), di esercitare un effetto neuroprotettivo (Lambert et al., 2001), di inibire il *food-intake* (Rodriguez de Fonseca et al., 2001), di ridurre la motilità intestinale (Capasso et al., 2001) e la proliferazione di cellule cancerose (De Petrocellis et al., 2002; Di Marzo et al., 2001) e di proteggere l'endotelio vascolare in caso di ischemia cardiaca (Bouchard et al., 2003). Altri studi hanno dimostrato che tale aciletanolamide endogena era in grado di inibire la degranolazione mastocitaria (Aloe et al., 1993) e l'infiammazione a livello periferico (Mazzari et al., 1996), effetti che erano accompagnati da modificazioni nella produzione di ossido nitrico da parte dei macrofagi (Ross et al., 2000) e nell'espressione di proteine pro-infiammatorie, come l'ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) e la ciclossogenasi-2 (COX-2) (Costa et al., 2002). Ciò è dovuto sia ad un effetto genomico simile a quello dei farmaci anti-infiammatori steroidei, sia ad un effetto non-genomico, dal momento che la PEA è in grado di ridurre il processo infiammatorio nel giro di poche ore (Conti et al., 2002; Lo Verme et al., 2005). Infine, la PEA è stata ampiamente studiata per i suoi effetti anti-infiammatori e neuroprotettivi,

principalmente in modelli di neuropatia periferica (Skaper et al., 1996; Franklin et al., 2003).

1.1.1. Biosintesi ed inattivazione della PEA

La sintesi e la degradazione della PEA avviene in varie popolazioni cellulari, incluse quelle coinvolte nel *signalling* del dolore cronico e dell'infiammazione, come le cellule del sistema immunitario, nei neuroni e nella microglia (Škaper et al., 2012).

A differenza dei classici neurotrasmettitori ed ormoni che vengono immagazzinati e rilasciati dalle vescicole secretorie, la produzione delle AEs avviene con una sintesi *on-demand* nel bilayer fosfolipidico (Cadas et al., 1996; Schmid et al., 1990). La PEA viene sintetizzata a partire dall'acido palmitico (C16 :0), l'acido grasso più comune nei mammiferi e prodotto di normale sintesi degli acidi grassi.

La biosintesi della PEA si realizza in due passaggi (Fig.2):

1) trasferimento dell'acido palmitico dalla fosfatidilcolina (PC) alla fosfatidiletanolamide (PE), ad opera della N-acil-transferasi, con formazione dell'N-acilfosfatidiletanolammina (NAPE); tale passaggio è AMP- ciclico- e Ca^{2+} - dipendente;

2) interviene una specifica fosfolipasi D per il NAPE (NAPE- PLD), che libera la PEA nella cellula; tale idrolasi lipidica condivide piccole sequenze

omologhe con gli altri membri della famiglia delle PLD e riconosce tante NAPE, producendo così la PEA ed altre AEs (Okamoto et al., 2004).

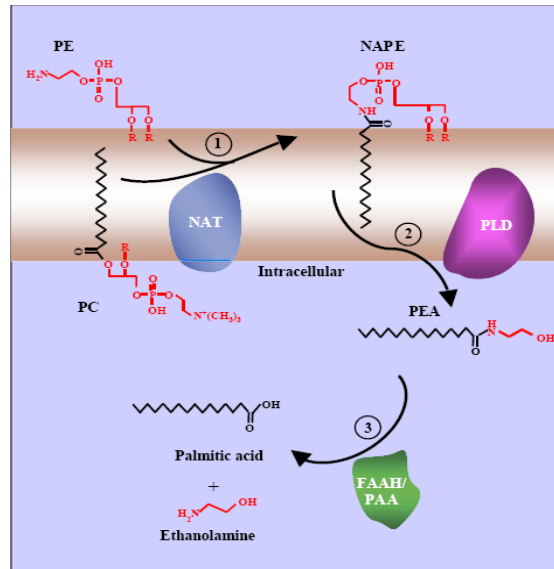


Fig. 2 Metabolismo della PEA

L'inattivazione della PEA consiste principalmente nella sua idrolisi intracellulare da parte di idrolasi lipidiche (Schmid et al., 1985). In particolare l'enzima deputato a tale attività è la *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), una serina idrolasi legata al lato intracellulare del doppio strato fosfolipidico, questo enzima è stato ampiamente caratterizzato (Bracey et al., 2002) ed è in grado di idrolizzare la PEA in acido palmitico ed etanolamina (Puffenbarger et al., 2005). Tuttavia è stato identificato un secondo enzima, la *PEA- preferring acid amidase* (PAA) (Ueda et al., 2001). La FAAH è presente in tutti i tessuti, ma è particolarmente abbondante a livello epatico e cerebrale (Cravatt e Lichtman, 2002): topi

knock-out (KO) per il gene *faah* presentano livelli più alti di PEA in questi tessuti (Cravatt et al., 2004; Lichtman et al., 2002). L'attività della PAA invece si esplica a livello dell'intestino, della milza e del polmone ed è in grado di riconoscere tutte le AEs. Tuttavia ciò suggerisce che potrebbe ricoprire un ruolo marginale nella metabolizzazione delle AEs, in quanto in presenza di detergenti la sua attività mostra una marcata preferenza per la PEA come substrato (Ueda et al., 2001).

1.1.2 Target della PEA

Nonostante il suo potenziale clinico, il recettore responsabile delle proprietà analgesiche ed anti-infiammatorie della PEA è rimasto per molto tempo sconosciuto. La sua similarità strutturale con l'AEA ha suggerito in un primo momento che entrambi questi mediatori lipidici avessero come target il recettore cannabinoide di tipo 2 (CB2). Inizialmente infatti è stato riportato che la PEA mimava il *binding* di un agonista cannabinoide ad alta affinità in cellule RBL-2H3 mastocitarie, oltre a rilevare un'aumentata espressione dell'RNA messaggero (mRNA) del recettore CB-2 (Facci et al., 1995). Ciò comunque è stato difficile da replicare in altri laboratori (Ross et al., 1999; Sugiura et al., 2000; Lambert et al., 2002). Tuttavia, il blocco del recettore CB-2 ad opera dell'antagonista cannabinoide selettivo SR144528 inibiva l'attività anti-nocicettiva della PEA (Calignano et al., 1998; Jaggar et al., 1998; Calignano et al., 2001; Farquhar-Smith and Rice, 2001), ma non la sua attività anti-infiammatoria prolungata (Costa et al., 2002). Per

spiegare tutte queste osservazioni contraddittorie, è stato inizialmente ipotizzato che la PEA potesse potenziare l'effetto dell'anandamide (AEA) sui recettori CB e/o sul transient receptor potential channel of the vanilloid type 1 (TRPV1) (De Petrocellis et al., 2001; Smart et al., 2002). Ciò è stato soprannominato "effetto entourage" che consiste nell'inibizione competitiva della PEA con l'AEA dell'enzima FAAH (Jonsson et al., 2001) e/o in un effetto allosterico diretto della PEA sul TRPV1 (De Petrocellis et al., 2004; Ho et al., 2008).

La PEA non possiede le caratteristiche dei classici endocannabinoidi (Pertwee et al., 2010), poiché è incapace di produrre alcuni comportamenti della tetraide suggeriti da Fride e Mechulam (1993) come condizioni necessarie per definire una molecola cannabinomimetica, quali la catalessia e l'immobilità. Molte delle funzioni biologiche dell'AEA e del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG), i due maggiori endocannabinoidi, sono mediate dai recettori CB1 e CB2, ma esiste una classe di recettori orfani considerati fino ad ora dei recettori cannabinoidi addizionali (Godlewski et al., 2009), che comprende il GPR55 ed il GPR119 (Ryberg et al., 2007; Overton et al., 2006). La PEA ha una debole affinità per il GPR55 (Sharir e Abood, 2010), la cui attivazione è stata suggerita per spiegare alcuni degli effetti non-CB1 e non-CB2 osservati per alcuni ligandi cannabinoidi (Ross, 2009). E' stato anche dimostrato che la PEA è in grado di legare anche solo marginalmente il GPR119 (Overton et al., 2006) che è un recettore

particolarmente espresso nell'intestino ed anche nelle cellule immunitarie, considerato inizialmente un "terzo" recettore cannabinoide, nonostante condivida poca omologia con i recettori CB (Balenga et al., 2011). In precedenza Overton e colleghi (2006) hanno dimostrato che l'OEA potrebbe essere un agonista del recettore GPR119, mentre la PEA e l'AEA mostrano minore affinità. Questo recettore è particolarmente noto per il suo coinvolgimento nella secrezione di *glucagon-like peptide-1* da parte delle cellule entero-cromaffini nell'intestino e nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio (Godlewski et al., 2009). Uno studio ha anche riportato la minore espressione del GPR119 nel SNC (Bonini, 2002), ma fino ad ora non è chiara la funzione di questo recettore nel cervello.

Lo Verme e collaboratori (2005a; 2006) hanno caratterizzato la PEA come ligando ed agonista del PPAR- α , che è anche il target di altre AEs, quali l'OEA. Infatti gli effetti anoressigeni dell'OEA e la conseguente perdita di peso, legati all'attivazione del PPAR- α nell'intestino (Fu et al., 2003), non si osservano in topi PPAR- α /KO (Lo Verme et al., 2005a). D'altro canto la PEA mostra attività anti-infiammatorie ed analgesiche mediate dall'attivazione del PPAR- α (Lo Verme et al., 2005a; 2006), riducendo l'attivazione del fattore nucleare kB (NF-kB) e la sintesi di enzimi pro-infiammatori (D'Agostino et al., 2009).

Gli effetti rapidi della PEA non possono essere mediati dall'attività trascrizionale del PPAR- α , ma dall'attivazione non genomica di proteine

chinesi (Lo Verme et al., 2006; Melis et al., 2008). È stato osservato che l'attivazione del PPAR- α può sopprimere la risposta dolorifica alterando le proprietà di *gating* dei canali del potassio a media e/o alta conduttanza Ca^{2+} -dipendenti IKCa e BKCa nei *dorsal root ganglia* (DRG) dei neuroni, in accordo sia con la presenza del PPAR- α in questa prima “stazione dolorifica”, sia con la soppressione del comportamento nocifensivo, anche quando la PEA è somministrata nella zampa (Lo Verme et al., 2005). Recentemente è stato mostrato che le AEs inibiscono i canali del potassio Kv1.5 e Kv4.3, interagendo con il sito di legame extracellulare nei fibroblasti (Barana et al., 2010).

Accanto a tale meccanismo, l'attività analgesica della PEA può essere ascritta anche ad un meccanismo diretto sull'attività sui mastociti, attraverso un meccanismo autacoide antagonista locale (Aloe et al., 1993). Ciò mostra una doppia attività, sui neuroni del pathway nocicettivo e sulle cellule non neuronali, come anche sui mastociti e nella glia nel midollo spinale.

Recentemente, la dimostrazione che la sintesi negli astrociti dell'allopregnanolone è indotta dalla PEA in maniera PPAR- α -dipendente ha aperto una nuova strada per meglio comprendere gli effetti della PEA nel SNC (Mattace Raso et al., 2011).

Gli effetti della PEA sono bloccati dall'antagonista PPAR- α di sintesi GW6471 o dal silenziamento tramite siRNA del PPAR- α (Mattace Raso et al., 2011).

In precedenza è stato dimostrato anche che la PEA è in grado di modulare il sonno indotto dal pentobarbitale attivando il PPAR- α ed inducendo la sintesi *de novo* dei neurosteroidi. In particolare, è stato rilevato un incremento dei livelli di allopregnanolone nel *brainstem* di topi trattati con la PEA, che portava ad un potenziamento dell'effetto ipnotico del pentobarbitale, a causa della modulazione positiva del recettore GABA(A) da parte dell'ormone (Sasso et al., 2010). Coerentemente l'attività antinocicettiva della PEA veniva parzialmente ridotta in due modelli di dolore, uno acuto ed uno persistente (test della formalina e l'edema della zampa indotto dalla carragenina) quando gli enzimi 5 α -reduttasi ed il citocromo P450 *side-chain cleavage* (P450scc) venivano inibiti. In entrambi i modelli la somministrazione di PEA ripristinava l'espressione di due proteine coinvolte nella neurosteroidogenesi, la *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) ed il P450scc nelle corna ipsilaterali del midollo spinale, dove è stato rilevato anche un incremento dei livelli di allopregnanolone (Sasso et al., 2012). Tra gli steroidi neuroattivi l'allopregnanolone sembra condividere molti degli effetti mostrati dalla PEA, incluse le attività analgesiche, anticonvulsivanti ed antiallodiniche (Lo Verme et al., 2005a, 2005b, 2006; Kokate et al., 1999; Lo Verme et al., 2005b; Zheng et al., 2009). Questo ormone è stato riconosciuto essere un attivatore positivo del recettore GABA(A), incrementando le correnti entranti degli ioni Cl⁻ che portano all'iperpolarizzazione neuronale, raggiunta anche dalla PEA attraverso l'apertura dei canali IKCa e BKCa.

1.2 Recettore attivato dalla proliferazione perossisomiale di tipo α (PPAR- α)

I recettori attivati dalla proliferazione perossisomiale (PPARs) appartengono alla superfamiglia dei recettori steroidei, tiroidei e retinoici, denominati recettori ormonali nucleari (Desvergne e Wahli 1999). In presenza del ligando, di solito molecole piccole e lipofile, sono in grado di legare direttamente una specifica sequenza di DNA, regolando l'espressione genica attraverso co-attivatori trascrizionali (Nolte et al. 1998; Berger e Moller 2002; Castrillo e Tononoz 2004).

Una volta attivati dai loro ligandi, eterodimerizzano con l'isotipo α del recettore 9- cis retinoico (RXR α) a livello citoplasmatico (van Neerven and Mey, 2007). L'eterodimero PPAR/RXR α migra nel nucleo, si lega ad una specifica sequenza di DNA, chiamata *peroxisome proliferator response element* (PPRE), che si trova nella regione promotrice dei geni target dei PPARs (Desvergne and Wahli, 1999; Qi et al., 2000); viene così modulata l'attività trascrizionale che porta alla trascrizione di centinaia di geni coinvolti in numerosi processi biologici (Fig.3) (Qi et al., 2000).

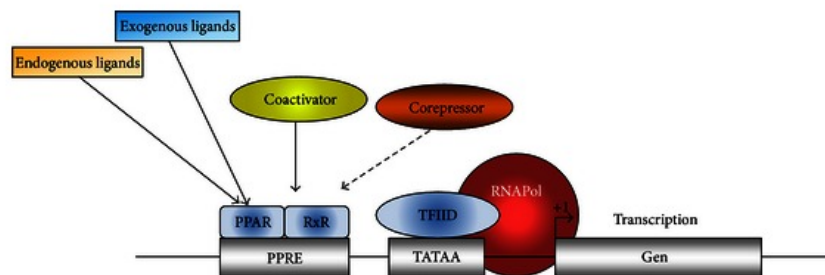


Fig. 3 Meccanismo di trascrizione genica mediata da PPARs

La famiglia dei recettori PPARs comprende tre diverse isoforme, PPAR- α , PPAR- β/δ , PPAR- γ , che condividono omologie strutturali in varie specie (Desvergne and Wahli, 1999). In particolare, l'isoforma α è altamente espressa nel tessuto adiposo bruno, nel muscolo scheletrico, nel fegato, nel cuore e nel rene (Mukherjee et al., 1994; Su et al., 1998). L'isoforma γ è maggiormente espressa nel tessuto adiposo, benchè sia espresso a livelli più bassi anche nella retina, nel sistema immunitario ed a livello della mammella e del colon (Mueller et al., 1998); l'isoforma δ si trova in elevate quantità nei tessuti precedentemente elencati, eccetto che nel tessuto adiposo, oltre ad essere espresso in maniera ubiquitaria nella corteccia cerebellare e nel talamo del ratto (Cullingford et al., 1998).

Il dominio di legame al DNA (DNB) è il più conservato tra tutti i recettori nucleari. Il DNB è formato da un motivo a due dita di zinco ripiegato in una struttura globulare che riconosce una sequenza target di DNA composta da 6 nucleotidi (Desvergne and Wahli, 1999). In particolare, il PPRE dei

PPARs è un doppia ripetizione della sequenza nucleotidica AGGTCA, separata da un nucleotide. In assenza di ligandi, i PPARs ed il RXR α si trovano a livello citosolico legati ad un co-repressore, sopprimendo così la trascrizione genica (Ziouzenkova and Plutzky, 2008). La presenza del ligando però porta al distacco del co-repressore dall'eterodimero ed al reclutamento dei co-attivatori (Kamei et al., 1996; Desvergne and Wahli, 1999; Straus and Glass, 2001).

I lipidi assunti con la dieta ed i loro metaboliti, gli acidi grassi e gli eicosanoidi sono i ligandi naturali dei recettori PPARs, ed esistono anche ligandi sintetici utilizzati in terapia quali i tiazolidindioni ed i fibrati (Desvergne and Wahli, 1999). Diversi farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), quali l'ibuprofene, il fenoprofene e l'indometacina, sono in grado di attivare le isoforme α e γ (Lehmann et al., 1997), facendo ipotizzare così che l'attività anti-infiammatoria di questi farmaci possa dipendere dalla loro capacità di legare i recettori PPARs ed attivarli (Jiang et al., 1998; Casper et al., 2000).

La scoperta della presenza del PPAR- α in varie aree cerebrali attraverso studi di immunolocalizzazione ha aperto nuovi scenari per esplorare la possibilità delle AEs nel SNC (Moreno et al., 2004).

1.3 Ruolo della PEA nell'infiammazione e nella risposta adattativa nel SNC

L'infiammazione, oltre ad essere conseguenza di un danno tissutale, spesso è alla base della patogenesi di molte malattie croniche, tra cui quelle di natura autoimmune (Skaper et al., 2013; Dinarello, 1991). L'interazione funzionale tra il sistema immunitario e quello nervoso è in grado di regolare finemente l'entità e la durata della risposta infiammatoria. Una disregolazione delle interazioni neuro-immunitarie potrebbe essere alla base della propagazione ed esacerbazione di reazioni infiammatorie. Le citochine pro-infiammatorie occupano un ruolo chiave, in quanto sono in grado di regolare la risposta dell'ospite in caso di infezioni, infiammazione, stress o traumi. Gli astrociti e, ancor più, la microglia costituiscono un'importante fonte di mediatori pro-infiammatori e quindi possono avere un ruolo cardine in condizioni che vanno dal dolore cronico (Raghavendra et al., 2004), all'epilessia (Najjar et al., 2011), dalle malattie neurodegenerative, come il morbo di Alzheimer (AD) (Sailasuta et al., 2011; Prat et al., 2011; Song et al., 2011; Cho et al., 2011) ed il morbo di Parkinson (PD) (Fellner et al., 2011; Barcia et al., 2011), alla schizofrenia, dalla depressione e ad altri disturbi psichiatrici (Mitterauer, 2011; Hinwood, et al., 2011; Muccioli et al., 2006).

La microglia ricopre un ruolo importante nella modulazione della neurogenesi sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Le cellule della

microglia vengono attivate da antigeni o da cambiamenti dell'omeostasi cerebrale, trasformando la risposta dell'immunità innata in una risposta immune adattativa, reclutando cellule del sistema immunitario e fattori secretori coinvolti nella sopravvivenza neuronale (Ekdahl, 2012). La neuroinfiammazione causata dall'attivazione della glia è in grado di compromettere l'integrità cerebrale durante l'invecchiamento (Rosano et al., 2012); un'attivazione alterata e prolungata della glia può indurre una risposta autoimmune, contribuendo a danno cerebrale e a morte neuronale (González-Scarano e Baltuch, 1999), fornendo una correlazione tra neuroinfiammazione e dolore neuropatico (Skaper et al., 2013). Sia la microglia che gli astrociti rispondono a segnali pro-infiammatori provenienti dalle cellule immunitarie periferiche, quali i mastociti (Skaper et al., 2013). I mastociti, come i macrofagi, sono cellule che si trovano nel cervello e si spostano attraverso la barriera emato-encefalica, ma principalmente in condizioni patologiche ed in caso di infiammazione. Nel cervello i mastociti producono non solo numerosi mediatori infiammatori, ma sono capaci anche di fagocitare e di presentare l'antigene, modulando così la risposta adattativa immunitaria negli astrociti e nella microglia.

Il ruolo fisiologico e le proprietà farmacologiche della PEA nel SNC sono meno chiare di quelle dell'AEA e del 2-AG. In particolare, dopo i neuroni (Stella e Piomelli, 2001), anche gli astrociti sono capaci di produrre la PEA in rapporto di 2:1 rispetto all'AEA (Walter et al., 2002). Inoltre la PEA è prodotta ed idrolizzata dalla microglia (Muccioli e Stella, 2008), inibisce

l'attivazione mastocitaria (Facci et al., 1995; Cerrato et al., 2010) ed i suoi livelli vengono incrementati in neuroni corticali primari stimolati con glutammato (Hansen et al., 1997) e nella corteccia dopo un danno al SNC (Franklin et al., 2003; Berger et al., 2004; Schäbitz et al., 2002). La PEA riduce l'attivazione dei mastociti attraverso un meccanismo autacoide locale e rallenta la perdita neuronale causata dalla loro attivazione (Skaper et al., 1996); inoltre, riduce lo stress ossidativo nelle cellule di glioma di ratto C6 ed il suo effetto è in parte mediato dalla sintesi dei neurosteroidi (Mattace Raso et al., 2001), suggerendo un ruolo della PEA nella rimozione dei perossidi dal cervello, neutralizzando gli effetti del danno delle specie reattive dell'ossigeno che possono esser coinvolte in diverse patologie neurologiche (Simonian e Coyle, 1996). Di recente è stato osservato che la PEA controlla la degranolazione mastocitaria e riduce la formazione di fibre nervose nel granuloma indotto dalla carragenina, modulando l'attivazione mastocitaria in prossimità delle fibre nervose e riducendo l'allodinia nell'area infiammata (De Filippis et al., 2011). Il controllo esercitato dalla PEA sull'attivazione mastocitaria è rafforzata dall'evidenza che la PEA riduce in maniera significativa la produzione ed il rilascio di diversi mediatori dai mastociti, quali il *tumor necrosis factor α* (TNF α) e fattori neurotrofici come *nerve growth factor*, in un modello in vivo di dolore neuropatico (Costa et al., 2008).

È stata dimostrata l'esistenza di un meccanismo centrale nel controllo dell'infiammazione periferica dei PPAR- α agonisti, inclusa la PEA ed il suo

agonista di sintesi GW7647. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato gli effetti anti-infiammatori ed anti edemigeni della PEA dopo somministrazione centrale nel modello sperimentale dell'edema da carragenina. Si è anche osservato l'incremento dei livelli di PPAR- α e la riduzione della ciclossigenasi-2 (COX)-2 e della ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS) nel midollo spinale, che rappresenta la principale stazione di raccordo tra il SNC ed il sito d'infiammazione; la PEA era in grado di sopprimere il *signalling* di NF- κ B nei DRG, che può spiegare il meccanismo con cui la PEA down-regola l'espressione della COX-2 e della iNOS nel nervo sciatico e midollare (D'Agostino et al., 2007, 2009).

La PEA è in grado di attenuare anche il grado di infiammazione in un altro modello animale di danno periferico, il danno da costrizione cronica, che è un modello di neuropatia associata ad una profonda risposta infiammatoria che coinvolge le cellule T ed i macrofagi (Uceyler et al., 2010). Dopo un danno nervoso, la PEA riduce l'edema e l'infiltrazione macrofagica (Kigerl et al., 2009), valutato con la quantità di cellule CD86⁺ (Di Cesare Mannelli et al., 2013), responsabili della produzione di alti livelli di ossido nitrico, radicali superossido e citochine pro-infiammatorie (Ding et al., 1988). Perciò le proprietà anti-iperalgiche e neuroprotettive della PEA sono correlate non solo ai suoi effetti anti-infiammatori e alla sua capacità di prevenire l'infiltrazione macrofagica nel nervo. Complessivamente queste evidenze suggeriscono un ruolo chiave della PEA nel mantenere

l'omeostasi cellulare in caso di stimoli patologici che causano la risposta infiammatoria ed il danno tissutale.

1.4 La PEA nel dolore cronico ed acuto

Benchè la percezione del dolore sia controllata principalmente dai neurotrasmettitori del SNC, anche in periferia esistono dei meccanismi antinocicettivi. Oltre alle ben note attività anti-infiammatorie, la PEA ha attività anti-analgese sia nel dolore acuto che cronico (D'Agostino et al., 2009; Calignano et al., 1998, 2001; de Novellis et al., 2012). E' stato riportato che la somministrazione di PEA esercita effetti anti-nocicettivi in vari modelli di infiammazione e dolore neuropatico nel topo, come l'iperalgisia indotta dalla carragenina (Sasso et al., 2012; D'Agostino et al., 2007) ed il danno da costrizione cronica (Di Cesare Mannelli et al., 2013).

Varie evidenze hanno sottolineato che in modelli animali di dolore neuropatico l'iperalgisia e l'allodinia sono caratterizzate da un incremento dei livelli dei classici cannabinoidi (AEA and 2-AG) nei pathway nocicettivi discendenti, come pure in altre regioni del *brainstem* più coinvolte nelle componenti emozionali del dolore cronico, mentre i livelli di PEA diminuiscono in maniera significativa (Petrosino et al., 2007). Questi risultati indicano non solo un ruolo dell'aumento dei livelli degli cannabinoidi nella percezione del dolore, ma anche un coinvolgimento della PEA, i cui livelli si riducono. D'altro canto, Jhaveri e collaboratori (2008) hanno rilevato a livello periferico nel test della carragenina livelli più bassi

di AEA e di PEA, correlati sia ad un incrementato metabolismo dell'AEA e della PEA, sia ad una diminuita sintesi. Questa diminuzione dei livelli di AEA o PEA, attraverso l'inibizione della FAAH o della COX-2, è associata ad effetti anti-nocicettivi che vengono bloccati dal GW6471, un antagonista PPAR- α , che implica ancora una volta un ruolo di questo recettore nella trasmissione dello stimolo dolorifico (Jhaveri et al., 2008).

Fino ad ora, la maggior parte degli studi sul ruolo PPAR- α nel dolore si è focalizzata sui siti d'azione periferici o spinali dei ligandi endogeni di questo recettore, mentre pochi studi hanno indagato il suo ruolo sovraspinale, sottolineando il suo ruolo nel ridurre la risposta dolorifica (D'Agostino et al., 2009, 2007; de Novellis et al., 2012). Una significativa attività anti-infiammatoria ed anti-iperalgica degli agonisti endogeni e sintetici del PPAR- α è stata dimostrata attraverso la somministrazione centrale (D'Agostino et al., 2009, 2007). Dopo somministrazione di PEA per via intracerebroventricolare (i.c.v.), i livelli di PPAR- α nei DRG venivano ripristinati nel test della carragenina, suggerendo che la somministrazione sopraspinale di PEA probabilmente modula l'espressione del PPAR- α nei DRG (D'Agostino et al., 2009). Queste osservazioni concordano con il fatto che la somministrazione sopraspinale di PEA riduce l'espressione della COX-2 e della iNOS a livello spinale a seguito di un danno infiammatorio periferico (D'Agostino et al., 2007). Perciò è stato proposto che la riduzione dell'espressione del PPAR- α a livello centrale (spinale) e a livello del sistema nervoso periferico (DRG) è coinvolta nel

danno periferico ed è correlato al *signalling* iperalgesico. Più recentemente Okine e collaboratori (2013) hanno studiato la modulazione della percezione dolorifica da parte del PPAR- α nella corteccia prefrontale mediale. Quest'area è coinvolta infatti negli effetti soprasspinali e nella modulazione cognitive del dolore (Giordano et al., 2012; Shyu et al., 2009; Xie et al., 2009), oltre a mostrare un'elevata espressione del PPAR- α (Moreno et al., 2004). In tale area è stata rilevata una riduzione dei livelli di PEA e OEA nel test della formalina ed un effetto dell'antagonista PPAR- α che diminuisce la risposta dolorifica. Gli autori hanno ipotizzato nella corteccia prefrontale mediale un ruolo del PPAR- α nella percezione del dolore mai descritto prima (Okine et al., 2013). Una possibile spiegazione è il blocco dell'inibizione pre-sinaptica del PPAR- α , attraverso il suo antagonista, che causa un incremento dei toni serotoninergici e noradrenergici, sistemi noti per esser controllati dalla corteccia prefrontale nel modulare il valore soglia del dolore a livello spinale.

Un'altra prova della correlazione tra PEA e SNC è la capacità della PEA di modulare la neurosteroidogenesi nel midollo spinale in caso di dolore. Sasso e collaboratori (2012) hanno studiato il coinvolgimento della sintesi *de novo* dei neurosteroidi nella modulazione del comportamento dolorifico da parte della PEA in modelli di dolore acuto e persistente, quali il test della formalina e quello dell'edema della zampa da carragenina. L'attività antinocicettiva della PEA era bloccata in topi PPAR- α /KO e parzialmente ridotta quando gli animali erano trattati con aminoglutetimide o finasteride,

implicando che la sintesi *de novo* dei neurosteroidi è coinvolta negli effetti antinocicettivi della PEA. Nel midollo spinale poi, i livelli di allopregnanolone venivano incrementati in seguito al trattamento con PEA in entrambi i modelli di dolore. La somministrazione di PEA ripristinava inoltre l'espressione di due proteine coinvolte nella neurosteroidogenesi, la StAR ed il citocromo P450_{scc} nelle corna ipsilaterali del midollo spinale, senza influenzarne l'espressione nel lato controlaterale.

Studi molto recenti inoltre supportano l'esistenza di una complessa interrelazione tra i recettori PPARs e l'ossitocina (OXT), che potrebbe giocare un ruolo importante nella regolazione del dolore, del food intake e del metabolismo lipidico (Romano et al., 2013; Gaetani et al., 2010). È stato dimostrato che la somministrazione i.c.v. di OXT è in grado di produrre un significativo effetto anti-iperalgescico dovuto all'attivazione del sistema endocannabinoide (Russo et al., 2013).

1.5 Ruolo della PEA nelle patologie del SNC

L'evidenza dell'accumulo della PEA nei tessuti durante il danno cerebrale ha suggerito una sua possibile attività neuroprotettiva (Hansen et al., 2002).

Scuderi e collaboratori (2011) hanno dimostrato che la PEA è in grado di neutralizzare l'attivazione astrocitaria indotta dalla β -amiloide (Ab). In particolare si osserva la riduzione dell'attivazione di p38 e JNK, e dei fattori di trascrizione NF- κ B ed AP-1. Ciò contribuisce ad identificare l'apparato molecolare attraverso cui la PEA contribuisce a down-regolare

sia la reazione astrocitaria che l'overproduzione di segnali pro-infiammatori.

Ulteriori studi *in vitro* hanno valutato l'effetto neuroprotettivo della PEA sull'attivazione astrocitaria sulla perdita neuronale in modelli di neurotossicità da Ab in co-culture di neuroni e glia ed in fettine organotipiche ippocampali, con un'attenzione sul PPAR- α (Scuderi et al., 2012). La riduzione dell'attivazione gliale induce un marcato rinforzo dell'effetto neuroprotettivo sui neuroni che veniva revertito da un antagonista selettivo del PPAR- α (Scuderi et al., 2013).

In modelli sperimentali murini di malattie neurodegenerative, come il morbo di Huntington, l'encefalomielite autoimmune o la sclerosi multipla (Baker et al., 2001; Chastain et al., 2011), è stato osservato un incremento dei livelli di PEA nel SNC (Loria et al., 2008), che si può interpretare come un meccanismo adattativo per preservare le funzioni e l'integrità neuronale nel corso dello sviluppo delle patologie. Inoltre la somministrazione di PEA riduceva la disabilità motoria nei topi in un modello di sclerosi multipla, oltre a mostrare effetti anti-infiammatori (Loria et al., 2008). Quindi è stato suggerito che farmaci in grado di inibire la degradazione degli endocannabinoidi possano esser utilizzati nel trattamento delle malattie neurodegenerative (Baker et al., 2001; Bisogno et al., 2008; Jean-Jilles et al., 2009). L'evidenza che gli agonisti PPAR- α , principalmente neutralizzando i processi anti-infiammatori ed immunitari, mostrano effetti

benefici in topi con encefalomielite autoimmune (Yang et al., 2008; Heneka e Landreth, 2007) concorda con l'idea che la PEA possa esplicare i suoi effetti attraverso l'attivazione di questo recettore (O'Sullivan, 2007).

È stato studiato anche il possibile utilizzo della PEA nel PD (Esposito et al., 2012). La somministrazione periferica di PEA riduce l'attivazione gliale indotta dall'1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) e ripristina l'espressione della tirosina idrossilasi (TH) e del trasportatore della dopamina (DAT) nella *substantia nigra*, effetti non osservabili in topi PPAR- α -KO. Inoltre la PEA riduceva l'espressione della iNOS nella *substantia nigra*, oltre a revertire il deficit motorio associati all'MPTP.

Recenti studi hanno dimostrato che la somministrazione periferica di OEA (Campolongo et al., 2009) o di un inibitore della FAAH (Mazzola et al., 2009) può incrementare la consolidazione mnemonica nei ratti in modo PPAR- α -dipendente. Quindi è ipotizzabile che gli effetti dovuti all'attivazione periferica del PPAR- α si osservano a livello cerebrale attraverso il nervo vago (Campolongo et al., 2009).

Gli endocannabinoidi giocano inoltre un ruolo protettivo anche nelle patologie del SNC associate a ipereccitabilità neuronale a livello ippocampale (Monory et al., 2006). La PEA ha effetti anticonvulsivanti in caso di convulsioni toniche (Lambert et al., 2001; Sheerin et al., 2004).

Tra i neurosteroidi, l'allopregnanolone ha molti effetti in comune con la PEA, inclusa l'attività anticonvulsivante (Kokate et al., 1999; Zheng et al.,

2009). I neurosteroidi antagonizzano crisi tonico-cloniche generalizzate in vari modelli animali di epilessia (Reddy et al., 2012). Citraro e collaboratori (2006) hanno valutato gli effetti di tali composti in modello genetico di assenze, i ratti WAG/Rij. L'allopregnanolone era in grado di ridurre il numero e la durata delle scariche delle onde se micro-iniettati nella regione peri-orale della corteccia somato-sensoriale primaria. Poichè la PEA, attraverso il PPAR- α aumenta i livelli di allopregnanolone del SNC e negli astrociti (Sasso et al., 2010; Mattace Raso et al., 2011), è stata testata la sua efficacia in questo modello animale (Citraro et al., 2013). Gli autori hanno dimostrato che la PEA ha proprietà anti-assenze che dipendono dall'attivazione del PPAR- α e da una possibile attivazione indiretta dei CB1 da parte dell'AEA. Altri dati supportano un ruolo del sistema endocannabinoide nelle convulsioni: un inibitore FAAH, l'AM374, che incrementa i livelli endogeni di AEA e PEA nel cervello, mostrava elevati effetti anti-convulsivanti e neuroprotettivi nei ratti, correlati all'incremento di AEs saturi ed insaturi (Karanian et al., 2007).

Le scoperte relative alla sintesi dei neurosteroidi indotta dalla PEA nel SNC, e del profilo farmacologico simile dell'allopregnanolone con la PEA in diverse patologie neurodegenerative, suggeriscono fortemente un loro effetto sinergico sul controllo dei canali ionici. La PEA *per se* apre i canali IKCa e BKCa e, attraverso la sintesi dell'allopregnanolone, può incrementare le correnti del Cl⁻ in entrata, causando un'iper-polarizzazione neuronale: tutti questi effetti potrebbero cooperare con la desensitizzazione

dei TPRV1 indotta dall'AEA nel controllo delle assenze nei ratti WAG/Rij (Citraro et al., 2013). L'AEA ed il 2-AG, con i recettori CB1, sono coinvolti anche nei meccanismi neuronali alla base degli effetti di ricompensa di molte sostanze d'abuso, inclusa la nicotina (Castañe et al., 2005; Le Foll et al., 2008).

È stato dimostrato che l'incremento nel cervello dei livelli di AEs inibiva nell'area ventrale tegumentale le risposte dei neuroni dopaminergici alla nicotina (Melis et al., 2008). L'OEA and PEA dunque ricoprono un ruolo nuovo ed inaspettato come PPAR- α agonisti nella regolazione negativa delle risposte alla nicotina dei neuroni dopaminergici.

1.6 Caratteristiche comuni delle malattie degenerative dell'AD e del PD

Con il termine “neurodegenerazione” si intende una perdita della struttura e delle funzioni delle cellule neuronali. Diverse malattie degenerative del SNC come l'AD, il PD ed il morbo di Huntington mostrano proteine ripiegate in maniera anomala che si aggregano e si accumulano nei neuroni (Ross and Poirier, 2004; Soto, 2003).

L'AD è una delle forme di demenza più diffusa, con un fenotipo patologico caratterizzato da ipometabolismo e disfunzione della trasmissione sinaptica, seguito da un peggioramento della patologia (Zawia et al., 2009). L'AD è caratterizzato da una forte diminuzione a livello cerebrale di acetilcolina (ACh), neurotrasmettitore fondamentale per le performance mnemoniche e cognitive. Attualmente l'unica possibilità di effettuare una diagnosi certa di

AD è attraverso l'identificazione delle placche amiloidi del tessuto cerebrale con un esame autoptico. Ciò significa che durante il decorso della malattia si può effettuare solo una diagnosi di AD 'possibile' o 'probabile'.

Dall'analisi *post mortem* dei tessuti cerebrali di pazienti affetti da AD si è potuto riscontrare un accumulo extracellulare di aggregati proteici, risultato di un clivaggio anomalo di un precursore proteico, l'APP (*Amyloid precursor protein*), che genera un sottoprodotto peptidico insolubile responsabile dei depositi extracellulari (Sisodia, 2000). La maggior parte dell'APP prodotta è degradata durante il processo di trasporto sulla superficie cellulare. Ciò è indice di una fine regolazione dell'attività di questa proteina. Il processo di degradazione dell'APP vede coinvolti tre enzimi: la α -, la β - e la γ -secretasi. Nei soggetti sani l'APP, attraverso una reazione biologica catalizzata dall' α -secretasi, produce un peptide innocuo chiamato p3. Gli altri due enzimi danno il via al cosiddetto "pathway amiloidogenico" che porta alla formazione della β -amiloide (Ab) sia 1-40, formata quindi da 40 aminoacidi, che 1-42, formata invece da 42 aminoacidi (Selkoe, 2001; LaFerla et al., 2007; Thinakaran e Koo, 2008).

Le placche neuronali innescano un processo infiammatorio che a sua volta attiva una risposta immunitaria, richiamando macrofagi e neutrofili, i quali produrranno citochine, interleuchine e TNF- α e che danneggeranno irreversibilmente i neuroni.

Particolarmente colpiti da questo processo patologico sono i neuroni colinergici, specialmente quelli delle aree corticali, sottocorticali e, tra queste ultime, le aree ippocampali. In particolare, l'ippocampo è una struttura encefalica che svolge un ruolo fondamentale nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione, perciò la distruzione dei neuroni di queste zone è ritenuta essere la causa principale della perdita di memoria nei malati. Le placche di Ab interferiscono con l'abilità dell'ACh di svolgere la sua funzione di trasmettitore e danno inizio ai processi infiammatori che producono specie reattive dell'ossigeno. Studi suggeriscono che la Ab influisca sull'apertura dei canali del Ca^{2+} , permettendo il suo ingresso e promuovendo diversi processi che portano a disfunzioni mitocondriali, neuroinfiammazione ed a morte cellulare (Capone, 2009).

Il PD è la seconda malattia neurodegenerativa più diffusa dopo l'AD. E' associato ad una perdita progressiva di neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Ciò si manifesta in una grave deplezione di dopamina nello striato (Ehringer and Hornykiewicz, 1960). La presenza di inclusioni cellulari chiamati corpi di Lewy è la caratteristica isto-patologica del PD (Dauer e Przedborski, 2003). Il PD è caratterizzato dalla comparsa di diversi sintomi motori, quali rigidità, tremore a riposo, bradicinesia, acinesia ed instabilità posturale (Lee et al., 1994). I primi sintomi del PD si manifestano quando la degenerazione coinvolge già il 50-70% dei neuroni dopaminergici. Ne consegue che il momento esatto in cui

ha inizio la degenerazione non può essere determinato. Il meccanismo sotteso alla morte neuronale nel PD non è ancora del tutto noto. Sporadicamente fattori ambientali, come i pesticidi, sono in grado di indurre tale patologia (Healy et al., 2004; Betarbet et al., 2000).

In entrambe le patologie è possibile riscontrare una notevole componente infiammatoria, che ha portato alla sperimentazione clinica di diversi farmaci anti-infiammatori nel trattamento di AD e PD. Tuttavia recentemente è stata riscontrata un'altra caratteristica comune alle due patologie neurodegenerative più diffuse.

Studi di immunohistochimica *port mortem* su cervelli di pazienti affetti da AD mostrano diversi markers di stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) (Hoozemans et al., 2009; Nakagawa et al., 2000; Lee et al., 2010), ma è ancora incerto se sia l'ER stress a livello neuronale ad innescare la neuroinfiammazione e l'AD o se invece sia una conseguenza del processo patologico dell'AD. Recenti studi hanno sottolineato che, anche nel caso del PD, l'ER stress assieme all'anomala degradazione proteica può contribuire alla sua fisiopatologia (Holtz et al., 2003, 2006; Ryu et al., 2002). Anomalie della funzionalità o della perdita di integrità dell'ER porta al cosiddetto ER stress, che può essere causato per esempio dall'accumulo di proteine mal ripiegate al suo interno e da alterazioni dell'omeostasi del Ca^{2+} nell'ER (Paschen e Frandsen, 2001). L'ER stress attiva l'*unfolded protein response* (UPR), un *signalling* adattativo che aumenta la capacità della

cellula di produrre proteine propriamente ripiegate e diminuire la quantità di proteine accumulate nel lumen dell'ER (Schroder and Kaufman, 2005). Tuttavia l'esatto contributo e gli effetti dell'ER stress in tali patologie degenerative non è ancora conosciuto. Probabilmente la conoscenza più approfondita dei meccanismi patologici, come anche quello dell' ER stress potrebbe aiutare a definire migliori terapie per queste patologie, dal momento che la farmacologia possiede, ad ora, pochissimi farmaci per controllarne lo sviluppo.

2. Scopo del lavoro

Considerate la ben nota attività antinfiammatoria della PEA, le recenti evidenze che dimostrano una sua attività protettiva a livello del SNC e l'esistenza di un *signalling* a livello centrale PEA/PPAR- α , lo scopo del presente lavoro è stato quello di dimostrare l'efficacia di tale aciletanolamide endogena in modelli validati di neurodegenerazione *in vitro* ed *in vivo* e che la sua attività protettiva dipende dall'attivazione del PPAR- α .

In particolare, sono stati utilizzati modelli in cui la sua efficacia non era stata ancora testata, quali nei modelli sperimentali della 6-idrossidopamina (6-OHDA) e del rotenone, per quanto riguarda il PD, dell'ipestimolazione glutammatergica e della tunicamicina per quanto riguarda l'ER stress, attraverso test di vitalità cellulare.

Infine è stata valutata l'efficacia della PEA in un modello *in vivo* di PD indotto dall'iniezione striatale di 6-OHDA e, per la prima volta, anche in un modello *in vivo* di AD, attraverso diversi test comportamentali.

3. Materiali

3.1 Colture cellulari

Le cellule SH-SY5Y (numero ATCC® CCL-2266) sono state piastrate in fiasche di polistirene da 75 cm² e mantenute in coltura con una miscela 1:1 di Eagle's minimal essential medium (EMEM) e Dulbecco's modified Eagle's medium + F12 medium (DMEM F12, con 15 mM di HEPES e L-Glutamina). A ciò si è aggiunto il 10% di fetal bovine serum (FBS), L-glutamina (20 mM in 0,85% NaCl solution) e penicillina/streptomicina (10.000 U/ml), incubate ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. Raggiunta la confluenza, le cellule venivano tripsinizzate utilizzando una soluzione contenente lo 0,5% (p/v) di tripsina e lo 0,2% di EDTA.

Le cellule di neuroblastoma murino Neuro2A (numero ATCC® CCL-131) sono state mantenute in coltura in fiasche di polistirene da 75 cm² in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) al 10% di FBS e penicillina/streptomicina (10.000 U/ml), mantenute ad una temperatura di 37°C e al 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. Raggiunta la confluenza, le cellule venivano tripsinizzate utilizzando una soluzione contenente lo 0,5% (p/v) di tripsina e lo 0,2% di EDTA.

3.2 Animali

Tutte le operazioni sono state condotte secondo le procedure e le linee guida per la cura e l'uso degli animali da laboratorio (86/609/ECC e 2010/63/UE) e secondo le normative del Ministero italiano della Salute (DL 116/92).

Per il modello sperimentale di PD sono stati utilizzati topi maschi adulti del ceppo CD1 dal peso iniziale di 20-25g (Harlan, Italia).

Per il modello sperimentale di AD e per le altre osservazioni sono stati utilizzati topi maschi wild-type (WT) e PPAR- α /KO (B6.129S4-SvJae-Pparatm1Gonz) precedentemente retro incrociati con topi C57BL6 per 10 generazioni. Sono stati allevati nel nostro stabulario, dove è stata stabilita e mantenuta una colonia da incroci con eterozigoti. I topi sono stati genotipizzati seguendo le procedure descritte dal fornitore sulla propria pagina web (<http://jaxmice.jax.org>).

Il DNA è stato estratto dalle code usando il RedExtract kit (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

Tutti gli animali sono stati sottoposti ad un ciclo buio-luce di 12 ore con libero accesso ad acqua ed a cibo standard.

3.3 Sostanze

Tutte le sostanze utilizzate per le colture cellulari sono state acquistate dalla Lonza. Il kit usato nella trasfezione, TurboFect™ Transfection Reagent è stato fornito da Fermentas. Tutte le altre sostanze sono state acquistate dalla

Sigma-Aldrich (Milano, Italia) e dalla Biorad (Milano, Italia).

La PEA ed il suo agonista di sintesi GW7647 (acido 2-(4-(2-(1-cicloesanbutil)-3-cicloesilureido)etil)feniltio)-2-metilpropionico) sono state acquistate dalla Tocris (Bristol,UK). Per gli esperimenti *in vivo* la PEA ed il GW7647 sono stati disciolti in PEG e Tween 80 2:1 (Sigma-Aldrich), e mantenuti durante la notte sotto agitazione poco energetica con un magnetino.

Prima dell'iniezione è stata aggiunta una soluzione salina sterile, in modo da ottenere una concentrazione finale di PEG e Tween 80 rispettivamente del 20 e del 10% v/v. Le sostanze sono state somministrate per via sottocutanea (s.c) in un volume di 100µl per 30 g di peso corporeo.

Per il modello sperimentale di PD, la 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) è stata sciolta ad una concentrazione di 2 µg/µl in soluzione fisiologica sterile con lo 0,2% di acido ascorbico per prevenirne l'ossidazione.

Per il modello sperimentale di AD, il peptide amilogenico Ab 25-35 e la scrambled 25-35 (ScAb) (NeoMPS, Strasburgo, Francia o Genepep, Montpellier, Francia) sono state sciolte in acqua sterile e bi-distillata alla concentrazione di 3 mg/ml e conservate a -20°C fino all'uso. Per preparare l'aged Ab25-35, i peptidi sono stati posti a 37°C per 4 giorni; sono stati poi somministrati per via intracerebroventricolare (i.c.v.) in un volume finale di 3 µl per topo, come descritto da Maurice et al., 1996.

4. Metodi

4.1 Analisi Western Blot dei lisati di SH-SY5Y differenziate

Le cellule SH-SY5Y (300.000 cellule/pozzetto) sono state piastrate in multiwell da 6 e mantenute in mezzo completo per 48h. Vengono differenziate con acido *all trans* retinoico (RA, 10 μ M in DMSO) in mezzo all'1% di FBS per 5 giorni. Successivamente il mezzo viene aspirato ed effettuati due lavaggi in Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X ed aggiunti 70 μ l di lysis buffer totale (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaF 10mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, , Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 10 μ g/ml, inibitore della tripsina 10 μ g/ml). Dopo 45 minuti i campioni sono stati centrifugati per 20 minuti a 12.000 rpm a 4°C. Il surnatante è stato raccolto ed il suo contenuto proteico determinato utilizzando come standard albumina sierica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, Milano). 50 μ g di proteine sono stati sottoposti a separazione elettroforetica su gel di SDS-acrilamide e successivamente trasferiti su membrana di nitrocellulosa. La membrana veniva poi incubata overnight a 4°C con l'anticorpo anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology). I segnali chemilluminiscenti venivano visualizzati utilizzando l'ImageQuant 400 (Ge Healthcare, Milano, Italia) ed analizzati con il software QuantityOne 4.6.3 (Biorad, Italia).

4.2 Immunofluorescenza sulle cellule SH-SY5Y differenziate

Le cellule SH-SY5Y (10.000 cellule/pozzetto) sono state piastrate su vetrini in multiwell da 12 e mantenute in mezzo completo per 48h. Vengono differenziate con acido *all trans* retinoico (RA, 10 μ M in DMSO) in mezzo all'1% di FBS per 5 giorni. Successivamente le cellule sono state fissate sui vetrini con una miscela 1:1 di metanolo/acetone per 20 minuti a -20°C. E' stato utilizzato un blocking al 5% di Donkey Serum (Jackson ImmunoResearch, da LiStarfish, Cernusco sul Naviglio, Milano, Italia). Dopo 45 minuti di incubazione a t.a., i vetrini sono stati lavati con PBS 1X ed incubati con i seguenti anticorpi primari anti-PPAR- α (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e anti- 160kDa Neurofilament medium (Genetex da LiStarfish, Cernusco sul Naviglio, Milano, Italia) overnight a 4°C. Successivamente i vetrini incubati per 1h a t.a. al buio con gli appropriati anticorpi secondari (DyLight™ 488 e DyLight™ 594, Jackson ImmunoResearch, da LiStarfish, Cernusco sul Naviglio, Milano, Italia). I vetrini quindi sono stati ulteriormente lavati, asciugati ed incollati su vetrini portaoggetti. Sono stati analizzati con microscopio a fluorescenza ad una magnificazione 40X (Leica Microsystems, Milano, Italia) e le immagini ottenute sono state analizzate con il software ImageJ.

4.3 Test di vitalità cellulare

Sono test colorimetrici che permettono di stimare il numero di cellule vive presenti in coltura e quindi di valutare l'effetto della vitalità della

popolazione cellulare dopo trattamento con una determinata sostanza.

4.3.1 Trypan Blue Exclusion Assay

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y (10.000 cellule/pozzetto) e di neuroblastoma murino Neuro-2a (5.000 cellule per pozzetto) sono state piastrate in multiwell da 12 e mantenute in mezzo completo per 24h. Terminato il protocollo di differenziazione nel caso delle cellule SH-SY5Y, le cellule venivano stimulate con le sostanze d'interesse. La percentuale di dimetilsolfossido (DMSO) era dello 0,5%. Terminato il periodo di stimolazione, il mezzo di coltura veniva aspirato ed effettuato un lavaggio con PBS sterile. Successivamente venivano aggiunti in ogni pozzetto 300µL di Tripsina-EDTA e 800µL di mezzo al 10% di FBS per raccogliere le cellule e porle in eppendorf. E' stata effettuata una centrifuga a 1500 rpm per 5 minuti a t.a.. Infine è stato aspirato il surnatante e il pellet è stato risospeso in 400µL di mezzo fresco al 10% di FBS. La conta cellulare è stata effettuata con una soluzione allo 0,4% di Trypan Blue, utilizzando il contatore automatico TC10™ Automated Cell Counter (Biorad, Italia).

4.3.2 Saggio dell'MTT

Il test si basa sulla capacità del composto MTT (sale di tetrazolio, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) di venire metabolizzato da un enzima mitocondriale, la succinato deidrogenasi. La riduzione del MTT da parte dei mitocondri porta alla formazione di cristalli

di formazano di colore blu, insolubili in acqua.

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y e di neuroblastoma murino Neuro-2a sono state piastrate in multiwell da 96 e mantenute in mezzo completo per 24h (5.000 cellule per pozzetto con una vitalità superiore al 95%). La percentuale di dimetilsolfossido (DMSO) era dello 0,5%.

Terminato il protocollo di differenziazione nel caso delle cellule SH-SY5Y, le cellule venivano stimulate con le sostanze d'interesse. Terminato il tempo di stimolazione, le cellule venivano incubate con MTT (200µL per pozzetto, 5mg/ml) per 1h a 37°C. I sali di formazano venivano poi disciolti in DMSO (100µL per pozzetto). La riduzione del MTT a formazano è stata misurata a 490nm tramite spettrofotometro (iMark™ microplate reader, Biorad, Italia). La vitalità delle cellule è stata calcolata come % di cellule vive = (OD cellule trattate/ OD cellule controllo) x 100.

4.4 Trasfezione delle cellule Neuro-2a

Le cellule Neuro-2a sono state sottoposte a trasfezione transiente utilizzando il TurboFect™ Transfection Reagent (Fermentas, da Dasis Sciences, Cornaredo, Milano, Italia), una soluzione sterile di polimeri cationici in acqua. I polimeri di carica opposta a quelli degli acidi nucleici formano dei complessi forti e stabili con il DNA. Questi complessi proteggono il DNA dalla degradazione e facilitano l'introduzione del cDNA nelle cellule eucariotiche. Le cellule Neuro2A sono state piastrate in mezzo

completo su vetrini in multiwell da 12 (10.000 cellule per pozzetto con una vitalità superiore al 95%). Dopo 24h di adesione le cellule sono state trasfettate con 2µg di cDNA del PPAR- α , avente come tag il Flag (Chenn et al., 2009), per pozzetto. Dopo 48h di incubazione, le cellule sono state stimulate con le sostanze d'interesse (0,5% di DMSO) e sottoposte a saggio di immunofluorescenza.

4.5 Immunofluorescenza delle cellule Neuro-2a trasfettate

Terminato il periodo di stimolazione, le cellule sono state fissate sui vetrini con una miscela 1:1 di metanolo/acetone per 20 minuti a -20°C. E' stato utilizzato un blocking al 5% di Donkey Serum (Jackson ImmunoResearch, da LiStarfish, Cernusco sul Naviglio, Milano, Italia). Dopo 45 minuti di incubazione a t.a., i vetrini sono stati lavati con PBS 1X ed incubati con i seguenti anticorpi primari anti-FLAG® (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), β -tubulina III (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) 2h a t.a.. Successivamente i vetrini incubati per 1h a t.a. al buio con gli appropriati anticorpi secondari (DyLight™ 488 e DyLight™ 594, Jackson ImmunoResearch, da LiStarfish, Cernusco sul Naviglio, Milano, Italia). I vetrini quindi sono stati ulteriormente lavati, asciugati ed incollati con Fluoroshield™ with DAPI (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) su vetrini portaoggetti. Sono stati analizzati con microscopio a fluorescenza ad una magnificazione 40X (Leica Microsystems, Milano, Italia) e le immagini ottenute sono state analizzate con il software ImageJ.

4.6 Analisi Western Blot di lisati cerebrali

Il cervello di animali WT e PPAR- α /KO sono stati prelevati ed omogenati in lysis buffer totale (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaF 10mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 10 μ g/ml, inibitore della tripsina 10 μ g/ml). Dopo 45 minuti, i cervelli così lisati sono stati centrifugati a 14.000 rpm. per 20 minuti a 4°C ed il contenuto proteico del surnatante ottenuto è stato misurato utilizzando albumina sierica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) come standard. 50 μ g sono stati separati su gel di SDS-poliacrilamide e le membrane sono state incubate con l'anticorpo anti-ubiquitina (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). La chemilluminescenza veniva visualizzata utilizzando l'ImageQuant 400 (GE Healthcare, Milano, Italia) ed analizzati con il software QuantityOne 4.6.3 (Biorad, Italia).

4.7 Analisi del passo (misura della *stride length*)

E' un test molto semplice, non stressante per l'animale, ma efficace per valutare le differenze nella lunghezza del passo degli animali. I topi sono stati indotti a camminare in modo non forzato su un foglio di carta assorbente bianca per cinque volte. Sono state considerate solo le camminate che non mostravano esitazioni o interruzioni. Se gli animali si fermavano o vi erano episodi di *grooming*, le camminate venivano scartate. Successivamente sono stati analizzate le impronte lasciate dagli animali, in

particolare la distanza tra due impronte della stessa zampa, ovvero la lunghezza del passo (*stride length*).

4.8 Protocollo sperimentale utilizzato per il modello *in vivo* di PD

La 6-OHDA, tossina che si accumula selettivamente nei neuroni dopaminergici, è stata iniettata nello striato destro dei topi. Gli animali del gruppo di controllo (Sham) hanno ricevuto lo stesso volume di fisiologica sterile nello striato destro. Ad ogni animale posto nello stereotasso sono stati iniettati 2 μ l (0.5 μ l/min) di 6-OHDA (2 μ g/ μ l). L'ago è stato lasciato *in loco* per 5 minuti. L'iniezione è stata effettuata utilizzando una siringa Hamilton alle seguenti coordinate: AP:+0,05 mm, ML:-0,20 mm, DV:-0,35 mm dal bregma (secondo l'atlante di Franklin and Paxinos, 1997).

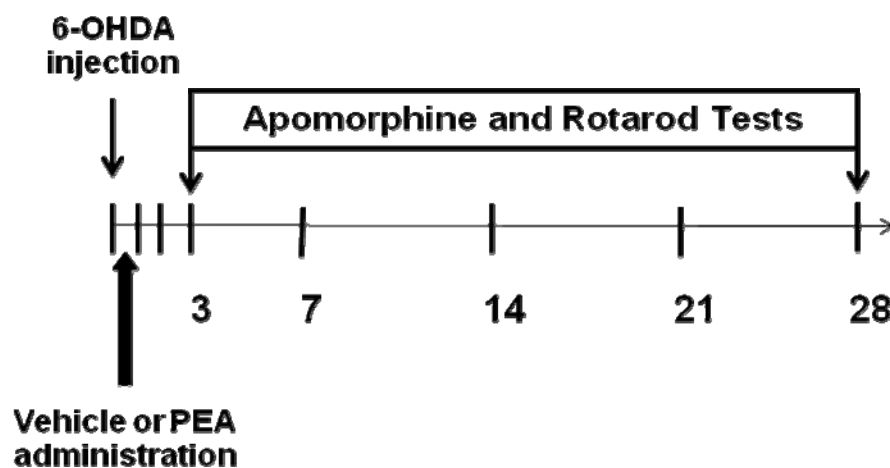


Fig.4 Protocollo sperimentale utilizzato nel modello *in vivo* di PD

La PEA è stata somministrata una volta al giorno per via sottocutanea (s.c.), con il trattamento che iniziava 3 ore dopo l'iniezione striatale di 6-OHDA. Dopo 3, 7, 14, 21 e 28 giorni di trattamento con la PEA, gli animali sono stati sottoposti a due test comportamentali, quali il rotarod ed il test dell'apomorfina, allo scopo di valutarne rispettivamente la coordinazione motoria e di quantificare l'entità del danno striatale.

4.8.1 Test del rotarod

L'attività locomotoria è stata valutata utilizzando il Rotarod (Ugo Basile, modello 7750). Questo strumento è costituito da un cilindro con superficie antiscivolo (7 cm di diametro, 50 cm di larghezza) che ruota in senso orizzontale. Il cilindro è suddiviso da sei dischi in cinque sezioni di uguale larghezza. Ogni sezione si trova a 26 cm dalla piattaforma. L'apparecchiatura è collocata ad almeno 50 cm da terra al fine di impedire la fuga dell'animale. Gli animali sono posizionati in ogni sezione, al fine di abituarli alla rotazione. Il cilindro è programmato in modo tale da aumentare la velocità di rotazione, da un minimo di 4 ad un massimo di 40 rpm, in 5 min. L'integrità della coordinazione motoria è valutata calcolando il tempo che l'animale riesce a stare in equilibrio sul cilindro, dall'inizio della rotazione a quando cade sulla leva del contagiri.

4.8.2 Test dell'apomorfina

Gli animali sono stati posti in un cilindro opaco di 30 cm e lasciati abituare al nuovo ambiente per 10 minuti. Gli animali hanno poi ricevuto per via intraperitoneale (i.p.) una singola dose dell'agonista dopaminergico apomorfina (1mg/kg in soluzione fisiologica). I topi sono stati monitorati per 1 h e sono state contate sia le rotazioni contralaterali (verso il lato non lesionato) che quelle ipsilaterali (verso il lato lesionato). Se l'iniezione stereotassica è andata a buon fine, gli animali del gruppo di controllo non effettueranno alcuna rotazione, mentre gli animali con la sola 6-OHDA effettueranno rotazioni contro laterali, dal momento che l'apomorfina attiverà in maniera predominante lo striato danneggiato.

4.9 Protocollo sperimentale utilizzato per il modello *in vivo* di AD

La PEA è stata somministrata una volta al giorno s.c., con il trattamento che iniziava 3 ore dopo l'iniezione i.c.v. di Ab 25-35. Dopo 7 giorni di trattamento è stata valutata la *performance* nell'alternanza spontanea attraverso il Y-maze test. Il giorno dopo (8 giorni dopo la somministrazione di Ab 25-35) gli animali sono stati sottoposti al Morris water-maze test per 5 giorni consecutivi. Dopo un giorno di riposo (giorno 13), gli stessi topi sono stati sottoposti il 14° giorno al Morris water-maze, utilizzando questa volta un protocollo specifico per valutarne la working memory (Fig.5, flow chart A).

Un gruppo differente di topi è stato trattato come precedentemente descritto con la PEA, ma sottoposto al “novel object recognition (NOR) test” ed un altro gruppo è stato trattato con il GW7647 e sottoposto sia la NOR test che al Y-maze test.

Per valutare l’effetto in acuto della PEA, ad un gruppo differente di topi è stata somministrata una singola dose di PEA 30 minuti prima dell’inizio del Y-maze test (Fig.5, flow chart B).

Infine, per l’analisi biochimica e molecolare, un altro gruppo è stato trattato con PEA per 5 giorni e poi sacrificati (Fig.5, flow chart C).

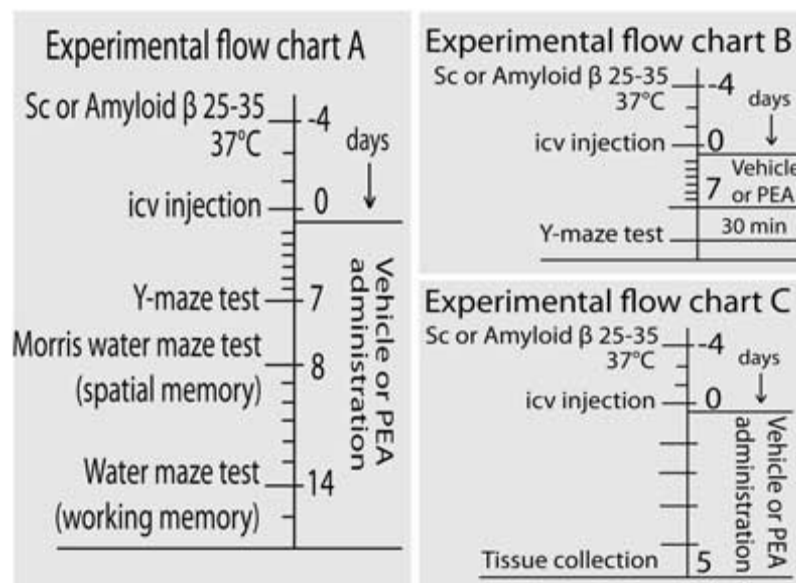


Fig.5 Protocollo sperimentale utilizzato nel il modello di AD

4.9.1 Y- Maze test (Performance dell'alternanza spontanea)

Ogni animale. *naïve* verso l'apparato, è stato inserito nella porzione terminale di una delle braccia del Y-maze (composto da 3 braccia della lunghezza di 40 cm e separate tra loro da un angolo di 120°) (Fig.6).

All'animale è stato permesso di muoversi liberamente nell'apparato durante la sessione dalla durata di 5 minuti.

La sequenza di entrate nelle braccia effettuate dall'animale, incluse le entrate nelle braccia già esplorate, è stata registrata visivamente.

Un'alternanza è definita come le entrate dell'animale in tutte e tre le braccia in trials consecutivi. Il numero totale delle possibili alternanze era pertanto il numero totale delle entrate meno due, e la percentuale delle alternanze è stato calcolato come (effettive alternanze / alternanze totali) X 100.

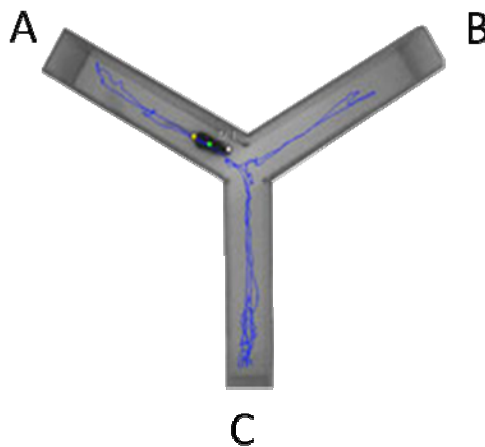


Fig.6 Apparato del Y-Maze

4.9.2 Morris Water-Maze (Memoria spaziale e test mnemonici)

Il water-maze è una vasca circolare di 170 cm di diametro e 60 cm di altezza. La temperatura dell'acqua (23 ± 1 °C) così come la sua opacità, l'intensità dell'illuminazione ed i segnali visivi nella camera sono stati rigorosamente riprodotti durante i giorni del test. Una piattaforma trasparente non scivolosa del diametro di 10 cm è stata immersa e posta ad una distanza dalla superficie di 1.5 cm durante l'acquisizione dei trials.

L'iter esplorativo dell'animale è stato registrato usando un software di video-tracking (Any-maze, Stoelting, Wood Dale, IL, USA). Il software è stato regolato in modo da dividere la vasca in 4 quadranti. Il training consisteva in 4 nuotate al giorno per 5 giorni, con un intervallo di 15 minuti l'uno dall'altro. Le posizioni di partenza erano determinate *pseudo-randomly* ed ogni animale era lasciato nuotare per 90 secondi o fino al raggiungimento della piattaforma. Alla scoperta della piattaforma erano lasciati lì sopra per 20 secondi. La latenza relativa alla scoperta della piattaforma è stata espressa come media \pm SEM e calcolata per ogni giorno di test (Fig.7).

Un probe test è stato eseguito al giorno 5 1 h dopo l'ultima nuotata. La piattaforma veniva rimossa ed ogni animale veniva lasciato nuotare per 60 secondi. La posizione di partenza di ogni animale corrispondeva ad una delle due posizioni più lontane dalla precedente posizione della piattaforma. Il quadrante dove era presente la piattaforma nei giorni precedenti è stato

denominato “quadrante di training” ed è stata determinata la percentuale del tempo speso in tale quadrante.

4.9.3 Water-Maze (Working Memory)

E' un test che valuta specificamente la memoria a breve termine. E' stato condotto per 3 giorni, la posizione della piattaforma veniva cambiata tutti i giorni, ma non durante i trials dello stesso giorno. Ogni animale era sottoposto a 4 trials al giorno, con un intervallo di 2 minuti tra l'uno e l'altro.

I dati riportati rappresentano la media della *performance* nei giorni per ogni trial.

Il primo trial è di tipo esplorativo nel quale l'animale può nuotare fino alla scoperta della nuova posizione della piattaforma. Durante gli altri trial, l'animale usa la sua working memory per aumentare la sua abilità nel trovare la piattaforma (Yamada et al, 1999; Maurice et al, 2008). La diminuzione del tempo di latenza tra il trial 1 ed il trial 4 può pertanto essere valutata come indice di *performance* della working memory.

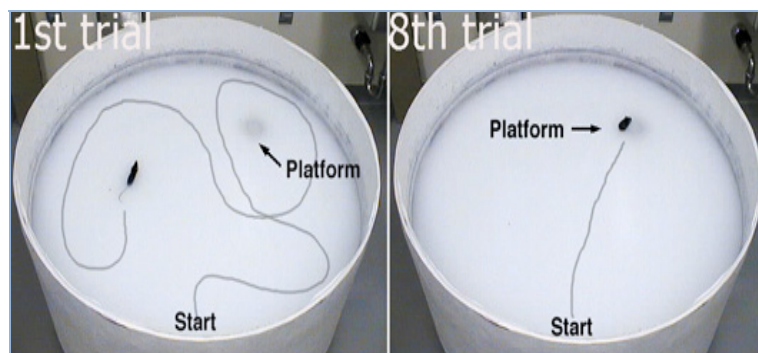


Fig.7 Water Maze

4.9.4 NOR Test

Il NOR test consiste in due diverse sessioni: la prima è una sessione di *training*, seguita da una sessione di *testing* 24 h dopo (Fig.8).

Gli animali venivano abituati per 2 giorni all'area in cui veniva eseguito il test. Durante la sessione di *training*, cioè la prima, nell'area del test venivano posti due oggetti differenti (A e B). Ogni animale poteva esplorare entrambi gli oggetti per 5 minuti. L'animale esplorava l'oggetto quando aveva la testa rivolta verso l'oggetto o quando interagiva con l'oggetto annusandolo o toccandolo. Il tempo speso per l'esplorazione veniva registrato da un operatore, il quale non era a conoscenza del trattamento, e veniva espresso come percentuale di tempo di esplorazione.

Nella sessione successiva, uno dei due oggetti veniva sostituito da un oggetto nuovo (C). Anche in questo caso l'animale poteva esplorare l'oggetto per 5 minuti ed il tempo speso per l'esplorazione è stato registrato.

Il tempo di esplorazione veniva normalizzato come percentuale del tempo totale di esplorazione. La preferenza verso nuovo oggetto è stato considerata come un mantenimento della memoria verso l'oggetto familiare.

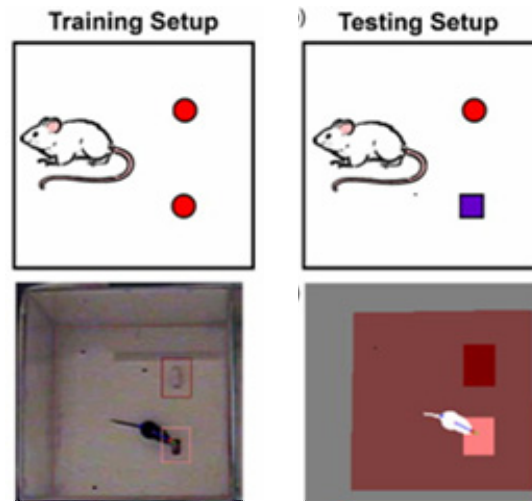


Fig.8 NOR test

4.9.5 Analisi Western Blot di lisati ippocampali

L'ippocampo è stato prelevato e successivamente omogenato in lysis buffer totale (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, NaF 10mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, , Na₃VO₄ 1mM, leupeptina 10µg/ml, inibitore della tripsina 10µg/ml). Dopo 45 minuti, i tessuti lisati sono stati centrifugati a 14000 r.p.m. per 20 minuti a 4°C ed il contenuto proteico del surnatante ottenuto è stato misurato utilizzando albumina sierica bovina (Sigma-Aldrich) come standard. 70 µg sono stati separati su gel di SDS-poliacrilamide e le membrane sono state incubate con gli anticorpi anti-

iNOS (BD Biosciences, Buccinasco, Italia), anti-cleaved caspasi 3 o anti-uncleaved-caspasi-3 (CellSignaling, da Euroclone, Milano, Italia). La chemilluminiscenza veniva visualizzata utilizzando l'ImageQuant 400 (GE Healthcare, Milano, Italia) ed analizzati con il software QuantityOne 4.6.3 (Biorad, Italia).

4.9.6 Misura della perossidazione lipidica

Gli animali sono stati sacrificati tramite decapitazione ed è stato rimosso rapidamente il cervello, che è stato pesato e mantenuto in azoto liquido fino all'esecuzione del saggio. Dopo lo scongelamento, i cervelli sono stati omogenati in metanolo freddo (1:10 p/v), centrifugati a 1000 g per 5 minuti e sono stati prelevati i surnatanti. L'omogenato è stato aggiunto a una soluzione contenente FeSO₄ 1 mM, H₂SO₄ 0.25M e Xylenol orange 1 mM e incubato per 30 minuti a t.a.. L'assorbanza è stata misurata a 580 nm (A₅₈₀₁) e sono stati aggiunti 10 µl di cumene idroperossido (CHP) 1 mM ad ogni campione per determinare il livello di ossidazione massimo. Dopo 30 minuti di incubazione a t.a., è stata misurata l'assorbanza a 580 nm (A₅₈₀₂). Il livello di perossidazione lipidica è stato determinato come CHP equivalenti così calcolati (Maurice et al, 1996):

$$\text{CHP equiv.} = A_{5801}/A_{5802} \times (\text{CHP (nmol)}) \times \text{diluizione}$$

4.10 Analisi Statistica

I dati sono stati espressi come media \pm SEM di 3 esperimenti. La comparazione di due gruppi è stata eseguita usando il t-test di Student. Quando si sono stati analizzati più di due gruppi i dati sono stati analizzati usando l'analisi in senso unico della varianza (ANOVA), seguito da test di Dunnett per comparazioni multiple solo nei test comportamentali del modello *in vivo* di AD.

Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

In particolare, nel Water-maze i tempi di latenza e quindi relativi alla “fuga” dell'animale sono stati analizzati utilizzando diverse misurazioni ANOVA. Per il *probe* dello stesso test il tempo speso nel quadrante “training” è stato analizzato confrontandolo con il livello di chance (15 secondi); per la valutazione della working memory, il miglioramento tra il trial 1 e 4 è stato analizzato vs il livello di 0 apprendimento (nessun miglioramento); per il NOR, la preferenza per il nuovo oggetto durante il trial di mantenimento è stata analizzata con un livello di chance del 50% usando il test dei ranghi con segno di Wilcoxon.

5. Risultati e discussione

Per lo studio sperimentale *in vitro* è stata utilizzata la linea cellulare SH-SY5Y di neuroblastoma umano, ampiamente utilizzata come modello neuronale fin dal 1980, poiché tale linea cellulare conserva molte proprietà biochimiche e funzionali proprie dei neuroni, tra le quali tirosina e β -dopamina idrossilasi e le subunità $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ del recettore nicotinico dell'Ach (Oyarce et al., 1991), oltre che al trasportatore della dopamina (DAT), espresso nel SNC solo nei neuroni dopaminergici (Takahashi et al., 1994).

Tuttavia, le cellule SH-SY5Y non esprimono elevati livelli di recettori dopaminergici e possono esser spinte verso un fenotipo marcatamente dopaminergico con l'utilizzo di agenti differenzianti, quali l'acido *all-trans* retinoico (RA). Il protocollo di differenziazione prevedeva l'aggiunta di RA 10 μ M per 5 giorni in mezzo all'1% FBS. L'avvenuto differenziamento cellulare è stato osservato prima di tutto a livello morfologico mediante microscopio ottico (fig. 9a). Infatti le SH-SY5Y differenziate presentano estesi prolungamenti citoplasmatici detti processi neuritici ed assimilabili per morfologia e funzione agli assoni neuronali. Il differenziamento cellulare è stato valutato anche attraverso analisi western blot (fig. 9b), in quanto il processo di differenziamento è associato ad un marcato aumento dell'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Lasorella et al., 1995). Allo scopo infine, di soddisfare uno degli obiettivi del lavoro, è stato

verificato, tramite immunofluorescenza, che il differenziamento non influenzasse l'espressione del recettore PPAR- α (fig.9c) e che fosse presente anche nel citoplasma, come è osservabile dal merge.

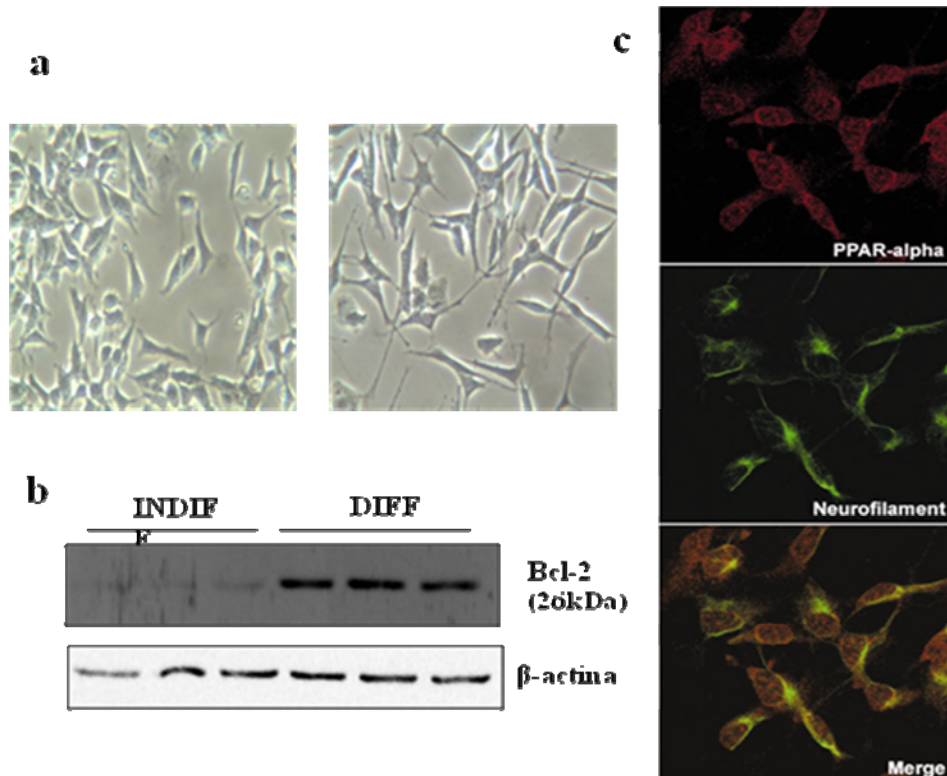


Fig.9 Il differenziamento cellule di neuroblastoma SH-SY5Y con RA (10 μ M) induce (a) modificazioni morfologiche osservabili al microscopio, (b) l'aumento dell'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 e (c) non modifica l'espressione del recettore PPAR- α .

Ottenuto un modello in vitro assimilabile a neuroni dopaminergici, è stata testata l'efficacia della PEA in modelli in vitro di PD, utilizzando la neurotossina 6-OHDA ed il rotenone, ampiamente utilizzati in letteratura per indurre PD.

La tossina 6-OHDA è utilizzata da più di 40 anni per indurre sperimentalmente il PD, sia *in vitro* (Duer e Przedborski, 2003) che *in vivo*, prima nei ratti (Ungersted, 1968) e poi nei topi (Akerud et al., 2001; Ghosh et al., 2007). La 6-OHDA condivide molte similarità con la dopamina e la noradrenalina, tra cui un'alta affinità per il DAT ed il trasportatore della noradrenalina (NET). Quindi la 6-OHDA è in grado di distruggere selettivamente le terminazioni catecolaminergiche. Una volta entrata, va incontro ad una repentina ossidazione nell'ambiente alcalino ed aerobio della cellula in perossido d'idrogeno e *para*-chinone, oltre a promuovere la formazione di specie reattive dell'ossigeno (Saner e Thoenen, 1971; Heikkila e Cohen, 1971).

Innanzitutto sono stati effettuati saggi di vitalità cellulare (saggi MTT) al fine di scegliere le concentrazioni di PEA e di 6-OHDA da utilizzare per gli esperimenti successivi. In particolare, per la PEA è stato scelto il *range* di concentrazione 0,1 μ M-3 μ M, poiché non modificava la vitalità cellulare basale, mentre per la 6-OHDA è stata scelta la concentrazione di 100 μ M, in quanto tale dose riduceva la vitalità cellulare di circa il 40% (dati non mostrati).

Le cellule di neuroblastoma differenziate sono state stimulate per 1 ora con la PEA (0,1-3 μ M) e successivamente incubate con la 6-OHDA. Dopo 24 ore è stato effettuato il saggio dell'MTT. Attraverso tale saggio è stato osservato che la PEA alle dosi di 1 e 3 μ M era in grado di proteggere le

cellule differenziate in maniera significativa dal danno indotto da 6-OHDA (fig.10a).

Le cellule differenziate sono state poi stimolate con il medesimo schema, utilizzando solo la dose di PEA di 1 μM e dopo 24 ore sottoposte al Trypan Blue Exclusion Assay. Tale test è l'ideale per valutare se l'effetto protettivo precedentemente osservato potesse dipendere da un'alterata attività mitocondriale. Anche in questo ultimo caso si è potuto osservare un effetto protettivo della pre-stimolazione con la PEA sul danno indotto dalla 6-OHDA (fig. 10b).

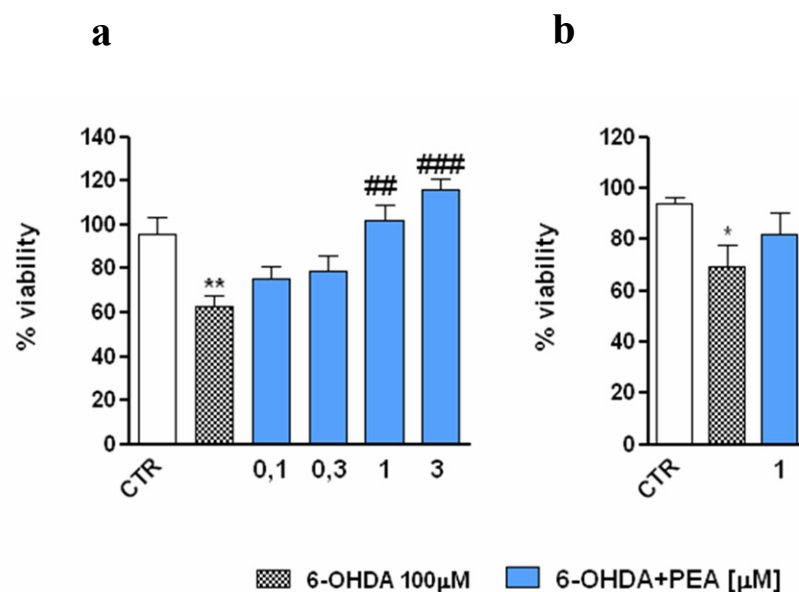


Fig.10 Effetto protettivo della PEA sul danno indotto dalla 6-OHDA su cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate. (a) saggio dell'MTT e (b) Trypan Blue Exclusion Assay. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs 6-CTR; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs 6-OHDA.

Per valutare se l'effetto protettivo osservato passasse attraverso l'attivazione del recettore PPAR- α , le cellule di neuroblastoma differenziate sono state pre-stimolate con il GW 7647, un potente ed altamente selettivo agonista sintetico di tale recettore. Anche in questo caso dopo 24 ore è stato osservato un effetto molto significativo alla dose di 0,3 μ M (fig. 11).

A questo punto dunque tale recettore sembra ricoprire un ruolo chiave nel proteggere le cellule neuronali dal danno indotto dalla 6-OHDA.

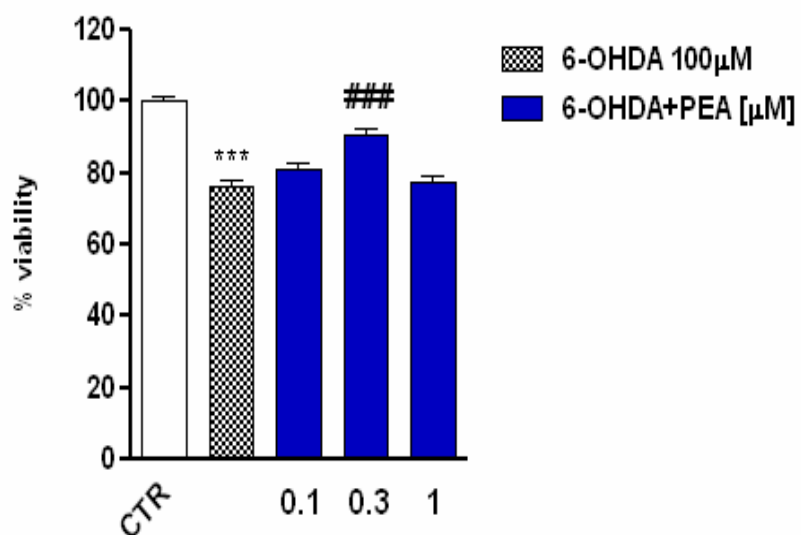


Fig.11 Effetto protettivo dell'agonista PPAR- α GW7647 sul danno indotto dalla 6-OHDA su cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate (saggio dell'MTT). *** $p < 0,001$ vs 6-CTR; ### $p < 0,001$ vs 6-OHDA.

Il passo successivo è stato quello di valutare l'efficacia della PEA in un altro modello sperimentale *in vitro* di PD, ovvero quello indotto dal rotenone, utilizzato come insetticida e pesticida in tutto il mondo (Hisata,

2002). Solo da circa 10 anni è utilizzato per indurre il PD sperimentalmente (Betarbet et al., 2000). Il rotenone fa parte della famiglia dei rotenoidi, potenti composti citotossici estratti da varie parti delle piante del genere *Leguminosa*. E' un composto altamente lipofilo che si accumula a livello mitocondriale. A questo livello rallenta la fosforilazione ossidativa inibendo in maniera irreversibile il complesso I della catena di trasporto elettronica mitocondriale (Schuler e Casida, 2001).

Le cellule SH-SY5Y differenziate sono state stimulate per 1 ora con la PEA (1-10 μM) e successivamente con rotenone (5 μM). Dopo 24 ore attraverso il saggio dell' MTT si è potuto osservare che nessuna delle concentrazioni di PEA utilizzate era in grado di proteggere le cellule di neuroblastoma differenziate dal danno indotto dall'insetticida (fig.12).

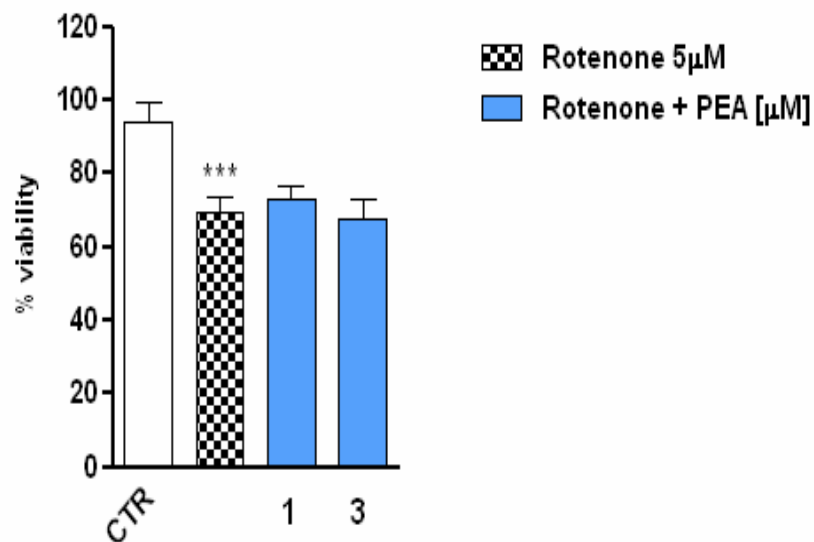


Fig. 12 La PEA non protegge le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate dal danno indotto dal rotenone. *** $p < 0,001$ vs CTR.

Sulla base dei dati sopra riportati si è ipotizzato che la PEA potesse esplicare l'effetto neuroprotettivo osservato agendo sui primi eventi del *signalling* di stress cellulare, quali l'entrata degli ioni Ca^{2+} . Per confermare tale ipotesi, si è testato il possibile effetto neuroprotettivo della PEA sulla neurotossicità causata dall'iperstimolazione glutammatergica utilizzando l'acido N-metil-D-aspartico (NMDA), agonista specifico dei recettori NMDA dell'acido glutammico, che è l'agonista fisiologico di tali recettori, sulle cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate.

Gli amminoacidi eccitatori, quali il glutammato, sono fortemente implicati nei meccanismi neurodegenerativi (Maragos et al., 1987; Choi, 1988; Greenamyre e Young, 1989). Le cellule neuronali non sono in grado di mantenere i livelli intracellulari di Ca^{2+} oltre un certo limite ed è ben noto che la neurotossicità indotta dagli amminoacidi eccitatori è mediata largamente dall'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , che si manifesta in elevati livelli intracellulari di tale ione (Choi, 1987; Mattson et al., 1988, 1989a, 1991a). Vi è comunque una stretta correlazione tra la vulnerabilità neuronale in patologie quali il morbo di Huntington e l'AD e la vulnerabilità neuronale indotta *in vitro* dagli amminoacidi eccitatori (Mattson and Kater, 1989).

Inoltre, molte delle alterazioni del citoscheletro osservate nell'AD possono esser indotte sperimentalmente dagli amminoacidi eccitatori in colture di

neuroni ippocampali di ratto (Mattson, 1990). Livelli sostenuti di Ca^{2+} intracellulare causano una riduzione del numero di microtubuli, l'accumulo di proteine anche ubiquitinate. Apparentemente le chinasi attivate dal Ca^{2+} causano un eccesso della fosforilazione della proteina *tau* (Grundke-Iqbal et al., 1986; Ueda et al., 1990), e tale fosforilazione è un importante caratteristica dell'AD.

Dai nostri esperimenti si osserva che anche in tale modello di neurodegenerazione la PEA è efficace nel proteggere le cellule di neuroblastoma differenziate dalla tossicità indotta dall'NMDA (fig.13), confermando l'ipotesi che questa aciletanolamide endogena possa agire sui primi eventi cellulari, come l'aumento citosolico di Ca^{2+} , che portano all'attivazione dei meccanismi di stress ossidativo ed apoptotici che sono caratteristici della patologia dell'AD.

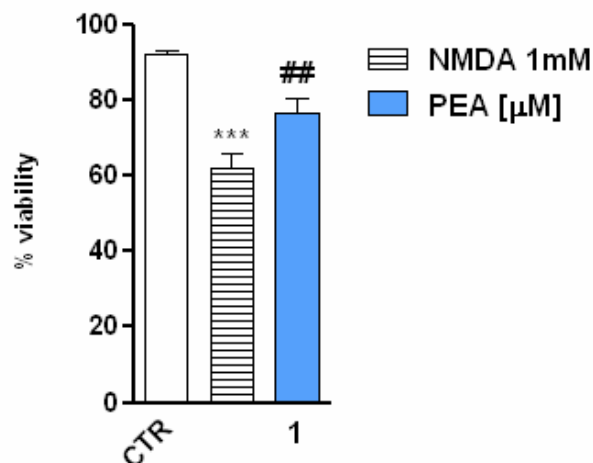


Fig. 13 Effetto protettivo della PEA su cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate dal danno indotto dall'NMDA (Trypan Blue Exclusion Assay). *** $p < 0,001$ vs 6-CTR; ## $p < 0,01$ vs NMDA.

A questo punto si è cercato di approfondire il meccanismo molecolare sotteso all'effetto protettivo osservato.

Le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate sono state stimulate con tunicamicina (TM, 10µg/ml), sostanza prodotta da diversi batteri ed in grado di indurre ER stress, poiché è in grado di bloccare la N-glicosilazione, una tappa chiave del ripiegamento proteico. Come già accennato, l'ER controlla, assieme ai mitocondri, la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} in risposta a stimoli esterni (Kass e Orrenius, 1999), oltre ad occuparsi del “controllo di qualità” delle proteine, in quanto sovrintende al loro corretto ripiegamento (Gorlach et al., 2006). La deplezione dei depositi di Ca^{2+} dal *lumen* dell'ER, l'inibizione della N-glicosilazione delle proteine, come pure l'espressione di proteine mutate, provocano ER stress. La cellula cerca di far fronte a tale situazione attivando dei meccanismi protettivi, altamente conservati, chiamati nel complesso *unfolded protein response* (UPR) (Kaufmann, 1999; Zhao e Ackerman, 2006). Tali meccanismi vengono attivati anche fisiologicamente per il mantenimento dell'omeostasi cellulare (Fig.14). L'UPR interviene a vari livelli:

- Aumento dell'espressione delle proteine *chaperone* dell'ER;
- Aumento della degradazione delle proteine mal ripiegate;
- Inibizione della sintesi proteica.

Tutti questi meccanismi hanno lo scopo di svuotare l'ER (Paschen e

Frandsen, 2001; Rao et al., 2004). Se tutti questi meccanismi non riescono ad “alleviare” l’ER stress, vengono attivati *pathways* apoptotici, ma i meccanismi cellulari coinvolti sono ancora poco conosciuti (Breckenridge et al., 2003). E’ tuttavia noto che l’alterazione della funzione del sistema ubiquitina-proteasoma, responsabile della degradazione di tutte le proteine cellulari, è in grado di contribuire all’ER stress (Ciechanover e Brundin, 2003; Imai et al., 2001; Korhonen e Lindholm, 2004).

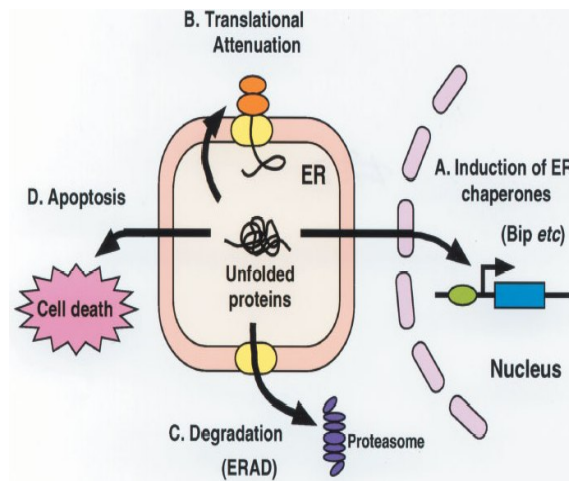


Fig.14 *Unfolded protein response (UPR)*

Dagli esperimenti di vitalità cellulare condotti sulle cellule di neuroblastoma differenziate si può osservare che la pre-stimolazione di 1 ora con la PEA (1 μ M) era in grado di proteggere in maniera significativa tale linea cellulare dal danno indotto da TM (fig. 15).

Tale effetto è osservabile, sempre in maniera significativa, anche nel caso in cui le cellule venivano stimulate 1h prima con l’agonista di sintesi del

recettore PPAR- α , il GW7647 (0,3-1 μ M) (fig. 15).

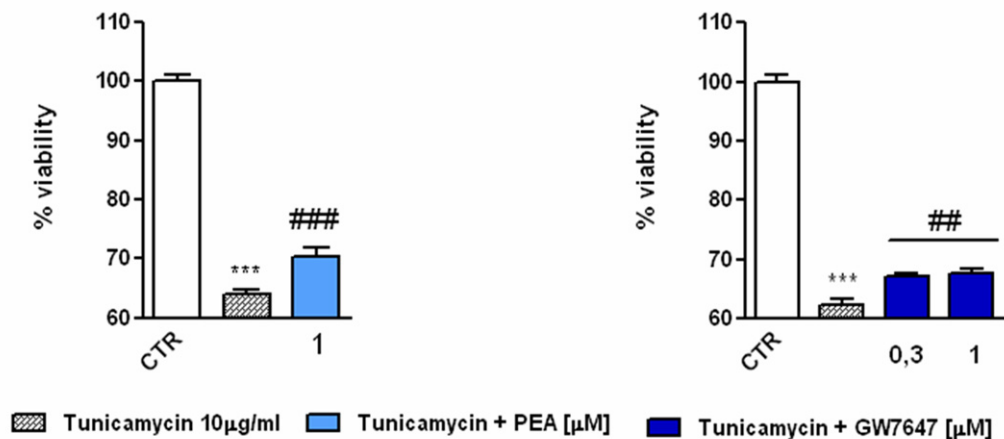


Fig. 15 Effetto protettivo della PEA e dell'agonista di sintesi GW 7647 del recettore PPAR- α su cellule di neuroblastoma SH-SY5Y differenziate nel danno da tunicamicina (TM) (Saggio dell'MTT). *** $p < 0,001$ vs CTR; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs TM.

Per ottenere un'ulteriore prova dell'attività protettiva del recettore PPAR- α in caso di ER stress, abbiamo utilizzato cellule di neuroblastoma murino Neuro2a trasfettate in maniera transiente per il gene codificante tale recettore.

Abbiamo prima di tutto valutato l'attività protettiva del GW7647 nelle cellule Neuro2a stimulate con TM (5 μ g/ml).

Anche in questo caso i tempi di stimolazione erano i medesimi degli esperimenti precedenti. I risultati hanno mostrato che la pre-stimolazione di 1 ora con l'agonista di sintesi proteggeva in maniera significativa le cellule Neuro2a alla dose di 3 μ M dall'ER stress. Ciò è stato osservato sia attraverso il Trypan Blue Exclusion Assay (fig. 16b) e sia attraverso il saggio dell'MTT (fig. 16c), entrambi effettuati dopo 24 ore di stimolazione con TM. L'effetto protettivo del GW7647 alla dose di 3 μ M è stato

osservato anche attraverso analisi morfologica al microscopio ottico, in quanto il pre-trattamento con tale agonista era in grado di ripristinare la morfologia cellulare (fig.16a).

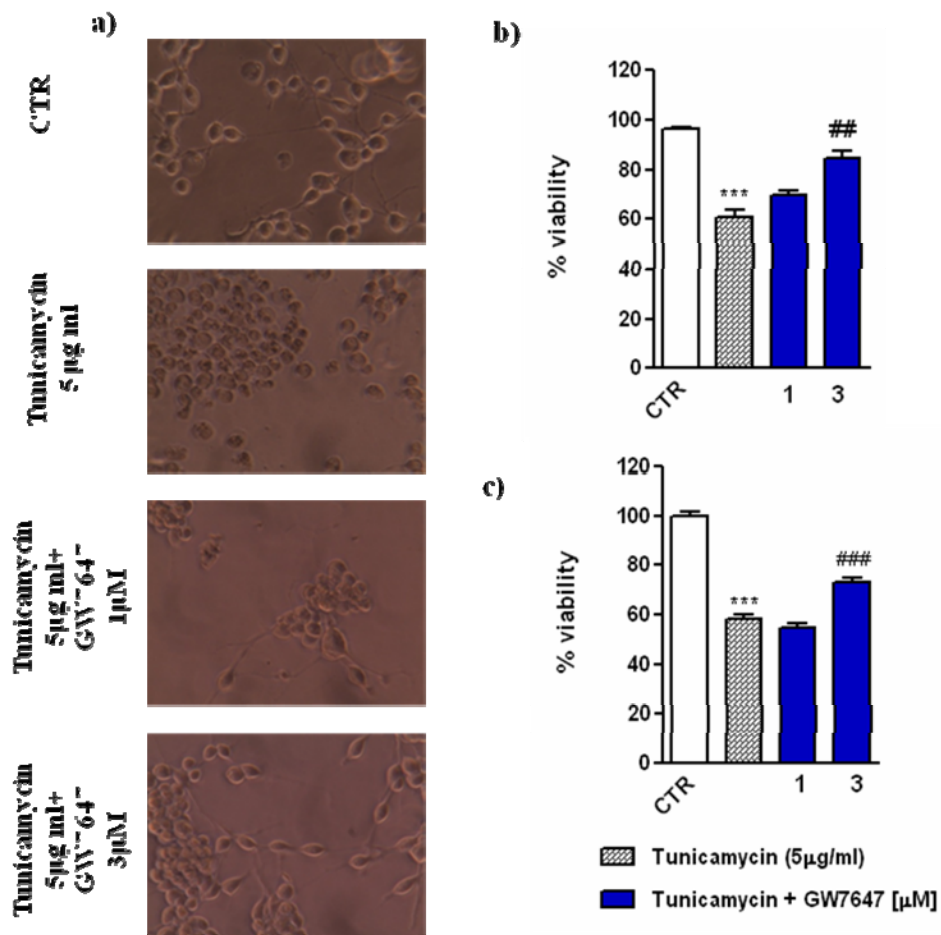


Fig.16 Effetto protettivo dell'attivazione del recettore PPAR- α da parte del suo agonista di sintesi GW 7647 su cellule di neuroblastoma Neuro2a osservato attraverso (a) microscopio ottico, (b) Trypan Blue Exclusion Assay e (c) saggio dell'MTT. *** $p < 0,001$ vs 6-CTR; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs TM.

In seguito, le cellule Neuro2a sono state trasfettate con il cDNA del PPAR- α e avente come tag il FLAG[®], allo scopo di over-esprimere tale recettore e di poter rilevare la localizzazione cellulare del PPAR- α attraverso l'utilizzo di un anticorpo anti-FLAG[®]. Dopo la trasfezione le cellule Neuro2a sono

state pre-stimolate con GW7647 (3 μ M) per 1 ora e con TM (5 μ g/ml). Dopo 24 è stato effettuato un saggio di immunofluorescenza. Come in precedenza, anche in tale esperimento si è osservato un effetto dell'agonista di sintesi del PPAR- α , GW7647, sulla morfologia cellulare. Con l'ausilio del anticorpo anti-FLAG[®] è stato possibile osservare che nelle cellule trattate con la sola TM il PPAR- α si trova nella zona perinucleare, mentre se pre-stimolate con GW7647, il PPAR- α è presente sia a livello nucleare, sia a livello dei prolungamenti (fig. 17).

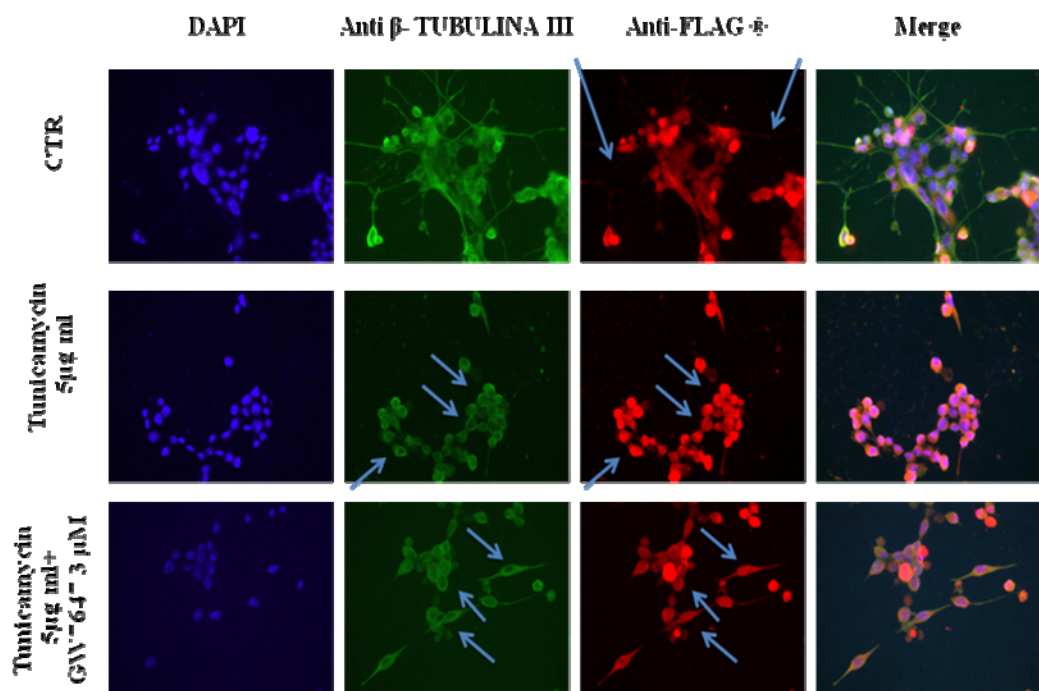


Fig. 17 Immagini di doppia immunofluorescenza delle Neuro2a trasfettate per il PPAR- α . (magnificazione 40X)

Tutte queste evidenze suggeriscono che il recettore PPAR- α si attiva e riduce il danno da TM, facendo ipotizzare che il recettore PPAR- α possa

ricoprire un ruolo fondamentale nel proteggere le cellule SH-SY5Y e le cellule Neuro2a dall'ER stress, alla base di numerose patologie neurodegenerative.

E' stato verificato, a questo punto, se l'assenza del recettore PPAR- α potesse in qualche modo influenzare la risposta fisiologica all'ER stress. Attraverso analisi western blot dei lisati di cervelli di animali WT ed animali PPAR- α /KO, sono stati riscontrati livelli di ubiquitinazione proteica significativamente più alti nei topi PPAR α -KO rispetto ai livelli riscontrati negli animali WT in condizioni basali (fig. 18).

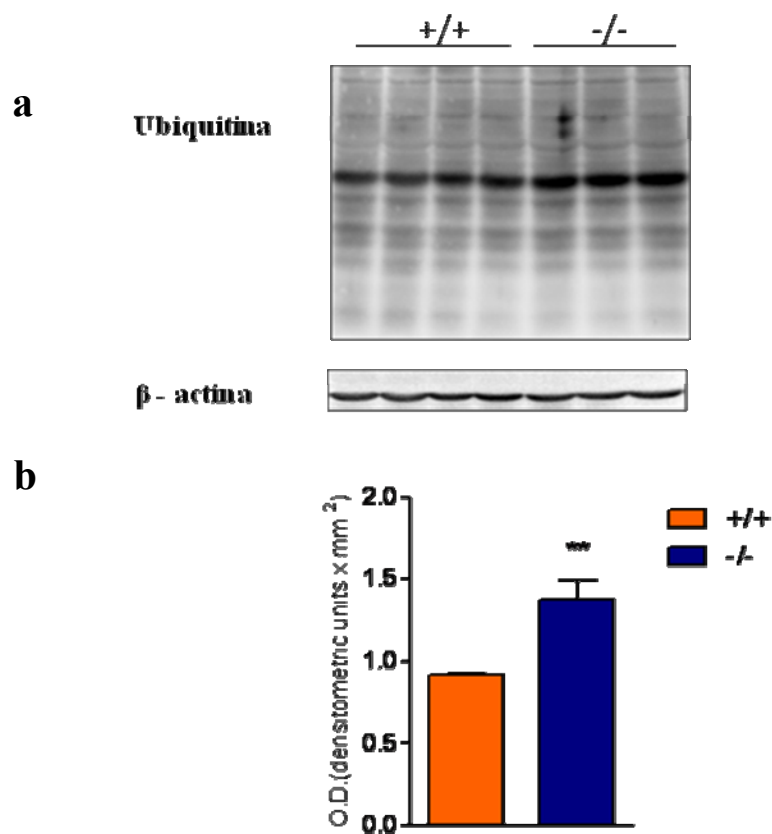


Fig. 18(a) Analisi western blot effettuata su lisati di cervelli di topi WT e PPAR- α KO dei livelli di ubiquitinazione proteica in condizioni basali ed (b) analisi densitometrica. ** p<0,01 vs WT.

E' dunque chiaro che il PPAR- α ricopre un ruolo importante nel modulare la risposta cellulare all'ER stress, in quanto la sua mancanza provoca un aumento di proteine ubiquitinate, marker di ER stress.

Oltre a questa differenza tra topi WT e PPAR- α KO, è stata osservata una differenza del loro comportamento al test del rotarod in condizioni basali. Attraverso questo test che valuta la coordinazione motoria degli animali, si è potuto osservare che gli animali KO presentavano un *impairment* motorio già all'età di 6-8 mesi rispetto agli animali WT della medesima età, in quanto gli animali WT erano in grado di rimanere più tempo sull'apparecchio. Inoltre, la *performance* motoria degli animali WT con il passare dei giorni e ad ogni trial migliora, mentre ciò non accade negli animali KO (fig. 18a).

Abbiamo poi avuto modo di osservare che c'è una sostanziale differenza tra WT e KO in condizioni basali anche nell'analisi del passo o della cosiddetto *stride length*, in quanto gli animali KO mostravano una diminuzione della distanza tra due impronte successive lasciate dalla stessa zampa rispetto agli animali WT (fig. 18b).

E' dunque un'ulteriore prova del fatto che la mancanza del recettore PPAR- α è causa di un *impairment* motorio.

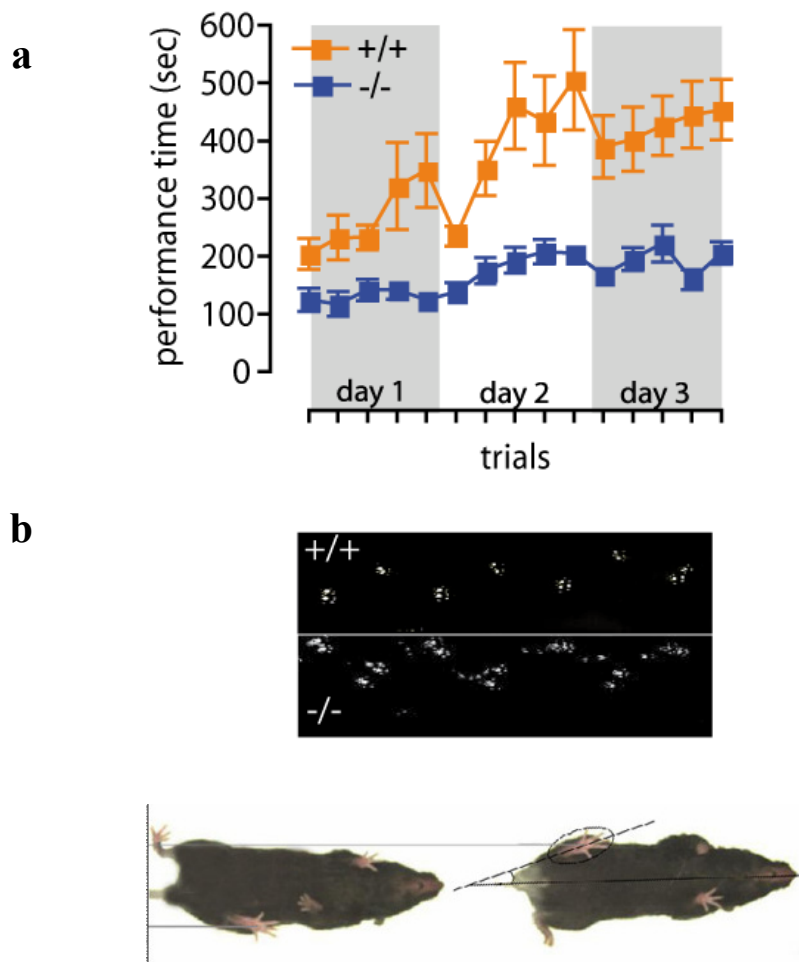


Fig. 19 Differenze nel comportamento motorio degli animali WT e PPAR- α KO (a) al test del rotarod e (b) all'analisi del passo o della *stride length*.

Alla luce di queste ultime evidenze abbiamo verificato l'efficacia della PEA, ligando endogeno del recettore PPAR- α , in un modello *in vivo* di PD, patologia caratterizzata proprio dall'insorgenza di sintomi motori (Lee et al., 1994).

Utilizzando il modello sperimentale proposto da Alvarez-Fischer e collaboratori (2008), abbiamo utilizzato una dose bassa 6-OHDA (4 μ g) allo scopo di mimare una progressiva degenerazione delle terminazioni dopaminergiche, che di solito si verifica nelle forme giovanili o *early-onset* di PD.

I dati ottenuti indicano che dopo 3 e 7 giorni dalla somministrazione intra-striatale di 6-OHDA gli animali mostravano una significativa riduzione della coordinazione motoria rispetto al gruppo sham, che aveva ricevuto nello striato solo il veicolo. Ciò veniva valutato attraverso test del rotarod.

In particolare, al giorno 3, il trattamento con PEA s.c. alle dosi di 10 e 30 mg/kg produceva un effetto significativo rispetto agli animali del gruppo che avevano ricevuto solo l'iniezione di 6-OHDA, mentre la dose di 3 mg/kg non risultava efficace (fig. 20a).

Con il trattamento ripetuto di 7 giorni con PEA, tutte le dosi sono risultate significative nel migliorare la *performance* motoria rispetto agli animali che avevano ricevuto la sola 6-OHDA (fig. 20b). Tuttavia anche questo gruppo al giorno 7 mostra una tendenza al migliorare la propria *performance*, in quanto il numero di cadute, pur essendo molto significativo verso il gruppo sham, diminuisce (fig. 20c e d).

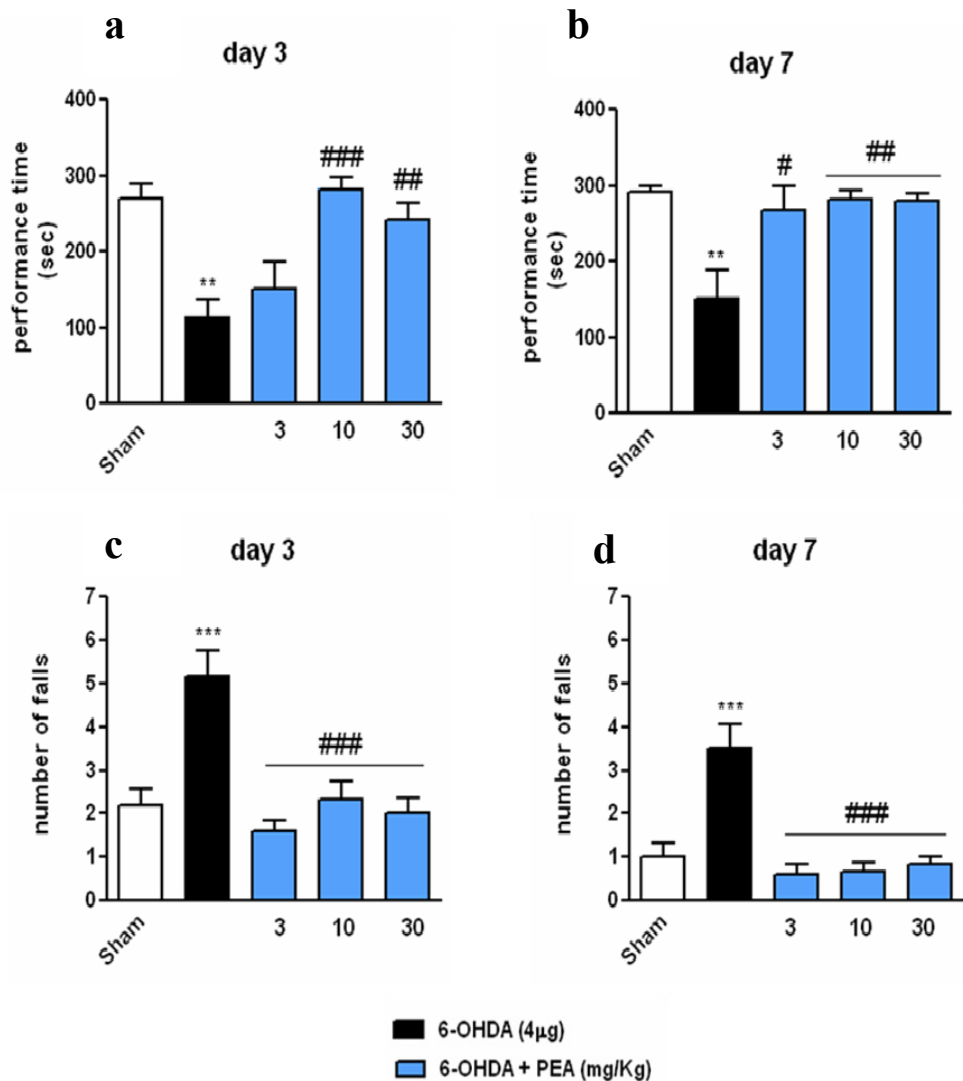


Fig. 20 Test del rotarod effettuato dopo 3 e 7 giorni di somministrazione di PEA., iniziata 3 ore dopo l'iniezione striatale di 6-OHDA. Tempo speso sull'apparecchio (a) il giorno 3 ed (b) il giorno 7; numero di cadute degli animali dall'apparecchio (a) al giorno 3 ed (b) al giorno 7. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs sham, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs 6-OHDA.

I risultati ottenuti a 14, 21 e 28 giorni rivelano un pieno recupero della coordinazione motoria degli animali che avevano ricevuto la sola iniezione di 6-OHDA, già osservato nel modello sperimentale proposto da Alvarez-Fischer e collaboratori (2008) (Fig. 21). Ciò potrebbe esser dovuto

all'utilizzo della bassa dose di 6-OHDA utilizzata (4µg). Tuttavia Bezard e collaboratori (2003) avendo già osservato questo recupero spontaneo hanno suggerito che nella fase pre-sintomatica del PD (mimata in questo caso dalla scelta di utilizzare una bassa dose di 6-OHDA) entrano in gioco diversi meccanismi compensatori che non dipendono dal metabolismo dopaminergico. Questi meccanismi sono:

- l'*up-regulation* dei recettori dopaminergici di tipo 2 (D₂) a livello striatale;
- l'*up-regulation* dell'encefalina, sempre a livello striatale;
- l'incremento dell'attività elettrofisiologica dei nuclei sub-talamici e del *globus pallidus*, che negli ultimi anni sono stati al centro di numerosi studi (Pollack et al., 1993; Yu e Neimat, 2008) che attraverso la *deep brain stimulation* (DBS) hanno dimostrato un miglioramento della bradicinesia, del tremore e della rigidità, tipiche del PD;
- il cambiamento dell'attività cerebellare e dei nuclei talamici;

e possono esser attivi al di là della fase pre-sintomatica della patologia.

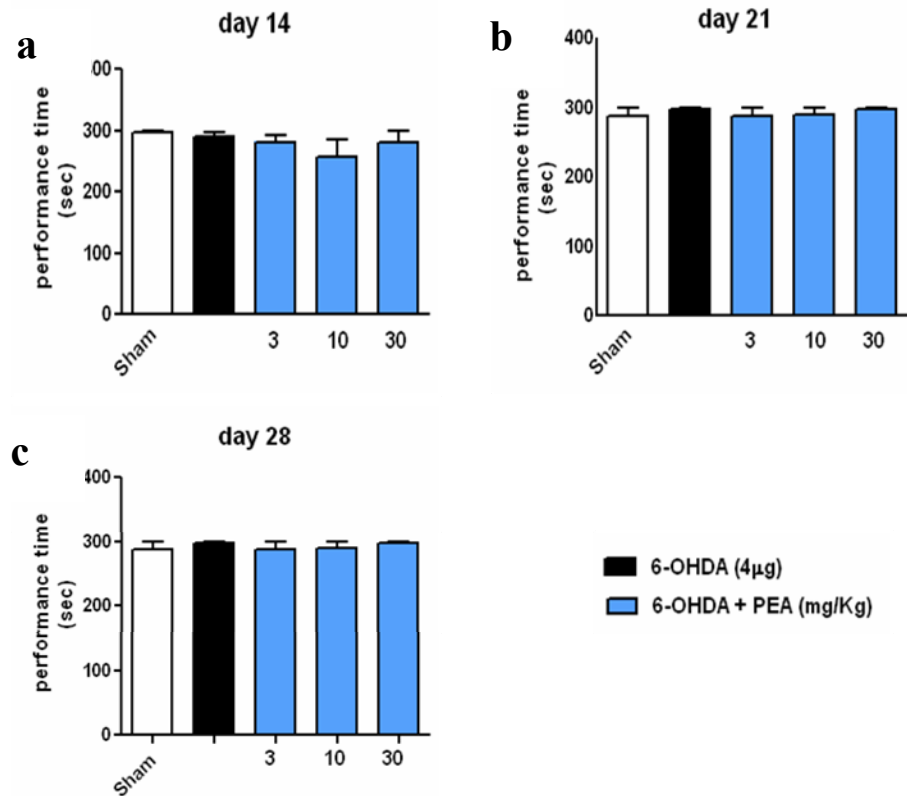


Fig. 21 Test del rotarod effettuato dopo 14, 21 e 28 giorni di somministrazione di PEA, iniziata 3 ore dopo l'iniezione striatale di 6-OHDA. Tempo speso sull'apparecchio (a) il giorno 14, (b) il giorno 21 e (c) il giorno 28.

La nostra ricerca ha approfondito la valutazione dell'entità del danno striatale da 6-OHDA con il test dell'apomorfina.

Nei giorni 3, 7 e 14 giorni dalla somministrazione della 6-OHDA, gli animali che avevano ricevuto la sola 6-OHDA mostravano un elevato numero di rotazioni rispetto al gruppo sham (fig. 22a, b e c). Con il passare dei giorni, il numero di rotazioni del gruppo 6-OHDA aumenta sempre di più (fig. 22d ed e).

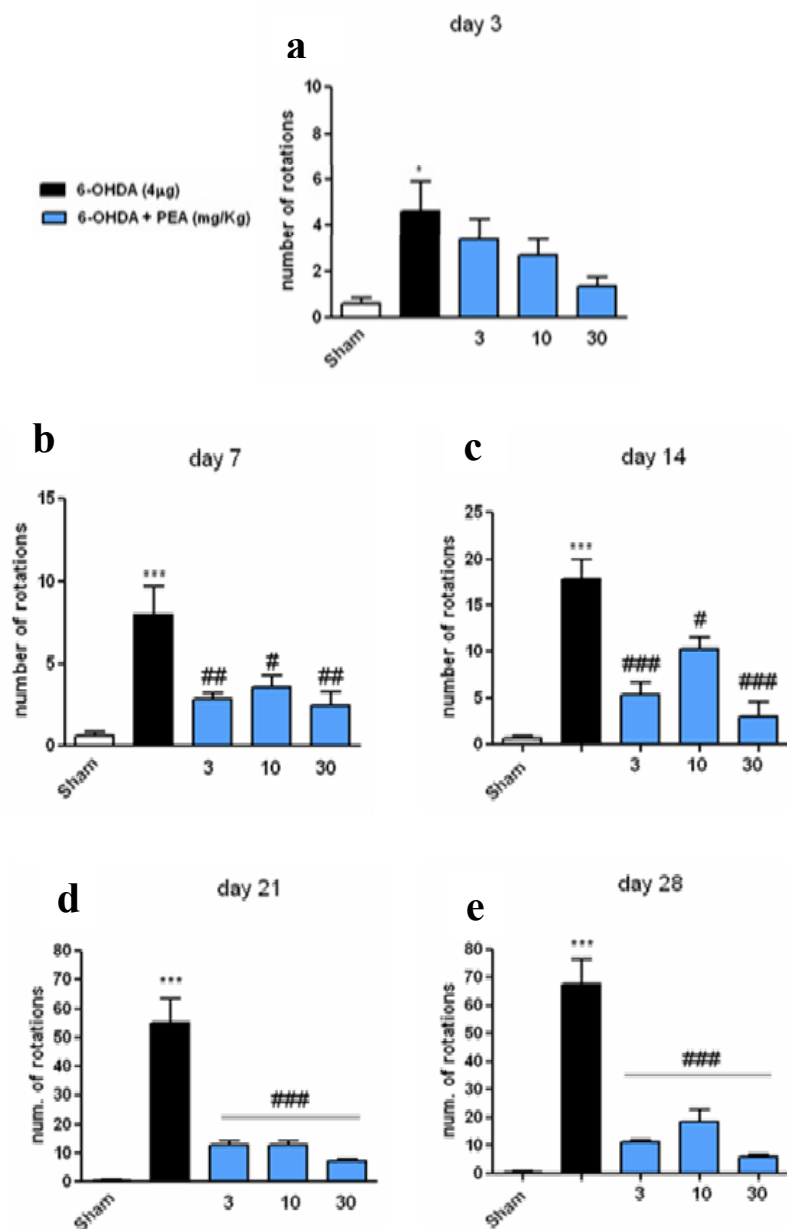


Fig. 22 Numeri di rotazioni indotte dalla somministrazione di apomorfina (1 mg/kg, i.p.) (a) al giorno 3, (b) 7, (c) 14, (d) 21 e (e) 28. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs sham; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs 6-OHDA.

Il trattamento ripetuto con PEA a tutte le dosi utilizzate nello studio dopo 3 giorni non mostra alcuna differenza rispetto al gruppo di animali 6-OHDA (fig. 22a). Solo dopo 7 giorni di trattamento e fino a 28 giorni,

l'aciletanolamide alle dosi di 3-30 mg/kg è in grado di ridurre in maniera significativa il numero di rotazioni indotto dall'apomorfina (fig. 22b, c, d ed e).

Sulla base di queste evidenze ottenute *in vitro*, è stata valutata per la prima volta il possibile effetto neuroprotettivo della PEA in un modello *in vivo* di AD.

La somministrazione i.c.v di Ab 25-35 era in grado di indurre dopo 7 giorni una significativa diminuzione della performance nell'alternanza spontanea rispetto alla ScAb25-35 (controllo negativo). La PEA, in maniera dose-dipendente, incrementava la percentuale dell'alternanza spontanea, ma soprattutto, con la dose più alta di 30mg/kg, la riportava ai livelli del gruppo di animali trattati con ScAb 25-35 (fig. 23a). Non veniva riscontrata al contrario alcuna differenza nelle entrate nei bracci (fig. 23b).

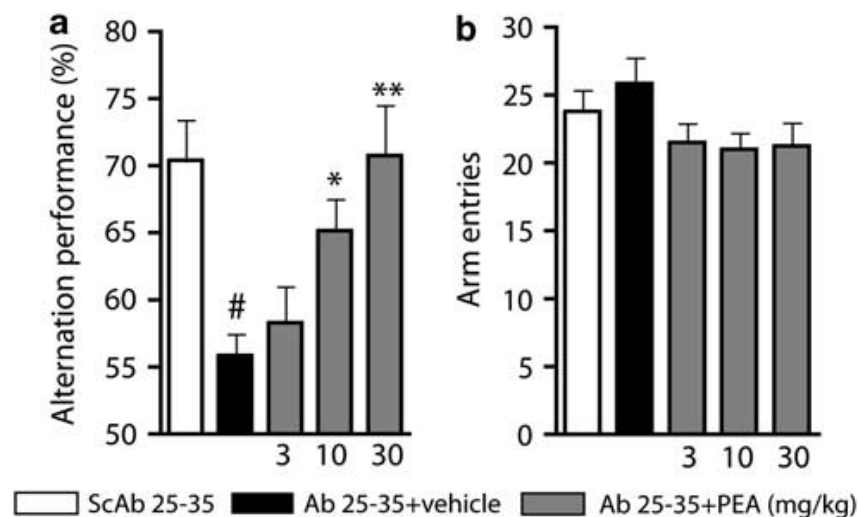


Fig.23 Effetto neuroprotettivo della PEA sul deficit di alternanza spontanea indotta da β -amiloide 25-35 (Ab25-35) nel topo. (a) Performance dell'alternanza e (b) numero di atti esplorativi delle braccia. # $p < 0.05$, vs ScAb 25-35; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Ab 25-35

L'effetto della somministrazione di Ab 25-35 sulla *working memory* spaziale e di riferimento è stato analizzato utilizzando il Morris water-maze test.

Gli animali trattati con ScAb 25-35 hanno mostrato una diminuzione significativa della latenza, indicativa dell'abilità mnemonica. Di contro la latenza mostrata dagli animali trattati con Ab 25-35 è stata superiore per tutti i trials di training rispetto a quelli trattati con ScAb 25-35. Anche in questo caso, il trattamento con la PEA attenuava il deficit di apprendimento in maniera dose-dipendente: in particolare la dose di 30mg/kg risultava essere maggiormente efficace, oltre a normalizzare quasi completamente il profilo di apprendimento degli animali (Fig. 24a e b). A conferma del potenziale terapeutico della PEA, un'ora dopo l'ultima nuotata è stato effettuato il probe test, durante il quale la piattaforma veniva rimossa. Tale test ha rivelato che gli animali trattati ScAb 25-35 e PEA (30 mg/Kg) esploravano preferenzialmente il quadrante di training in misura simile (Fig. 24c). Nonostante non si siano rilevate differenze significative nella velocità di "corsa" tra i gruppi (Fig. 24d), è stato osservato che gli animali trattati con Ab25-35 mostravano un aumento significativo del comportamento tigmotattico durante il primo trail del primo giorno (quando gli animali erano naive all'apparato) che risulta essere indicativo di un maggiore stato d'ansia. Il trattamento con PEA alla dose più alta normalizzava tale comportamento ansioso (Fig. 24f). Gli animali a questo

punto venivano sottoposti ad una procedura modificata del Morris water-maze test, allo scopo di valutarne la “working memory”, una componente della memoria a breve termine. I nostri dati hanno mostrato che il trattamento con Ab 25-35 aumentava il tempo di latenza e quindi il tempo di raggiungimento della piattaforma, mentre i topi trattati con ScAb 25-35 erano capaci di imparare la nuova posizione della piattaforma ogni volta (Fig. 24g). Un miglioramento è stato analizzato anche in termini di differenze di tempo tra il trial 1 ed il trial 4 (fig. 24h): il gruppo trattato con ScAb mostrava una diminuzione della latenza significativamente più alta di zero. Anche qui il trattamento con PEA mostrava un trend di normalizzazione rispetto al deficit indotto dalla Ab, con un profilo di apprendimento comparabile a quello dei topi trattati con ScAb (fig. 24g e h). Il deficit indotto da Ab 25-35 sembra essere correlato all’alterazione del sistema colinergico e glutammatergico cortico-limbico (Maurice et al, 1996; Olariu et al, 2001). Pertanto, farmaci che accelerano questi sistemi possono esercitare in acuto un effetto anti-amnesico, in un maniera indipendente dalla loro azione sulla progressione della neurodegenerazione.

Per testare questa possibilità è stato condotto un ulteriore esperimento, per esaminare un possibile effetto anti-amnesico della PEA.

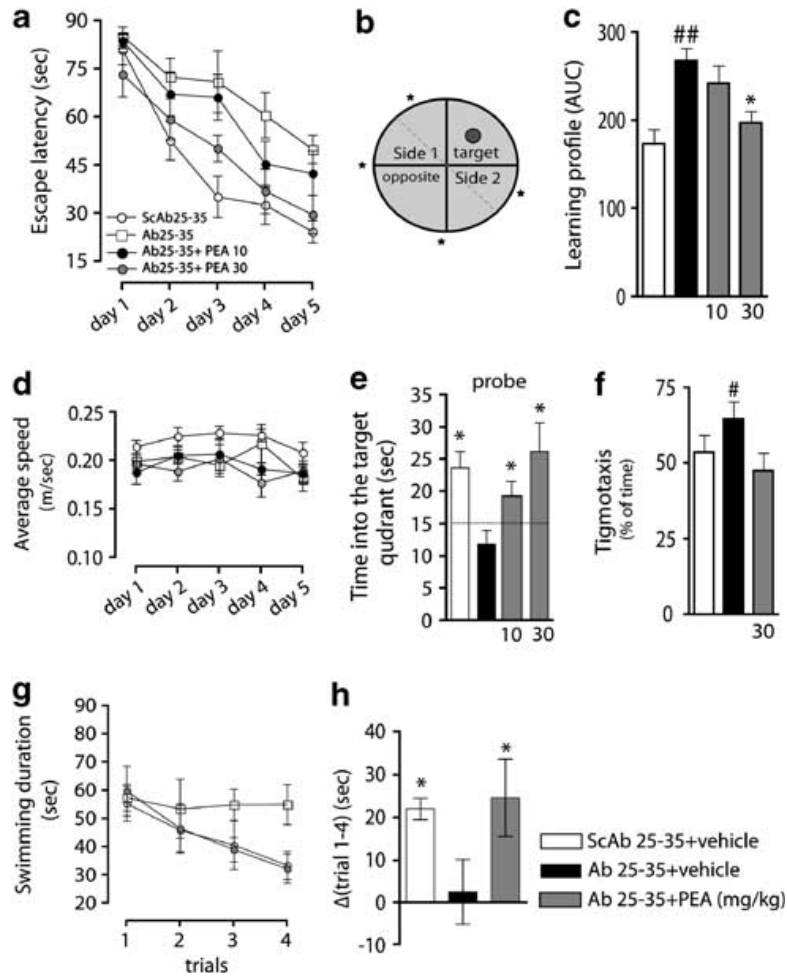


Fig. 24 Effetto neuroprotettivo della PEA su animali con deficit nella memoria spaziale indotto da amiloide- β 25-35 (Ab25-35). a) Profili di acquisizione: gli animali sottoposti all'acquisizione di una piattaforma invisibile posta in una posizione fissa (quadrante target) con 4 nuotate per giorno per 5 giorni. (b) Schema dell'apparato (c) Profili di acquisizione visualizzati come area sotto la curva (AUC) indicativa delle abilità di apprendimento. (d) Grafico indicativo della velocità durante l'esecuzione del test. (e) Sessioni del Probe test: 2 ore dopo l'ultima nuotata il giorno 5, la piattaforma è stata rimossa e il tempo speso nel quadrante target è stato analizzato; * $P < 0.05$ vs un livello di scelta di 15 secondi (Test dei ranghi con segno di Wilcoxon). (f) Tigmotassi durante la prima nuotata del primo giorno indicativo di un comportamento ansioso; # $p < 0.05$ vs ScAb 25-35. (g) Profili di acquisizione e (h) miglioramenti tra il trial 1 e 4; * $p < 0.05$ vs una possibilità di zero (Test dei ranghi con segno di Wilcoxon).

La working memory “spaziale” è stata valutata con il Y-maze test. Gli animali trattati con Ab 25-35 avevano una performance relativa all'alternanza del 55% e con la somministrazione di PEA non si riscontrava alcun miglioramento (fig. 25a e b). Non si riscontrava nemmeno un

cambiamento del numero degli atti esplorativi (fig. 25b), della velocità (fig. 25c), o della distanza percorsa durante tutta la durata del test (fig. 25d).

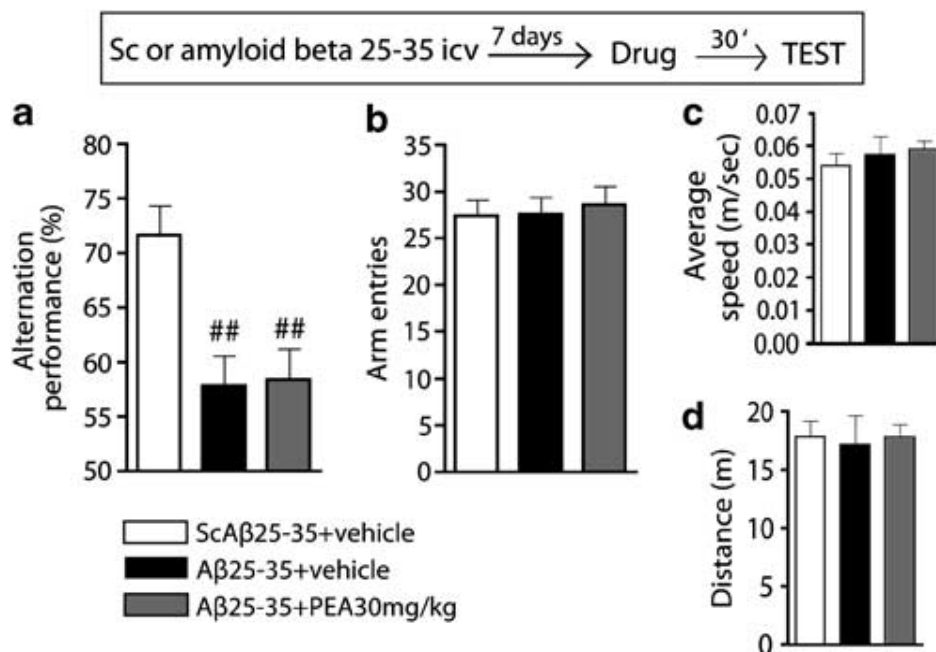


Fig.25 Effetto anti-amnesico in acuto della PEA nel deficit di alternanza spontanea indotta da amiloide- β 25-35 (Ab25-35). (a) Performance dell'alternanza, (b) numero totale di atti esplorativi, (c) velocità media durante il test e (d) distanza percorsa nell'apparato. Dopo 7 giorni, gli animali (9 per gruppo) hanno ricevuto una singola iniezione intraperitoneale di veicolo o PEA (30 mg/Kg), 30 minuti prima dell'inizio del Y-maze test. ^{##}p<0.01 vs ScAb25-35

Poichè il ruolo del recettore PPAR- α nelle funzioni cerebrali non è ancora pienamente conosciuto, è stato verificato se l'ablazione genetica del PPAR- α potesse produrre dei tratti fenotipicamente rilevanti per i nostri esperimenti. Come mostrato nella fig.26, topi maschi PPAR- α KO ed i loro controlli giovani (8-9 settimane di età) non differiscono quando testati nel Y-maze (fig. 26a e b) e nel Morris water-maze test (fig. 26c e d).

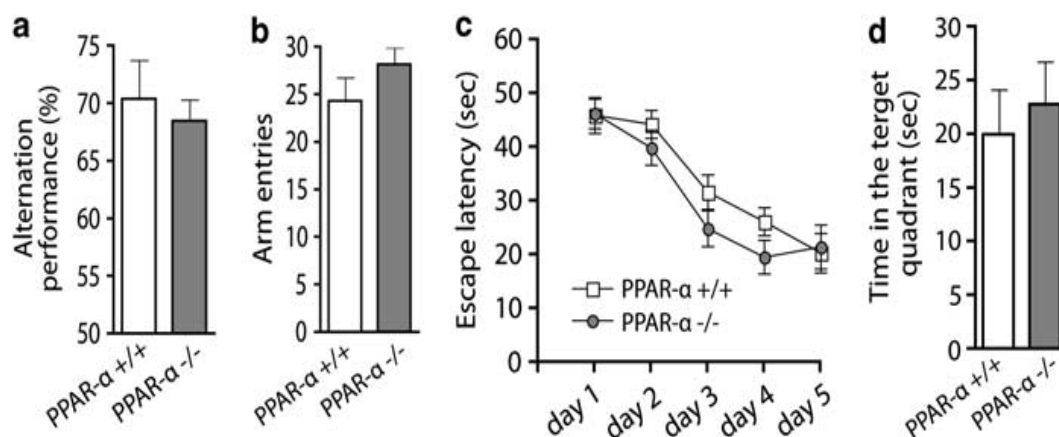


Fig.26 Profilo mnemonico dell'animale PPAR- α KO. Effetto dell'assenza di PPAR- α funzionale nell' (a) alternanza spontanea, e (b) numero di atti esplorativi nelle braccia del Y-maze. (c) Profilo della memoria spaziale e (d) richiamo della memoria spaziale nel Morris Water Maze.

Per valutare se l'assenza di PPAR- α potesse interferire con l'effetto protettivo della PEA verso il deficit mnemonico prodotto da Ab 25-35, è stato testata la dose maggiormente attiva, 30 mg/Kg, in topi PPAR- α KO. La PEA non è in grado di normalizzare la *performance* dell'alternanza spontanea dei topi PPAR- α KO dopo 7 giorni di trattamento (fig. 27a e b).

Per dimostrare ulteriormente il coinvolgimento del recettore PPAR- α , abbiamo utilizzato anche l'agonista GW7647. Il trattamento con GW7647 (5mg/kg al giorno per 7 giorni) riduceva il deficit dell'alternanza spontanea causato da Ab 25-35 e, come ci si attendeva, era inefficace se somministrato a topi PPAR- α KO (fig. 27c).

Per estendere le nostre osservazioni anche all'apprendimento non spaziale, abbiamo sottoposto gli animali al NOR test.

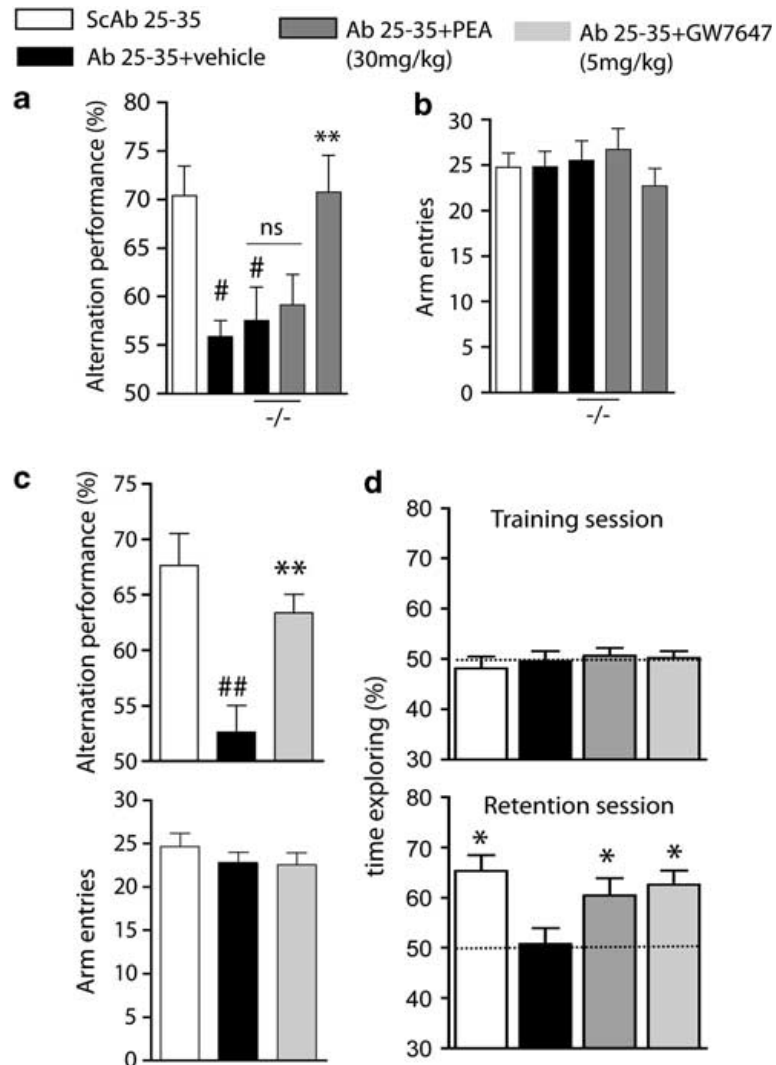


Fig. 27 L'effetto neuroprotettivo della PEA nella tossicità indotta da amiloide- β -25-35 (Ab25-35) è dipendente dal PPAR- α . (a) Performance nell'alternanza e (b) numero di atti esplorativi delle braccia. (c) GW7647, agonista sintetico del PPAR- α , mima l'effetto della PEA. Dopo 7 giorni, i topi esaminati per alternanza spontanea nel Y-maze. # $P < 0.05$ o ## $P < 0.01$ vs ScAb25-35; ** $p < 0.01$ vs Ab25-35; test di Dunnett. (d) Novel object recognition (NOR). * $p < 0.05$ vs una possibilità di scelta del 50% (Test dei ranghi con segno di Wilcoxon).

I topi trattati con Ab 25-35 non hanno mostrato una preferenza per il nuovo oggetto dopo 24 ore, mentre il gruppo trattato con ScAb 25-35 e PEA (30mg/kg/ *die*) o GW7647 (5mg/kg/*die*) mostravano una percentuale di esplorazione del nuovo oggetto significativamente più alta del 50% (fig. 27d).

Infine ci siamo soffermati sull'analisi negli estratti ippocampali di alcuni marker biochimici e molecolari rappresentativi del danno indotto da Ab 25-35, allo scopo di supportare le osservazioni comportamentali.

Il frammento Ab 25-35 aumentava significativamente i livelli di perossidazione lipidica, di nitrosilazione delle proteine, induceva l'espressione della ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e la morte cellulare attraverso il pathway apoptoticocaspasi-dipendente (fig. 28). Il trattamento quotidiano con la PEA (30mg/kg) per 5 giorni riduceva significativamente l'incremento della perossidazione lipidica, oltre che l'espressione della iNOS e l'attivazione della caspasi- 3.

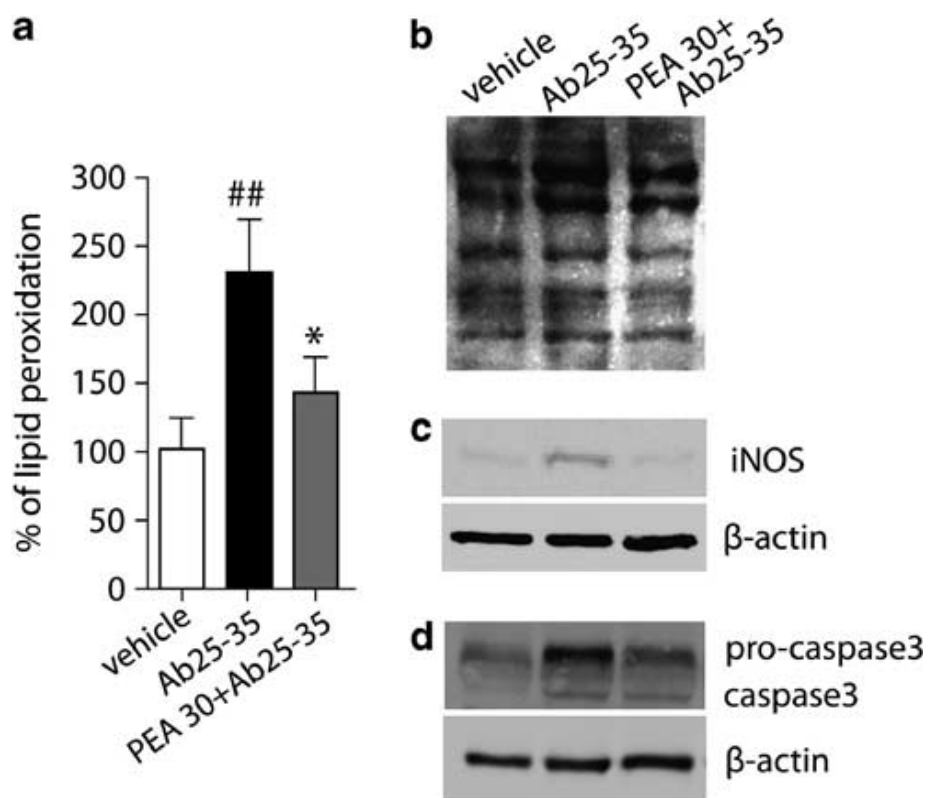


Fig. 28 Effetto neuroprotettivo della PEA (30 mg/Kg): (a) livelli di perossidazione lipidica, (b) livelli di nitrosilazione proteica; (c) espressione della ossido nitrico sintetasi inducibile (iNOS); (d) espressione della caspasi-3. ## $p < 0.01$ vs veicolo, * $p < 0.01$ vs Ab25-35.

6. Conclusioni

Le ben documentate attività anti-infiammatorie della PEA sono osservabili in diverse popolazioni cellulari neuronali e non neuronali (Skaper et al., 2013), quali astrociti e microglia. In particolare, a livello del SNC i mastociti giocano un ruolo chiave nelle patologie infiammatorie e neurodegenerative (Skaper et al., 1996). Sempre più evidenze suggeriscono che il *cross-talk* tra i mastociti e la glia ha un ruolo importante nella neuroinfiammazione, poiché esacerbano la risposta infiammatoria acuta, accelerando così la progressione delle patologie neurodegenerative (Skaper et al., 2013). Quindi in questo contesto la PEA può contribuire al mantenimento dell'omeostasi cellulare, in quanto in caso di danno a livello del SNC i livelli di questa aciletanolamide aumentano (Franklin et al., 2003; Hansen et al., 1997; Berger et al., 2004).

Di particolare interesse è il fatto che la PEA esplica la sua attività anti-infiammatoria attraverso l'attivazione del recettore PPAR- α in un *range* di concentrazioni normalmente rilevate nei tessuti dei mammiferi (Fu et al., 2003; Lo Verme et al., 2005a), suggerendo un pieno coinvolgimento di questa molecola nell'omeostasi tissutale.

Il mio progetto di dottorato ha in parte chiarito, il ruolo della PEA a livello del SNC, dal momento che sembra capace di proteggere le popolazioni cellulari neuronali da danni in grado di indurre patologie neurodegenerative. Tra quest'ultime, quelle maggiormente diffuse sono il

PD e l'AD, la cui diffusione è destinata ad aumentare a causa del miglioramento delle condizioni di vita e all'allungamento della vita stessa (Ferri et al., 2005; Dorsey et al., 2007). Per tali ragioni, la ricerca negli ultimi anni ha cercato di intensificare lo studio di tali patologie allo scopo di sviluppare delle nuove strategie di cura.

Poiché la PEA possiede ben documentate attività antinfiammatorie e la neuroinfiammazione è una caratteristica comune di PD e AD, è stata valutata l'efficacia della PEA in modelli sperimentali validati di PD e di AD sia *in vitro* che *in vivo*.

I dati ottenuti *in vitro* su cellule di neuroblastoma SHSY5Y, opportunamente differenziate verso il fenotipo dopaminergico, hanno dimostrato che la PEA è in grado di proteggere questa linea cellulare dal danno indotto dalla tossina 6-OHDA, mentre sembra essere inefficace nel proteggere dal danno indotto dal pesticida rotenone, entrambi utilizzati per riprodurre sperimentalmente PD (Przedborski e Tieu, 2005; Betarbet et al., 2000), anche se il loro meccanismo d'azione è differente.

Il meccanismo sotteso all'attività neurotossica della 6-OHDA non è stato ancora del tutto chiarito, ma è noto che l'auto-ossidazione della 6-OHDA induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno, che costituisce il principale meccanismo molecolare sotteso alla sua neurotossicità (Sachs and Jonsson 1975; Soto-Otero et al., 2000). E' stato tuttavia suggerito che la 6-OHDA possa inibire anche la catena respiratoria mitocondriale, poiché

è in grado di inibire il complesso I ed il complesso IV in mitocondri isolati (Glinka and Youdim, 1995). In particolare, Glinka e collaboratori (1997) hanno suggerito che la formazione di specie reattive dell'ossigeno e l'inibizione dei complessi I e IV della catena mitocondriale sono meccanismi tra loro indipendenti e che possono agire sinergicamente *in vivo*. Tuttavia studi più recenti hanno dimostrato che la generazione di specie reattive dell'ossigeno gioca un ruolo di gran lunga più importante nella tossicità sui neuroni dopaminergici e che gli effetti tossici selettivi su questa popolazione neuronale sono dovuti alla loro particolare sensibilità allo stress ossidativo (Berretta et al. 2005; Hanrott et al. 2006).

Ulteriori osservazioni hanno dimostrato che la 6-OHDA è in grado di evocare un elevato incremento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} , indicando una rapida diminuzione dell'omeostasi di tale ione. Da sottolineare inoltre che i livelli di Ca^{2+} intracellulare indotto dalla 6-OHDA non ritorna ai livelli basali dopo il *washout* della tossina, indicando così un effetto sostenuto sulla regolazione del Ca^{2+} (Berretta et al., 2005).

Abbiamo dimostrato che l'effetto protettivo osservato nel danno da 6-OHDA è dipendente da un meccanismo molecolare che vede il recettore nucleare PPAR- α svolgere un ruolo fondamentale nel controllo delle prime fasi del meccanismo neurodegenerativo. Se il ruolo del recettore PPAR- α è stato precedentemente studiato per interpretare l'attività anti-infiammatoria della PEA in modelli danno periferico, i nostri risultati hanno chiarito che

nel danno da 6-OHDA il PPAR- α gioca un ruolo di primaria importanza. Infatti abbiamo dimostrato che l'agonista di sintesi di tale recettore, il GW 7647, è in grado di mimare l'azione protettiva della PEA.

Il modello del rotenone, nel quale la PEA è risultata inefficace, è sostenuto dal danno ottenuto attraverso l'inibizione irreversibile del complesso I della catena di trasporto elettronica mitocondriale (Schuler e Casida, 2001) e l'esposizione a tale sostanza causa una selettiva degenerazione del *pathway* dopaminergico nigrostriatale. Il meccanismo sotteso all'attività neurotossica del rotenone è stato chiarito da Sherer e collaboratori (2003), dal momento che hanno dimostrato che cellule di neuroblastoma umano SK-N-MC (con caratteristiche simili alle cellule utilizzate in questo lavoro di tesi), che esprimevano la subunità NADH-deidrogenasi del complesso I insensibile al rotenone (NDI1), erano resistenti alla sua tossicità. Pertanto gli effetti che si osservano in seguito al danno da rotenone, quali modesta deplezione di ATP, danno ossidativo e morte cellulare, possono essere pienamente spiegati attraverso l'inibizione del complesso I. Inoltre sempre più lavori suggeriscono che il complesso I mitocondriale potrebbe essere fonte di specie reattive dell'ossigeno che innescano quei meccanismi cellulari che conducono a morte cellulare (Cassarino et al., 1997; Hensley et al., 1998; Barrientos and Moraes, 1999; Kushnareva et al., 2002).

E' pur vero che la PEA svolge un'intensa azione a livello mitocondriale che porta ad un aumentato *turnover* del colesterolo e quindi ad un aumento

della sintesi dei neurosteroidi. I neurosteroidi sono ben noti per le loro attività *scavenger* verso i radicali liberi e per ridurre l'eccitabilità neuronale attraverso un meccanismo GABA-A dipendente (Mattace Raso et al., 2011; Zheng, 2009; Kokate et al., 1999). Tali effetti, che si osservano in tempi brevissimi, costituiscono un tipo di risposta non genomica modulata della PEA, che tuttavia potrebbe essere di fondamentale importanza, almeno nelle prime fasi che conducono al processo neurodegenerativo. Infatti gli enzimi modulati sono il Cyp450scc e la StAR, ovvero la proteina regolatrice della steroidogenesi che è attiva però in acuto. Dunque la PEA non è in grado di proteggere le cellule di neuroblastoma dal danno indotto dal rotenone, poiché si tratta di un danno sostenuto nel tempo e che la cellula non riesce a contrastare, se non nelle primissime fasi, senza però ottenere risultati efficaci nel tempo.

E' noto tuttavia dalla letteratura che la PEA svolge un'importante azione sui canali ionici, modulando i flussi di K^+ e di Ca^{2+} in maniera PPAR- α -dipendente (Lo Verme et al., 2006; Melis et al., 2008; Barana et al., 2010). Tali osservazioni bene si adattano al modello sperimentale di PD della 6-OHDA, che porta all'aumento dei flussi di calcio come *trigger* dei meccanismi neurodegenerativi.

L'utilizzo di un modello di neurodegenerazione che coinvolge attivazione di flussi ionici come la stimolazione delle cellule di neuroblastoma con l'acido N-metil-D-aspartico (NMDA) è stato utilizzato per testare la

possibile modulazione da parte della PEA. Tale modello è in grado di mimare il danno indotto dall'iperstimolazione glutammatergica, poiché l'NMDA è in grado di attivare il recettore del glutammato (NMDAr), permettendo l'entrata di ioni Ca^{2+} e Na^+ nella cellula e la fuoriuscita di ioni K^+ . E' ben noto dalla letteratura che la neurotossicità indotta dagli amminoacidi eccitatori è mediata largamente dall'alterazione dell'omeostasi del Ca^{2+} , che si manifesta in elevati livelli intracellulari di tale ione (Choi, 1987; Mattson et al., 1988, 1989a, 1991a). Tuttavia molte delle alterazione del citoscheletro osservate nell'AD possono esser indotte sperimentalmente dagli amminoacidi eccitatori in colture di neuroni ippocampali di ratto (Mattson, 1990). Livelli sostenuti di Ca^{2+} intracellulare, conseguenza principale del danno da 6-OHDA, sono in grado di ridurre anche il numero dei microtubuli e di promuovere l'accumulo di proteine, anche ubiquitinate. Infine, altri studi hanno messo in evidenza che le chinasi attivate dal Ca^{2+} sono in grado di causare un'eccessiva fosforilazione della proteina *tau* (Grundke-Iqbal et al., 1986; Ueda et al., 1990), che è una peculiarità dell'AD, oltre all'accumulo extracellulare di aggregati di Ab (Sisodia, 2000).

Anche in questo modello sperimentale la PEA mostra un'attività protettiva verso il danno indotto da un'iperstimolazione glutammatergica. Per le motivazioni sopra elencate, viene confermata l'ipotesi che la PEA possa esplicare il suo effetto protettivo agendo sui primi eventi del *signalling* di

stress cellulare, quali l'entrata degli ioni Ca^{2+} , che conduce poi all'attivazione dei meccanismi di neurodegenerazione.

Poiché l'omeostasi intracellulare del Ca^{2+} è controllata non solo dai mitocondri, ma anche da un organello cellulare molto vicino ad esso fisicamente, quale l'ER. Massicce variazioni della concentrazione di Ca^{2+} , oltre alla privazione di glucosio, l'elevato accumulo di proteine non ripiegate o mal ripiegate e lo stress ossidativo, bloccano l'UPR, promuovendo l'ER stress. L'ER stress è un comune denominatore delle patologie neurodegenerative, quali il PD (Holtz et al., 2003, 2006; Ryu et al., 2002) e l'AD (Hoozemans et al., 2009; Nakagawa et al., 2000; Lee et al., 2010).

Vista l'efficacia della PEA nel proteggere le cellule di neuroblastoma da danni che portano all'aumento dei livelli intracellulari di Ca^{2+} , si è voluto approfondire il ruolo del *target* di questa aciletanolamide endogena, cioè il recettore PPAR- α , nella risposta cellulare all'ER stress.

I nostri risultati, hanno dimostrato per la prima volta che il recettore PPAR- α ricopre un ruolo importante nel proteggere le cellule dall'ER stress, poiché la sua attivazione, mediante l'utilizzo dell'agonista di sintesi GW 7647, è in grado di proteggere *in vitro* le cellule di neuroblastoma dall'ER stress. Il ruolo chiave di questo recettore è stato sottolineato anche dalle evidenze ottenute da animali WT e PPAR- α /KO. Nello specifico si è potuto osservare che in animali PPAR- α /KO in condizioni basali vi era un

aumento dei livelli di ubiquitinazione delle proteine a livello cerebrale rispetto agli animali WT. L'ubiquitinazione eccessiva delle proteine costituisce uno dei marker di ER stress (Ciechanover e Brundin, 2003; Imai et al., 2001; Korhonen e Lindholm, 2004), ma il fatto che si osservi in condizioni basali, cioè senza alcuna causa scatenante, costituisce un'importante ed interessante evidenza dell'essenziale ruolo che il recettore PPAR- α ricopre nella risposta cellulare in caso di ER stress.

Tuttavia le nostre osservazioni sono state estese anche al diverso comportamento motorio tra gli animali WT e PPAR- α KO. Negli animali PPAR- α KO si è osservato un *impairment* motorio rispetto agli animali WT, già a 6-8 mesi. Tale *impairment* è stato valutato sia attraverso il test del rotarod e sia con la misura della *stride length* degli animali. Al test del rotarod gli animali WT mostravano un miglioramento della *performance* motoria nei trials effettuati nello stesso giorno, ma soprattutto erano in grado di incrementare la loro coordinazione motoria tra un giorno e l'altro. Gli animali PPAR- α KO, oltre a non mostrare alcun miglioramento al test del rotarod, neanche tra un giorno e l'altro, mostravano anche una riduzione della *stride length*, ovvero una riduzione del passo, rispetto agli animali WT della medesima età. La riduzione di quest'ultimo aspetto, in particolare, è una delle caratteristiche motorie del PD (Lewis et al., 2000).

Alla luce di quest'ultime osservazioni, oltre a quelle ottenute *in vitro* con l'utilizzo della tossina 6-OHDA, si è ipotizzato che la PEA potesse esser efficace in un modello *in vivo* di PD. Per la prima volta l'efficacia di questa

aciletanolamide è stata valutata nel modello sperimentale di PD che prevede l'iniezione striatale unilaterale di 6-OHDA tramite procedura stereotassica. Dai dati ottenuti, la PEA sembra proteggere gli animali dalla progressiva degenerazione delle terminazioni dopaminergiche, poiché è in grado di migliorare la coordinazione motoria, valutata attraverso il test del rotarod. Inoltre la PEA era in grado di migliorare l'entità del danno striatale, poiché al test dell'apomorfina si osservava una significativa riduzione del numero di rotazioni negli animali trattati quotidianamente con la PEA già dopo 7 giorni ed alla dose di 3 mg/kg, rispetto agli animali che avevano ricevuto solo l'iniezione di 6-OHDA. Sebbene siano necessari ulteriori esperimenti biochimici per approfondire il meccanismo sotteso alla sua attività protettiva, la PEA sembra esercitare un ruolo protettivo sia in un modello *in vitro* che *in vivo* di PD.

L'ultimo modello sperimentale sul quale abbiamo voluto studiare gli effetti della PEA è stato un modello di AD *in vivo*. I nostri risultati hanno dimostrato, per la prima volta, che il trattamento quotidiano con PEA riduce il deficit di apprendimento spaziale ed esplorativo e quello mnemonico causato dall'iniezione i.c.v. di Ab, osservato attraverso il Y.maze test, il water maze test ed il NOR test. L'effetto protettivo della PEA è dose dipendente: in particolare la dose di 30mg/kg è in grado di prevenire completamente il deficit della *working memory* e di recuperare quasi totalmente il deficit di apprendimento spaziale e del comportamento

esplorativo. Il recupero di queste due aspetti della memoria è di particolare interesse in quanto altamente rappresentative dei segni clinici comuni dell'AD. Pazienti con una diagnosi di AD "probabile" mostrano un declino della memoria a breve termine, oltre che della *working memory* con il progredire della patologia e spesso hanno una difficoltà nell'orientamento spaziale nelle attività di tutti i giorni (Hort et al., 2007) I nostri esperimenti dimostrano inoltre un indispensabile coinvolgimento del recettore PPAR- α per osservare gli effetti neuroprotettivi della PEA. Sono stati infatti effettuati esperimenti che prevedevano la somministrazione dell'agonista sintetico del PPAR- α , il GW 7647, nei quali si è potuto osservare che tale farmaco è in grado di mimare gli effetti pro-cognitivi della PEA. Tuttavia per ottenere una prova ancora più stringente dell'indispensabile coinvolgimento del recettore PPAR- α per poter osservare gli effetti pro-cognitivi e di miglioramento mnemonico, la PEA è somministrata ad animali PPAR- α KO. Come ci si attendeva, in tali animali la PEA non era in grado di migliorare i deficit mnemonici e cognitivi indotti dall'iniezione i.c.v. di Ab. Queste osservazioni sui topi PPAR- α KO sono supportate da recenti studi che hanno evidenziato che la PEA riduce l'attivazione astrocitaria indotta dalla Ab attraverso un meccanismo PPAR- α -dipendente (Scuderi et al., 2011). Il recupero mnemonico osservato con i test comportamentali è corroborato da test biochimici e molecolari effettuati su lisati ippocampali, attraverso i quali si è potuto osservare che la PEA è in grado di diminuire i livelli di perossidazione lipidica, di nitrosilazione

proteica, l'espressione della iNOS e l'induzione del pathway pro-apoptotico, attraverso la riduzione dell'espressione della caspasi-3, indotti dall'iniezione i.c.v di Ab.

Concludendo, le evidenze sperimentali qui descritte aiutano a comprendere il ruolo della PEA nel SNC ed indicano che, attraverso l'attivazione del recettore PPAR- α , tale aciletanolamide endogena è in grado di ridurre l'ER stress, alla base di molte malattie neurodegenerative quali PD e AD, e di esercitare un effetto positivo nel migliorare i sintomi motori legati al danno striatale indotto dalla 6-OHDA e quelli legati al deficit mnemonico e cognitivo indotto dall' iniezione i.c.v. di Ab.

Quindi, l'attività svolta dalla PEA nel proteggere i sistemi cellulari dai meccanismi degenerativi ne fa, oltre che un potente strumento nel controllo del dolore neuropatico e nel trattamento del dolore cronico, uno strumento promettente nel trattamento di quelle patologie del SNC su base degenerativa, riducendo in maniera sensibile lo sviluppo di quei meccanismi molecolari che sottendono l'attivazione gliale che caratterizzano AD e PD. Quest'ultime sono patologie verso le quali attualmente la farmacologia ha purtroppo solo strumenti sintomatologici e pochissimi farmaci per controllarne lo sviluppo ed il procedere della malattia.

7. Bibliografía

Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E (2001). Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci*; 21, 8108-8118.

Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R (1993). A proposed autacoids mechanism controlling mastocyte behavior. *Agents Actions*; 39:C145-7.

Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, Westrich J, Ferger B, Höglinger GU, Oertel WH, Hartmann A (2008). Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol*; 210:182-93.

Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V (2001). Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J*; 15:300-2.

Balenga NAB, Aflaki E, Kargl J, Platzer W, Schroder R, Blattermann S, Kostenis E, Brown AJ, Heinemann A, Waldhoer M (2011). GPR55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res*; 21:1452-69.

Balvers MG, Verhoeckx KC, Meijerink J, Wortelboer HM, Witkamp RF (2013). Measurement of palmitoylethanolamide and other N-acylethanolamines during physiological and pathological conditions. *CNS Neurol Disord Drug Targets*; 12:23-33.

Barana A, Amorós I, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Blázquez C, Guzmán M, Delpón E, Tamargo J (2010). Endocannabinoids and cannabinoid analogues block cardiac hKv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner. *Cardiovasc Res*; 85:56-67.

Barcia C, Ros CM, Annese V, Gómez A, Ros-Bernal F, Aguado-Yera D, Martínez-Pagán ME, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT. (2011). IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*; 2:e142.

Barrientos A, Moraes CT (1999). Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem*; 274:16188-16197.

- Berger C**, Schmid PC, Schabitz WR, Wolf M, Schwab S, Schmid HHO (2004). Massive accumulation of N-acyl ethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem*; 88:1159-67.
- Berger J**, Moller D (2002). The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*; 53:409–935.
- Bernales S**, McDonald KL, Walter P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol*; 4:e423.
- Benvenuti F**, Lattanti F, De Gori A, Tarli P (1968). Activity of some derivatives of palmitoylethanolamide on carragenin- induced edema in the rat paw. *Bollettino della Societa` Italiana di Biologia Sperimentale* 44 (9), 809 – 813.
- Berretta N**, Freestone PS, Guatteo E, de Castro D, Geracitano R, Bernardi G, Mercuri NB, Lipski J (2005). Acute effects of 6-hydroxydopamine on dopaminergic neurons of the rat substantia nigra pars compacta in vitro. *Neurotoxicology*; 26:869-81.
- Betarbet R**, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*; 3: 1301–1306.
- Bezard E**, Gross CE, Brotchie JM (2003). Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci*; 26, 215–221.
- Bisogno T**, Martire A, Petrosino S, Popoli P, Di Marzo V (2008). Symptom-related changes of endocannabinoid and palmitoylethanolamide levels in brain areas of R6/2 mice, a transgenic model of Huntington's disease. *Neurochem Int*; 52:307–13.
- Bonini JA** (2002). Methods of identifying compounds that binds to SNORF25 receptors. *US Patent* ; 6,468,756.
- Bouchard JF**, Lepicier P, Lamontagne D (2003). Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci*; 72:1859 – 1870.
- Bové J**, Prou D, Perier C, Przedborski S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*; 2:484-94.
- Bracey MH**, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF (2002). Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*; 298:1793 – 1796.

- Breckenridge** DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*; 22:8608–8618.
- Cadas** H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996). Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*; 16:3934-42.
- Cadas** H, Schinelli S, Piomelli D (1996). Membrane localization of N-acylphosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *J Lipid Mediator Cell Signalling*; 14:63-70.
- Calignano** A, La Rana G, Giuffrida A, Pomelli D (1998). Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*; 394: 277 – 281.
- Calignano** A, La Rana G, Pomelli D (2001). Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol*; 419: 191 – 198.
- Campolongo** P, Roozendaal B, Trezza V, Cuomo V, Astarita G, Fu J, McGaugh JL, Piomelli D. (2009). Fat-induced satiety factor oleoylethanolamide enhances memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 106:8027–31.
- Capasso** R, Izzo AA, Fezza F, Pinto A, Capasso F, Mascolo N, Di Marzo V (2001). Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol*; 134, 945 – 950.
- Capone** R, Quiroz FG, Prangkio P, Saluja I, Sauer AM, Bautista MR, Turner RS, Yang J, Mayer M (2009). Amyloid-beta-induced ion flux in artificial lipid bilayers and neuronal cells: resolving a controversy. *Neurotox Res*; 16:1-13.
- Cassarino** DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, Parks JP, Parker Jr WD, Bennett Jr JP (1997). Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*; 1362:77–86.
- Castañe** A, Berrendero F, Maldonado R (2005). The role of the cannabinoid system in nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav*; 81:381–6.

Castrillo A, Tontonoz P (2004). PPARs in atherosclerosis: the clot thickens. *J Clin Invest*; 114:1538-40.

Cerrato S, Brazis P, della Valle MF, Miolo A, Puigdemont A (2010). Effects of palmitoylethanolamide on immunologically induced histamine, PGD2 and TNF α release from canine skin mast cells. *Vet Immunol Immunopathol*; 133:9-15.

Chastain EM, Duncan DS, Rodgers JM, Miller SD (2011). The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*; 1812:265-74.

Chen HH, Chen TW, Lin H (2009). Prostacyclin-induced peroxisome proliferator-activated receptor- α translocation attenuates NF- κ B and TNF- α activation after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*; 297:F1109-18.

Cho SH, Sun B, Zhou Y, Kauppinen TM, Halabisky B, Wes P, Ransohoff RM, Gan L (2011). CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*; 286:32713-22.

Choi DW (1987). Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci*; 7:369-379.

Choi DW (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*; 1:623-634.

Ciechanover A, Brundin P (2003). The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*; 40: 427–446.

Citraro R, Russo E, Di Paola ED, Ibbadu GF, Gratteri S, Marra R, De Sarro G (2006). Effects of some neurosteroids injected into some brain areas of WAG/Rij rats, an animal model of generalized absence epilepsy. *Neuropharmacol*; 50:1059-71.

Citraro R, Russo E, Scicchitano F, van Rijn CM, Cosco D, Avagliano C, Russo R, D'Agostino G, Petrosino S, Guida F, Gatta L, van Luijtelaar G, Maione S, Di Marzo V, Calignano A, De Sarro G. (2012). Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacol*; 69:115-26.

Coburn OH, Graham CE, Haninger J (1954). The effect of egg yolk in diets on anaphylactic arthritis (passive Arthus phenomenon) in the guinea pig. *J Exp Med*; 100:425 – 435.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaio D, Piagnoni G (2002). Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol*; 135:181 – 187.

Costa B, Conti S, Piagnoni G, Colleoni M (2002). Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *Br J Pharmacol*; 137:413 – 420.

Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni MP, Giagnoni G (2008). The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has antiallodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB1, TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*; 139:541-50.

Cravatt BF, Lichtman AH (2002). The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem Phys Lipids*; 121:135 – 148.

Cravatt BF, Saghatelian A, Hawkins EG, Clement AB, Bracey MH, Lichtman AH (2004). Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:10821 – 10826.

Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB (1998). Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem*; 70:1366-75.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*; 258:1946– 1949.

D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, Raso GM, Cuzzocrea S, Lo Verme J, Piomelli D, Meli R, Calignano A. (2007). Acute intracerebroventricular administration of palmitoylethanolamide, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist, modulates carrageenan-induced paw edema in mice. *J Pharmacol Exp Ther*; 322:1137-43.

D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, Mattace Raso G, Cuzzocrea S, Loverme J, Piomelli D, Meli R, Calignano A. (2009). Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signalling in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol*; 613:54-9.

Dauer W, Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models *Neuron*; 39:889-909.

De Filippis D, Luongo L, Cipriano M, Palazzo E, Cinelli MP, de Novellis V, Maione S, Iuvone T (2011). Palmitoylethanolamide reduces granuloma-induced hyperalgesia by modulation of mast cell activation in rats. *Mol Pain*; 7:3.

Delobette S, Privat A, Maurice T (1997). In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 319: 1-4.

De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V (2001). Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett*; 506:253-6.

De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V (2002). Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol*;16:297-302.

De Petrocellis L, Chu CJ, Moriello AS, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V (2004). Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br J Pharmacol*; 143:251-6.

Desvergne B, Wahli W (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*; 20, 649-688.

Di Cesare Mannelli L, D'Agostino G, Pacini A, Russo R, Zanardelli M, Ghelardini C, Calignano A (2013). Palmitoylethanolamide is a disease-modifying agent in peripheral neuropathy: pain relief and neuroprotection share a PPAR-alpha-mediated mechanism. *Mediators Inflamm*; 2013:328797.

Di Marzo, V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L (2001). Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *J Biochem*; 358; 249 – 255.

- Dinarello** CA (1991). Inflammatory cytokines: Interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol*; 3: 941-8.
- Ding** AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*; 141:2407-12.
- Dorsey** ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*; 68:384-6.
- Esposito** E, Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Cuzzocrea S (2012). Neuroprotective activities of palmitoylethanolamide in an animal model of Parkinson's disease. *PLoS One*; 7:e41880.
- Ekdahl** CT (2012). Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol*; 3:41.
- Ehringer** H, Hornykiewicz O (1960). Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr* 15;38:1236-9.
- Facci** L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:3376-80.
- Farquhar-Smith** WP, Rice AS (2001). Administration of endocannabinoids prevents a referred hyperalgesia associated with inflammation of the urinary bladder. *Anesthesiology*; 94:507 - 513.
- Fellner** L, Jellinger KA, Wenning GK, Stefanova N (2011). Glial dysfunction in the pathogenesis of α -synucleinopathies: emerging concepts. *Acta Neuropathol*; 121:675-93.
- Ferri** CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczafca M; Alzheimer's Disease International (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*; 366:2112-2117.
- Franklin** A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. (2003). Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci*; 23:7767-75.

- Fride E, Mechoulam R (1993).** Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol*; 231:313-4.
- Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez de Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003).** Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- α . *Nature*; 425:90 – 93.
- Gaetani S, Fu J, Cassano T, Dipasquale P, Romano A, Righetti L, Cianci S, Laconca L, Giannini E, Scaccianoce S, Mairesse J, Cuomo V, Piomelli D. (2010).** The fat-induced satiety factor oleylethanolamide suppresses feeding through central release of oxytocin. *J Neurosci*; 30:8096–101
- Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, Ghosh S, Mosley RL, Gendelman HE, PAhan K (2007).** Selective inhibition of NF- κ B activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104, 18745-18759.
- Giordano C, Cristino L, Luongo L, Siniscalco D, Petrosino S, Piscitelli F, Marabese I, Gatta L, Rossi F, Imperatore R, Palazzo E, de Novellis V, Di Marzo V, Maione S. (2012).** TRPV1-dependent and -independent alterations in the limbic cortex of neuropathic mice: impact on glial caspases and pain perception. *Cereb Cortex*; 22:2495-518.
- Glinka YY, Youdim MB (1995).** Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol*; 292:329-32.
- Glinka Y, Gassen M, Youdim MB.** Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl*; 50:55-66.
- González-Scarano F, Baltuch G (1999).** Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*; 22:219-40.
- Godlewski G, Offertáler L, Wagner JA, Kunos G (2009).** Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; 89:105-11.
- Görlach A, Klappa P, Kietzmann T. (2006).** The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*; 8:1391-418.
- Greenamyre JT, Young AB (1989).** Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*; 10:593-602.

- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung Y-C, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986).** Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83:4913-4917.
- Hanrott K, Gudmunsen L, O'Neill MJ, Wonnacott S (2006).** 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase C δ . *J Biol Chem*; 281:5373-82.
- Hansen HS, Lauritzen L, Strand AM, Vinggaard AM, Frandsen A, Schousboe A (1997).** Characterization of glutamate-induced formation of N-acylphosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine in cultured neocortical neurons. *J Neurochem*; 69:753-61.
- Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G (2000).** N-Acylethanolamines and precursor phospholipids: relation to cell injury. *Chem Phys Lipids*; 108:135-50.
- Hansen HS, Moesgaard B, Petersen G, Hansen HH (2002).** Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. *Pharmacol Ther*; 95:119-26.
- Heikkila R, Cohen G (1971).** Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science*; 172: 1257–1258.
- Heneka MT, Landreth GE (2007).** PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta*; 1771:1031-45.
- Hensley K, Pye QN, Maitt ML, Stewart CA, Robinson KA, Jaffrey F, Floyd RA (1998).** Interaction of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron and alternative electron acceptors with complex I indicates a substrate reduction site upstream from the rotenone binding site. *J Neurochem* 71:2549–2557.
- Hinwood M, Morandini J, Day TA, Walker FR (2011).** Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*; 22:1442-54.
- Hisata J (2002).** Final supplemental environmental impact statement. Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. Washington State Department of Fish and Wildlife.
- Ho WS, Barrett DA, Randall MD (2008).** 'Entourage' effects of N-palmitoylethanolamide and N-oleoylethanolamide on vasorelaxation to anandamide occur through TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol.*; 155:837-46.

Holtz WA, Turetzky JM, Jong YJ, O'Malley KL. (2006). Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J Neurochem* ;99:54-69.

Hoozemans JJ, van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, Scheper W. (2009). The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol*; 174:1241-51.

Hort J, Laczó J, Vyhnálek M, Bojar M, Bures J, Vlcek K (2007). Spatial navigation deficit in amnesic mild cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:4042-7.

Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*; 105: 891–902.

Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS (1998). The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain*; 76:189 – 199.

Jiang C, Ting AT, Seed B (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*; 391:82-6.

Jean-Gilles L, Feng S, Tench CR, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA, Constantinescu CS (2009). Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *J Neurological Sci*; 287:212-5.

Jhaveri MD, Richardson D, Robinson I, Garle MJ, Patel A, Sun Y, Sagar DR, Bennett AJ, Alexander SP, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V (2008). Inhibition of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase-2 increases levels of endocannabinoid related molecules and produces analgesia via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in a model of inflammatory pain. *Neuropharmacol*; 55:85-93.

Jonsson KO, Vandevorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ (2001). Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol*; 133:1263-75.

Kahlich R, Klima J, Cihla F, Frankova V, Masek K, Rosicky M, Matousek F, Bruthans J (1979). Studies on prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory infections. Serologically controlled field trials. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*; 23:11 – 24.

Karanian DA, Karim SL, Wood JT, Williams JS, Lin S, Makriyannis A, Bahr BA. (2007). Endocannabinoid enhancement protects against kainic acid-induced seizures and associated brain damage. *J Pharmacol Exp Ther*; 322:1059–66.

Kass GE, Orrenius S (1999). Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect*; 107 Suppl 1:25-35.

Kaufman RJ (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*; 13:1211-33.

Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci*; 29:13435-44.

Kokate TG, Banks MK, Magee T, Yamaguchi S, Rogawski MA (1999). Finasteride, a 5 α -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. *J Pharmacol Exp Ther*; 288:679–84.

Korhonen L, Lindholm D (2004). The ubiquitin proteasome system in synaptic and axonal degeneration: a new twist to an old cycle. *J Cell Biol*; 165:27–30.

Kuehl FA, Jacob TA, Ganley OH, Ormond RE and Meisinger MAP (1957). The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent. *J Am Chem Soc*; 79:5577 - 5578.

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *J Biochem*; 368:545–553.

LaFerla FM, Green KN, Oddo S (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*; 8:499-509.

Lambert DM, Vandevoorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR (2001). Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia*; 42:321-7.

Lambert D, Vandevoorde S, Jonsson K, Fowler J (2002). The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem*; 9: 663 – 674.

Lasorella A, Iavarone A, Israel MA (1995). Differentiation of neuroblastoma enhances Bcl-2 expression and induces alterations of apoptosis and drug resistance. *Cancer Res*; 55:4711-6.

Lee CS, Schultzer M, Mak EK, Snow BJ, Tsui JK, Calne S, Hammerstad J, Calne DB (1994). Clinical observations on the rate of progression of idiopathic parkinsonism. *Brain*;117:501–507.

Lee JH, Won SM, Suh J, Son SJ, Moon GJ, Park UJ, Gwag BJ. (2010). Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp Mol Med*;42:386-94.

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*; 272:3406-10.

Le Foll B, Forget B, Aubin HJ, Goldberg SR (2008). Blocking cannabinoid CB1 receptors for the treatment of nicotine dependence: insights from pre-clinical and clinical studies. *Addict Biol*; 13:239-52.

Lewis GN, Byblow WD, Walt SE (2000). Stride length regulation in Parkinson's disease: the use of extrinsic, visual cues. *Brain*; 123:2077-90.

Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF (2002). Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*; 302: 73 – 79.

Loria F, Petrosino S, Mestre L, Spagnolo A, Correa F, Hernangomez M, Guaza C, Di Marzo V, Docagne F. (2008). Study of the regulation of the endocannabinoid system in a virus model of multiple sclerosis reveals a therapeutic effect of palmitoylethanolamide. *Eur J Neurosci*; 28:633–41.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005a). The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 67:15-9.

Lo Verme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005b). The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci*; 77:1685–98.

Lo Verme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D (2006). Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *J Pharmacol Exp Ther*; 319:1051-61.

Maragos WF, Greenamyre JT, Penney JB, Young AB (1987). Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci*; 10:65-68.

Mattace Raso G, Esposito E, Vitiello S, Iacono A, Santoro A, D'Agostino G, Sasso O, Russo R, Piazza PV, Calignano A, Meli R (2011). Palmitoylethanolamide stimulation induces allopregnanolone synthesis in C6 Cells and primary astrocytes: involvement of peroxisome-proliferator activated receptor- α . *J Neuroendocrinol*; 23:591-600.

Mattson MP (1990). Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and calcium influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron*; 4: 105-117.

Mattson MP, Kater SB (1989). Development and selective neurodegeneration in cell cultures from different hippocampal regions. *Brain Res*; 490:110-125.

Mattson MP, Dou P, Kater SB (1988). Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*; 8:2087-2100.

Mattson MP, Murrain M, Guthrie PB, Kater SB (1989). Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J Neurosci*; 9:3728-3740.

Mattson MP, Rychlik B, You J-S, Siskin JE (1991). Sensitivity of cultured human embryonic cerebral cortical neurons to excitatory amino acid-induced calcium influx and neurotoxicity. *Brain Res*; 542: 97-106.

Maurice T, Lockhart BP, Privat A (1996). Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Res* 706: 181-193.

Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A (1996). N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol*; 300: 227 - 236.

Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S. (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR- α nuclear receptors. *Learn Mem*; 16:332-7.

- Melis M**, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, Pistis M (2008). Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci*; 28:13985-94.
- Mitterauer BJ** (2011). Possible role of glia in cognitive impairment in schizophrenia. *CNS Neurosci Ther*; 17:333-44.
- Monory K**, Massa F, Egertová M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, During M, Klugmann M, Wölfel B, Dodt HU, Zieglgänsberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Lutz B. (2006). The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*; 51:455-66.
- Moreno S**, Farioli-Vecchioli S, Cerù MP (2004). Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*;123:131-45.
- Muccioli GG**, Stella N (2008). Microglia produce and hydrolyze palmitoylethanolamide. *Neuropharmacol*; 54:16-22.
- Mueller E**, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, Fletcher C, Singer S, Spiegelman BM. (1998). Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell*; 1:465-470.
- Mukherjee R**, Jow L, Noonan D, McDonnell D (1994). Human and rat peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) demonstrate similar tissue distribution but different responsiveness to PPAR activators. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 51:157-166.
- Nakagawa T**, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*; 403:98-103.
- Najjar S**, Pearlman D, Miller DC, Devinsky O (2001). Refractory epilepsy associated with microglial activation. *Neurologist* ;17:249-54.
- van Neerven S**, Mey J (2007). RAR/RXR and PPAR/RXR Signaling in Spinal Cord Injury. *PPAR Res*; 2007:29275.
- Nolte RT**, Conlin RM, Harrison SC, Brown RS (1998). Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:2938-43.

de Novellis V, Luongo L, Guida F, Cristino L, Palazzo E, Russo R, Marabese I, D'Agostino G, Calignano A, Rossi F, Di Marzo V, Maione S. (2012). Effects of intra-ventrolateral periaqueductal grey palmitoylethanolamide on thermoceptive threshold and rostral ventromedial medulla cell activity. *Eur J Pharmacol*; 676:41–50.

Okine BN, Rea K, Olango WM, Price J, Herdman S, Madasu MK, Roche M, Finn DP. (2013). A role for PPAR- α in the medial prefrontal cortex in formalin-evoked nociceptive responding in rats. *Br J Pharmacol*; 71:1462-71.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*; 279:5298 – 5305.

O'Sullivan SE (2007). Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol*; 152:576-82.

Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006). Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab*; 3:167-75.

Oyarce AM, Fleming PJ (1991). Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys*; 290:503-10.

Paschen W, Frandsen A (2001) Endoplasmic reticulum dysfunction a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J Neurochem*; 79: 719–725.

Perlik F, Raskova H, Elis J (1971). Anti-inflammatory properties of N((2-hydroxyethyl) palmitamide. *Acta Pharm Hung*; 39: 395 – 400.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA.. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology, LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev*; 62:588–631.

Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, Di Marzo (2007). Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacol*; 52:415-22.

Prat A, Behrendt M, Marcinkiewicz E, Boridy S, Sairam RM, Seidah NG, Maysinger D (2001). A novel mouse model of Alzheimer's disease with chronic estrogen deficiency leads to glial cell activation and hypertrophy. *J Aging Res*; 2011:251517.

Przedborski S, Goldman JE (2004). Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. In: *Non-neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction* (Hertz L, ed), pp 967–982. New York: Elsevier.

Qi C, Zhu Y, Reddy JK (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem Biophys*; 32 Spring:187-204.

Raghavendra V, Tanga FY, DeLeo JA (2004). Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS. *Eur J Neurosci*; 20:467-73.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ*; 11: 372–380.

Reddy DS, Rogawski MA. Neurosteroids-Endogenous Regulators of Seizure Susceptibility and Role in the Treatment of Epilepsy. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001). An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature*; 414: 209 – 212.

Romano A, Cassano T, Tempesta B, Cianci S, Dipasquale P, Coccorello R, Cuomo V, Gaetani S (2013). The satiety signal oleoylethanolamide stimulates oxytocin neurosecretion from rat hypothalamic neurons. *Peptides*; 49:21-6.

Ross CA, Poirier MA (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*; 10 Suppl:S10-7.

Russo R, D'Agostino G, Mattace Raso G, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. (2012). Central administration of oxytocin reduces hyperalgesia in mice: implication for cannabinoid and opioid systems. *Peptides*; 38:81-8.

Rosano C, Marsland AL, Gianaros PJ (2012). Maintaining brain health by monitoring inflammatory processes: a mechanism to promote successful aging. *Aging Dis*; 3:16-33.

Ross RA, Brockie HC, Pertwee RG (2000). Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol*; 401:121 – 130.

Ross RA (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci*; 30:156-63.

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*; 52:1092-101.

Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*; 22:10690-8.

Sachs C, Jonsson G (1975). Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol*; 24:1-8.

Sailasuta N, Harris K, Tran T, Ross B (2011). Minimally invasive biomarker confirms glial activation present in Alzheimer's disease: a preliminary study. *Neuropsychiatr Dis Treat* ; 7:495-9.

Saner A, Thoenen H (1971). Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Mol Pharmacol*; 7: 147–154.

Sasso O, La Rana G, Vitiello S, Russo R, D'Agostino G, Iacono A, Russo E, Citraro R, Cuzzocrea S, Piazza PV, De Sarro G, Meli R, Calignano A (2010). Palmitoylethanolamide modulates pentobarbital-evoked hypnotic effect in mice: involvement of allopregnanolone biosynthesis. *Eur Neuropsychopharmacol*; 20:195-206.

Sasso O, Russo R, Vitiello S, Mattace Raso G, D'Agostino G, Iacono A, Rana GL, Vallée M, Cuzzocrea S, Piazza PV, Meli R, Calignano A (2012). Implication of allopregnanolone in the antinociceptive effect of N-palmitoylethanolamide in acute or persistent pain. *Pain* 153: 33–41.

Schäbitz WR, Giuffrida A, Berger C, Aschoff A, Schwaninger M, Schwab S, Piomelli D (2002). Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study. *Stroke*; 33:2112-4.

- Schmid** PC, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH (1985). Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J Biol Chem*; 260:14145–14149.
- Schmid** HH, Schmid PC, Natarajan V (1990). N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res*; 29:1 – 43.
- Schober** A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res*; 318:215-24.
- Schröder** M, Kaufman RJ (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*; 74:739-89.
- Schuler** F, Casida JE (2001). The insecticide target in the PSST subunit of complex I. *Pest Manag Sci*; 57:932-40.
- Scuderi** C, Esposito G, Blasio A, Valenza M, Arietti P, Steardo L Jr, Carnuccio R, De Filippis D, Petrosino S, Iuvone T, Di Marzo V, Steardo L. (2011). Palmitoylethanolamide counteracts reactive astrogliosis induced by b-amyloid peptide. *J Cell Mol Med*; 15:2664–74.
- Scuderi** C, Valenza M, Stecca C, Esposito G, Carratu MR, Steardo L (2012). Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator- activated receptor- α . *J Neuroinflammation*; 9:49.
- Scuderi** C, Steardo L (2013). Neuroglial roots of neurodegenerative diseases: therapeutic potential of palmitoylethanolamide in models of Alzheimer's disease *CNS Neurol Disord Drug Targets*; 12:62-9.
- Sharir** H, Abood ME (2010). Pharmacological characterization of GPR55, a putative cannabinoid receptor. *Pharmacol Ther*; 126:301-13.
- Sheerin** AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME (2004). Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia*; 45:1184-8.
- Sherer** TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT (2003). Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol*; 179:9–16.
- Shyu** BC, Vogt BA (2009). Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-anterior cingulate pathway. *Mol Pain*; 5:51.
- Simonian** NA, Coyle JT (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 36:83-106.

Sisodia SS (2000). Neuroscience. An accomplice for gamma-secretase brought into focus. *Science* 289: 2296-7.

Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, et al.(1996).The ALIAMide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:3984-9.

Skaper SD, Facci L (2012). Mast cell–glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide. *Philos Trans R Soc Biol Sci*; 367:3312-25.

Skaper SD, Facci L, Giusti P (2013). Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology*;141:314-27.

Slodzinski H, Moran LB, Michael GJ, Wang B, Novoselov S, Cheetham ME, Pearce RK, Graeber MB (2004). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (herp) is up-regulated in parkinsonian substantia nigra and present in the core of Lewy bodies. *Clin Neuropathol*; 28:333-43.

Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ. (2002). 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol*; 136:452-8.

Song M, Jin J, Lim JE, Kou J, Pattanayak A, Rehman JA, Kim HD, Tahara K, Lalonde R, Fukuchi K (2011). TLR4 mutation reduces microglial activation, increases A β deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*; 8:92.

Soto C (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*; 4:49-60.

Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Muñoz-Patiño AM, Labandeira-Garcia JL (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*; 74:1605-12.

Stella N, Piomelli D (2001). Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol*; 425:189-96.

Su JL, Simmons C, Wisely B, Ellis B, Winegar D (1998). Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific MAbs. *Hybridoma*; 17:47–53.

Sugiura T, Kondo S, Kishimoto S, Miyashita T, Nakane S, Kodaka T, Suhara Y, Takayama H, Waku K (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N -palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem*; 275: 605 – 612.

Straus DS, Glass CK (2001). Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev*; 21:185-210.

Takahashi T, Deng Y, Maruyama W, Dostert P, Kawai M, Naoi M (1994). Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system. *J Neural Transm Gen Sect.*; 98(2):107-18.

Thinakaran G, Koo EH (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*; 283:29615-9.

Uceyler N, Gobel K, Meuth SG, Ortler S, Stoll G, Sommer C, Wiendl H, Kleinschnitz C. (2010). Deficiency of the negative immune regulator B7-H1 enhances inflammation and neuropathic pain after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol*; 222:153–60.

Ueda K, Masliah E, Saitoh T, Bakalis SL, Scoble H, Kosik KS (1990). Alz-50 recognizes a phosphorylated epitope in tau. *J Neurosci*; 10:3295-3304.

Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S (2001). Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem*; 276:35552-7.

Ungerstedt U (1968). 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*; 5, 107-110.

Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N. Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides (2002). *J Biol Chem*; 277:20869-76.

Xie YF, Huo FQ, Tang JS (2009). Cerebral cortex modulation of pain. *Acta Pharmacol Sin*; 30:31-41.

Yang Y, Gocke AR, Lovett-Racke A, Drew PD, Racke MK (2008). PPAR Alpha Regulation of the Immune Response and Autoimmune Encephalomyelitis. *PPAR Res*; 2008:546753.

Zhao L, Ackerman SL (2006). Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol*; 18, 444–452.

Zawia NH, Lahiri DK, Cardozo-Pelaez F (2009). Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*; 46:1241-9.

Zheng P (2009). Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Prog Neurobiol*; 89:134–52.

Ziouzenkova O, Plutzky J (2008). Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett*; 582:32-8.