



Università degli studi di Napoli Federico II

Dipartimento di Farmacia

DOTTORATO DI RICERCA IN “SCIENZE DEL FARMACO”

CICLO XXVI

GLI EFFETTI ANTIINFIAMMATORI DELLA PALMITOILETANOLAMIDE NELLA SCLEROSI MULTIPLA RECIDIVANTE-REMITTENTE.

Dott. Nicola Salvatore Orefice



Coordinatore del Corso di Dottorato:
Prof.ssa Maria Valeria D’Auria

Tutor:
Prof. Antonio Calignano

Anno Accademico
2013/2014

Indice

Abstract

1. La Palmitoiletanolamide (PEA)	Pag.8
1.1 Biosintesi ed inattivazione	Pag.9
1.2 Recettore attivato della proliferazione perossisomiale (PPAR-α)	Pag.11
1.3 Proprietà analgesiche della PEA	Pag.13
1.4 Proprietà antiinfiammatorie della PEA	Pag.15
1.5 La PEA nella sintesi dei neurosteroidi	Pag.16
1.6 La PEA nei modelli animali di patologie neurodegenerative	Pag.17
1.7 La PEA nella pratica clinica	Pag.18
2. Sclerosi multipla (MS): caratteristiche generali della patologia	Pag.19
2.1 Patogenesi della MS	Pag.22
2.2 Decorso clinico della MS	Pag.24
3. Il sistema degli endocannabinoidi (ECS)	Pag.26
3.1 Il sistema endocannabinoide nella Sclerosi Multipla	Pag.31
4. Trattamento della Sclerosi Multipla	Pag.34

Parte Sperimentale

5. Disegno dello studio clinico	Pag.38
5.1. Obiettivo primario	Pag.38
5.2 Obiettivi secondari	Pag.38
5.3 Popolazione in studio	Pag.38
5.4 Criteri d' inclusione- Criteri di esclusione	Pag.40
5.5 Trattamento	Pag.40
6. Materiale e Metodi	Pag.41
6.1 Analisi degli Endocannabinoidi	Pag.41
6.2 Analisi dei Neurosteroidi	Pag.43
6.3 Estrazione dei Neurosteroidi	Pag.44
6.4 Determinazione dei livelli sierici di citochine coinvolte nella patologia	Pag.44
7. Risultati	Pag.46
7.1 Analisi del quadro infiammatorio	Pag.46
7.2 Valutazione della disabilità motoria mediante la scala EDSS	Pag.51
7.3 Valutazione del dolore mediante la scala VAS (Scala visiva analogica)	Pag.54
7.4 Livelli plasmatici degli endocannabinoidi	Pag.56
7.5 Livelli plasmatici dell'allopregnanolone (ALLO)	Pag.63
8. Conclusioni	Pag.65
9. Bibliografia	

Abbreviazioni

AA: Acido Arachidonico

ADDFMS: Alimento dietetico destinato a fini medici speciali

AEA: Anandamide

2-AG: 2-Arachidonoil-glicerolo

ALIA: Autacoid Local Injury Antagonism,

ALLO: Allopregnanolone

BEE: Barriera emato-encefalica

CBD: Cannabidiolo

CB1: Recettore dei cannabinoidi di tipo 1

CB2: Recettore dei cannabinoidi di tipo 2

CBR: Recettori degli endocannabinoidi

CIS: Sindrome clinicamente isolata

CSF: Liquido cefalo spinale

COX2: Ciclo ossigenasi di tipo 2

EAE: Encefalomielite allergica sperimentale

EC: Endocannabinoidi

ECS: Sistema degli endocannabinoidi endogeno

EDSS: Expanded Disability Status Scale

EDTA: Acido etilendiamminotetraacetico

ELISA: Saggio Immuno-Assorbente legato ad un enzima

ERK1,2: Extracellular signal-regulated kinases type 1 and 2

FAAH: Idrolasi dell'amidi degli'acidi grassi

FAK: Focal Adesion Kinase

GABAa: Acido γ -aminobutirrico

Gd: Gadolinio

GPCR: G protein-coupled receptors

Ig: Immunoglobuline

IgM: Immunoglobuline della classe M

IL-17: Interleuchina 17

INF γ : Interferone gamma

iNOS: Nitrossido sintasi

I.P.: Intraperitoneale

LC-MS/MS: Spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida

LTB4: Leucotriene B4
MAP: Mitogen activated protein
MBP: Proteina basica della mielina
MGL: Monogliceride lipasi
MOG: Glicoproteina associata alla mielina oligodendrocitaria
MS: Sclerosi multipla
MS-RR: Sclerosi multipla recidivante-remittente
MS-PP: Sclerosi multipla primaria-progressiva
MS-SP: Sclerosi multipla secondaria progressiva
NADA: N-arachidonoidopamina
NAPes: *N*-acil-fosfatidil-etanolammine
NArPE: N-arachidonil-fosfatidiletanolamina
NF-*κ*B: Fattore trascrizionale nucleare *κ*B
NGF: Nerve growth factor
NK: Cellule natural Killer
OEA: Oleo-iletanolamide
PAA: Preferring acid amidase
PBS: Soluzione di fosfato salino
PC: Fosfatidilcolina
PE: Fosfatidiletanolamide
PEA: Palmitoiletanolamide
PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase
PKB: Proteina chinasi B
PLP: Proteina proteolipidica
PPAR: Recettore attivato della proliferazione perossisomiale
RIA: Analisi radioimmunologica
RM: Risonanza magnetica
SIM: Monitoraggio di ioni selezionati
SNC: Sistema nervoso centrale
S1P: Sfingosina-1-fosfato
StAR: Proteina regolatoria acuta steroidogenica
STR: Short Tandem Repeat
STC: Sindrome del Tunnel Carpale
THC: Delta-9-Tetraidrocannabinolo

TMB: Tetrametilbenzidina

VAS: Scala visiva analogica

JNK: c-Jun N-terminal-kinase

Abstract

Nell'ultimo ventennio, la ricerca farmacologica ha riservato particolare attenzione alle aliainidi, sostanze lipidiche presenti in natura e prodotte per via endogena "al bisogno" in risposta a situazioni di danno e/o infiammazione. Se somministrate per via esogena, tali sostanze sono capaci di potenziare i naturali meccanismi di protezione da infiammazione, prurito e dolore. Il presente progetto di ricerca si è prefissato di fornire una visione completa delle evidenze scientifiche finora raccolte sulla Palmitoiletanolamide, (PEA) nell'ambito del trattamento della Sclerosi Multipla (MS). In particolare, sono state prese in considerazione le evidenze a sostegno delle proprietà farmacologiche della PEA unitamente ai dati raccolti a livello pre-clinico e clinico sull'efficacia antinfiammatoria e neuroprotettiva. In funzione dei risultati ottenuti sia in merito all'efficacia che al profilo di sicurezza, è possibile collocare la PEA nell'ambito delle possibilità terapeutiche oggi disponibili per il trattamento delle patologie neurodegenerative, in particolare la MS.

1. La Palmitoiletanolamide (PEA)

La PEA (Fig.1) chimicamente è l'amide dell'acido palmitico, appartiene alla famiglia delle aciletanolamine, una classe di neuromodulatori lipidici relativamente recente, sintetizzata a partire da un precursore fosfolipidico di membrana

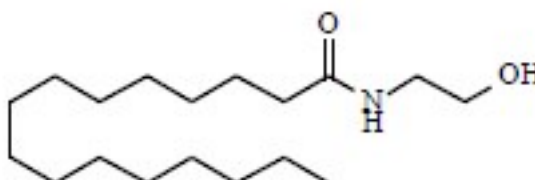


Fig. 1- Struttura chimica della PEA

Venne identificata circa 60 anni fa nel tuorlo d'uovo (Coburn AF et al., 1954) come responsabile dell'azione anti-piretica osservata in bambini con febbre reumatica, nell'olio di arachidi e nelle lecitina di soia. Tuttavia, l'interesse per questo composto gradualmente si smorzò per rinvigorirsi con la scoperta del sistema degli endocannabinoidi (ECS). In seguito a stimoli lesivi, la PEA viene rilasciata al fine di inibire le reazioni infiammatorie o di prevenire la propagazione dello stimolo doloroso. Questo è stato dimostrato nei leucociti (Bisogno et al., 1998), nei macrofagi (Di Marzo V et al., 1996), nelle cellule epidermiche di topo in seguito a vari tipi di stress (Berdyshev EV et al., 2000), in neuroni corticali come risposta all'aumento della concentrazione intracellulare di calcio (Cadas H et al., 1996) e nella corteccia cerebrale di topo in seguito ad ischemia focale (Franklin A et al., 2003). Aumentati livelli di PEA sono stati inoltre riscontrati nel plasma di soggetti affetti da lombalgia in seguito a manipolazioni osteopatiche e nelle biopsie di pazienti con colite ulcerosa (Darmani NA et al., 2005). Nel plasma è presente in concentrazioni dosabili, che variano seguendo un ritmo circadiano (Balvers MG et al., 2013)

1.1 Biosintesi ed inattivazione

La biosintesi della PEA avviene in due passaggi: (1) Il trasferimento cAMP-calciio-dipendente dell'acido palmitico dalla fosfatidilcolina (PC) alla fosfatidiletanolamide (PE), ad opera della N-acil-transferasi (NAT), con formazione dell'N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) e successivamente (2) la formazione della PEA intracellulare a partire dal NAPE attraverso una specifica NAPE-fosfolipasi. Al contrario di altri mediatori chimici cerebrali, le aciletanolamidi non sono prodotte e immagazzinate in vescicole secretorie per poi essere rilasciate all'occorrenza ma sintetizzate "a richiesta" (su stimolo specifico solo quando necessario) ad opera precursori fosfolipidici per azione di fosfolipasi di membrana. Portata a termine la loro funzione, viene rapidamente disattivata attraverso un meccanismo comprendente vari passaggi:

- processo di ricaptazione che sembrerebbe mediato da un trasportatore di membrana (AMT) non ancora clonato;

- idrolisi della PEA intracellulare da parte di idrolasi lipidiche (Schmid K et al., 2002).

In particolare, l'enzima deputato a questa funzione è la fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Ueda N et al., 2002), una serina idrolasi legata al lato intracellulare del doppio strato fosfolipidico. Tale enzima è stato ampiamente studiato; la sua caratteristica strutturale ne garantisce l'accesso dal lato citosolico della cellula (Bracey M.H. et al., 2002, Fezza F et al., 2008.) ed è in grado di idrolizzare la PEA in acido palmitico ed etanolamina (Puffenbarger RA et al., 2005). È stato identificato un secondo enzima, la PEA-preferring acid amidase (PAA), che sarebbe coinvolta nel processo di idrolisi della PEA (Ueda N et al., 2001).

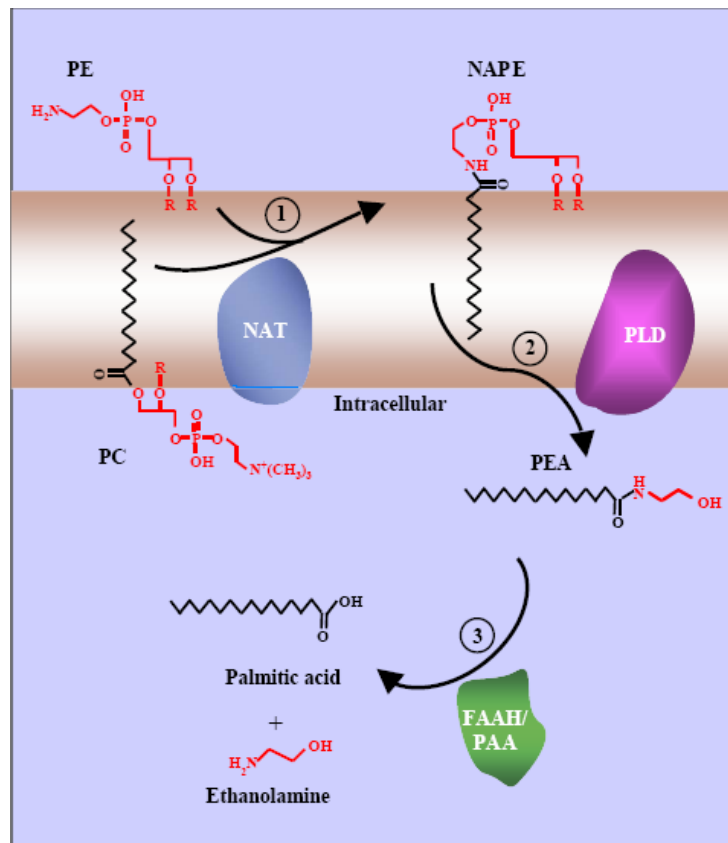


Figura 2 - Biosintesi ed inattivazione della PEA

1.2 Recettore attivato della proliferazione perossisomiale (PPAR- α)

Recentemente si è giunti all'identificazione della PEA come agonista endogeno del recettore attivato della proliferazione perossisomiale PPAR- α (Lo Verme J et al., 2005); inoltre, la scomparsa degli effetti analgesici negli animali knock-out per il recettore PPAR- α , in seguito al trattamento con la PEA (Lo Verme J et al. 2005, D'Agostino G et al., 2007), supporta fortemente la teoria che tale sostanza medii i suoi effetti tramite questo recettore.

I PPARs appartengono alla famiglia dei recettori ormonali nucleari a cui fanno parte i recettori steroidei, tiroidei e retinoici, (Desvergne B. and Wahli W., 1999). Ad oggi sono stati identificati tre diversi sottotipi recettoriali del PPAR (α , β/δ e γ) (Fig. 3), le cui azioni si risolvono in una vasta e differenziata gamma di effetti biologici dipendenti dalla localizzazione tissutale e dal profilo chimico del ligando coinvolto nell'attivazione (Kliwer SA et al., 1994; Forman BM et al., 1997).

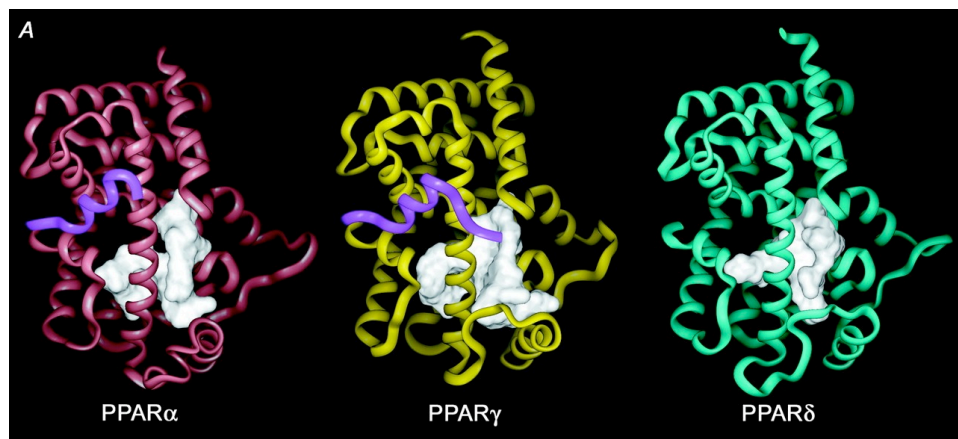


Fig.3 Strutture tridimensionali dei sottotipi recettoriali PPAR

In presenza del ligando, i PPAR sono in grado di legare direttamente una specifica sequenza di DNA, regolando l'espressione genica attraverso co-attivatori trascrizionali (Nolte RT et al. 1998; Berger J and Moller DE 2002; Castrillo A and Tontonoz P 2004). La PEA interagisce con questo recettore, esplicando i suoi effetti antiinfiammatori, con una potenza simile a quella dell' agonista sintetico WY14-643. Si tratta inoltre di un'azione selettiva, essendo la PEA incapace di attivare le isoforme recettoriali PPAR- β/δ o PPAR- γ (Lo Verme J et al., 2005).

Per quanto concerne i recettori PPAR- α e PPAR- γ , è riportato un loro ruolo chiave nella regolazione della risposta infiammatoria, con prove sperimentali sia in vivo che in vitro (Devchand PR et al., 1996; Delerive P et al., 2001; Kostadinova R et al., 2005).

I farmaci in grado di attivare tali recettori, quali i tiazolidindioni e i fibrati, modulando il metabolismo lipidico e glucidico, costituiscono una valida terapia per pazienti affetti da dislipidemie, diabete di tipo II, aterosclerosi e malattie cardiovascolari.

La distribuzione tissutale del PPAR- α è piuttosto varia. La sua localizzazione nel SNC è stata ampiamente dimostrata, a livello cerebrale (Moreno S et al., 2004), spinale (Benani A et al., 2004; Moreno S et al., 2004, D'Agostino G et al., 2007) e gangliare (Lo Verme J et al., 2005; D'Agostino G et al., 2007).

Il PPAR- α è espresso nel fegato, nel rene, nel cuore e nel tessuto adiposo bruno. I primi studi negli anni '90 hanno evidenziato la sua importanza nella regolazione dei geni coinvolti nei processi metabolici cellulari.

La prima indicazione di un possibile ruolo del PPAR nella modulazione dell'infiammazione si è avuta con la dimostrazione che il leucotriene B₄ (LTB₄), un potente eicosanoide proinfiammatorio chemiotattico, lega il recettore PPAR- α , attivando, mediante un meccanismo genomico, le vie della ω - e β -ossidazione con la possibilità di catabolizzare il LTB₄ stesso. Topi PPAR- α knock-out (PPAR- α /-) hanno mostrato risposte infiammatorie prolungate quando stimolati con LTB₄ o con un suo precursore, l'acido arachidonico (AA), proprio per l'assenza di stimolazione di questi processi catabolici. Inoltre, il trattamento con sostanze in grado di legare il recettore PPAR- α , quali gli acidi grassi ω -3 ed il clorofibrato, ha fatto sì che si osservasse nei macrofagi e nei granulociti un incremento del catabolismo del LTB₄. Si può ritenere, pertanto, che l'attivazione del PPAR- α contribuisca alle proprietà antinfiammatorie, antipiretiche e analgesiche di queste sostanze attraverso la stimolazione delle vie ossidative cataboliche di cui gli eicosanoidi sono substrato.

La riduzione della sintesi di molecole proinfiammatorie, come l'IL-6 e le prostaglandine, sembra esser parte del controllo dell'infiammazione PPAR- α dipendente, attraverso una ridotta attività del fattore trascrizionale nucleare kB (NF-kB).

1.3 Proprietà analgesiche della PEA

E' noto che la PEA è implicata in quei meccanismi endogeni di protezione, messi in atto dall'organismo in risposta ai più svariati tipi di danno:

attivazione della reattività infiammatoria tissutale e delle vie nocicettive. In numerosi modelli sperimentali d' infiammazione e di dolore neuropatico ne sono state studiate le sue proprietà farmacologiche.

Il primo studio, condotto da Coburn AF et al., nel 1954, valutava gli effetti antiinfiammatori della PEA nel trattamento dell'artrite reumatoide. Nel 1993, Aloe L et al., riportarono che la PEA, somministrata ai ratti per via subcutanea, inibiva l'attivazione dei mastociti indotta dalla iniezione sottocutanea della sostanza P. Poiché l'analgesia prodotta da questa aciletanolamide è veloce e precede la comparsa di effetti antiinfiammatori, sulla base degli studi condotti nel 1998 da Calignano e collaboratori, è stato ipotizzato che la PEA endogena in condizioni basali, sarebbe coinvolta nella regolazione della sensibilità dolorifica.

Nel modello da formalina è stato dimostrato che la PEA, somministrata alla dose di 50 µg, per via intraplantare nel topo, esplicava effetti analgesici ed antiinfiammatori (Calignano A et al., 1998).

In un ulteriore studio, la PEA riduceva il comportamento algico indotto da somministrazione intraperitoneale (i.p.) di acido acetico (0,6%), caolino (2.5 mg i.p.) e formalina (5% intraplantare) (Calignano et al., 2001).

L'effetto analgesico della PEA era stato dimostrato anche in un modello d'iperalgia viscerale. Infatti, in questo modello l'iperriflessia vescicale, indotta da applicazioni di *nerve growth factor* (NGF), risultava sensibilmente attenuata dal trattamento sistemico con PEA, alla dose di 10-30 mg/Kg (Jaggar SI et al., 1998).

Recenti studi, hanno confermato il rapporto tra i livelli di PEA e il comportamento nocicettivo, dove la diminuzione dei livelli di PEA potrebbe essere associato alle risposte nocifensive. Infatti, nelle aree cerebrali coinvolte nella nocicezione e nel midollo spinale, in seguito all'induzione di dolore neuropatico, i livelli di PEA risultano alterati (Petrosino et al., 2007).

Partendo dal concetto che la riduzione dell'espressione del PPAR- α nel SNC (a livello spinale) e nel sistema nervoso periferico (DRG) può essere coinvolta nel danno periferico

e correlato al mantenimento e al signalling dell'iperalgia, tra il 2007 e il 2009, diversi studi sono stati condotti da D'Agostino et al., per approfondire il ruolo della PEA. Nel modello d'iperalgia nel topo, indotta dalla stimolazione plantare di carragenina, si evidenziò che la somministrazione della PEA, 30 minuti prima dell'iniezione del flogogeno, riduceva l'iperalgia indotta dal processo infiammatorio.

Un'interpretazione di questi risultati è basata sulla capacità della PEA di modulare l'espressione del PPAR- α nel DRG attraverso un percorso discendente (D'Agostino G et al., 2009). Questa interpretazione è in linea con risultati precedenti, che dimostravano gli effetti della PEA a livello spinale, nel rilascio della ciclo ossigenasi di tipo 2 (COX2) e della forma inducibile della nitrossido sintasi (iNOS) indotti dalla carragenina (D'Agostino G et al., 2007). Inoltre, è stato evidenziato il meccanismo mediante il quale la PEA attenua l'iperalgia, ripristinando il ruolo della proteina regolatoria I κ B- α e del fattore di trascrizione NF- κ B. L'attivazione di NF- κ B induce espressione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie, e l'attivazione di enzimi come la COX2 e iNOS. I risultati dello studio hanno dimostrato che la PEA, mediante attivazione del PPAR- α , previene la degradazione dell'I κ B- α indotta dalla carragenina 5 ore dopo l'induzione del processo infiammatorio, riducendo pertanto l'espressione dell'NF- κ B a livello periferico (D'Agostino G et al., 2009).

1.4 Proprietà antiinfiammatorie della PEA

Gli studi condotti da D'Agostino, oltre ad evidenziare gli effetti analgesici della PEA, avvalendosi del modello sperimentale d'infiammazione indotta da carragenina, ne evidenziarono anche gli effetti antiflogistici (D'Agostino G et al., 2009).

Nell' edema da carragenina, la PEA (10 mg/ kg/die os), ha mostrato un abbassamento significativo dei livelli di iNOS e COX-2 , suggerendo un meccanismo genomico simile a quello dei farmaci antiinfiammatori steroidei (Costa B et al., 2002); tuttavia diversi studi hanno dimostrato che la PEA riduce l'infiammazione acuta anche in modo rapido (Conti et al., 2002; Lo Verme et al., 2005), suggerendo l'esistenza di un meccanismo non genomico, come l'apertura dei canali di membrana del potassio (Lo Verme et al., 2005) oppure l'attivazione di proteine chinasi (Melis et al., 2008). Recentemente de Filippis D et al., (2010), in un modello murino d'infiammazione cronica, hanno dimostrato che la PEA riduceva la formazione di granulomi attivamente sostenuta dalla attivazione dei mastociti. Durante la formazione del granuloma vi era una significativa riduzione dei livelli di PEA nel tessuto. La sua somministrazione, comportava un aumento dei livelli di PEA nel tessuto interessato dal processo infiammatorio, una riduzione della formazione di tessuto granulomatoso 96 ore dopo stimolo e riduceva il numero e la degranolazione dei mastociti presenti nel tessuto granulomatoso. La conseguenza del controllo della degranolazione mastocitaria, portava alla riduzione dell'angiogenesi e dell' iperalgesia. Inoltre, la capacità della PEA di regolare l'attività mastocitaria, in prossimità delle fibre nervose, riduceva l' allodinia meccanica evocata in questi animali (De Filippis et al., 2011). Il controllo esercitato dalla PEA sull'attivazione mastocitaria è rafforzato anche dalla recente evidenza che mostra la significativa riduzione della produzione e del rilascio di diversi mediatori da parte dei mastociti, come il fattore di necrosi tumorale di tipo alfa (TNF- α) e fattori neurotrofici come il NGF in un modello in vivo di dolore neuropatico (Costa et al., 2008).

1.5 La PEA nella sintesi dei neurosteroidi

Studi di neuroendocrinologia, hanno evidenziato che le funzioni neuronali sono influenzate dall'azione autocrina/paracrina dei neurosteroidi (Balboa A. et al., 2006, Akk G et al., 2007). In seguito ad un processo infiammatorio nel CNS, il progesterone e i suoi metaboliti possono esercitare effetti neuroprotettivi sui neuroni e sulle cellule gliali per prevenire edema cerebrale, necrosi e apoptosi. Nel 2011, Mattace Raso G et al., hanno dimostrato che il trattamento con PEA, interagendo con i PPAR- α , regola la neurosteroidogenesi negli astrociti i quali, come i neuroni e le cellule gliali, sono corredati degli enzimi coinvolti nella biosintesi dei neurosteroidi. In questo studio si evidenzia come il trattamento con PEA aumenti l'espressione dell'enzima P450_{scc}, il primo enzima steroidogenico coinvolto nella sintesi dei neurosteroidi il quale, converte il colesterolo a pregnanolone, precursore degli steroidi. Questo studio dimostra che oltre alla modulazione dell'enzima P450_{scc}, la PEA agisce sulla proteina regolatoria acuta steroidogenica (StAR), coinvolta nel trasporto del colesterolo dai compartimenti intracellulari a quelli mitocondriali nelle fasi iniziali di sintesi dei neurosteroidi. La modulazione da parte della PEA sull'enzima P450_{scc} e sulla proteina StAR comporta un'aumento dell'Allopregnanolone, metabolita neuroattivo del progesterone e modulatore dei recettori centrali del GABA_A il cui agonista fisiologico è l'acido γ -aminobutirrico (GABA).

1.6 La PEA nei modelli animali di patologie neurodegenerative

Recenti studi hanno evidenziato ulteriori proprietà farmacologiche della PEA, attribuendole un ruolo neuroprotettivo nelle patologie neurodegenerative. In un modello murino di stroke, è stato documentato che il trattamento con PEA potrebbe modulare l'estensione del danno cerebrale agendo sul controllo dell'attività infiammatoria microgliale (Franklin A. et al., 2003).

Nel 2004 alcuni ricercatori canadesi dimostrarono che la PEA aveva un effetto protettivo sulle crisi epilettiche indotte nel ratto dal pentilentetrazolo, composto chimico ad azione convulsivante, mentre l'azione antiepilettica non si manifestava sulle crisi scatenate da altre sostanze (Sheerin AH et al., 2004)

Nel 2012, D'Agostino et al, utilizzando un modello sperimentale di Alzheimer, attraverso studi comportamentali, hanno dimostrato che la PEA, riduce il processo di astrogliosi indotto dalla β -amiloide (D'Agostino G et al., 2012)

Nel modello sperimentale di Parkinson, Esposito E et al, nel 2012, hanno dimostrato che la somministrazione di PEA riduce il processo apoptotico, proteggendo le cellule dopaminergiche della pars compacta della sostanza nera e riducendo l'attivazione delle cellule gliali. (Esposito E et al., 2012.). In particolare, in questo studio gli autori hanno dimostrato che la PEA oltre a ridurre l'espressione della iNOS, attraverso l'attivazione del PPAR- α , si sono focalizzati anche sull'effetto della PEA a carico del processo apoptotico, in relazione con l'espressione del gene Bax e Bcl-2. Questi ultimi giocano un ruolo importante nel danno neuronale e sono particolarmente espressi durante la fase iniziale della patologia. I risultati hanno evidenziato che la PEA controlla l'espressione del gene Bax e Bcl-2 riducendo la morte neuronale per apoptosi.

1.7 La PEA nella pratica clinica

Per le note proprietà farmacologiche, la PEA è stata impiegata in numerosi studi clinici sia per il trattamento del dolore neuropatico (di diversa eziopatogenesi) sia nel trattamento degli stati flogistici. Lo Monte G et al., nel 2013, hanno dimostrato gli effetti della PEA nell'ambito del trattamento del dolore cronico pelvico mentre, Cobellis L et al., nel 2011, hanno utilizzato la PEA per il trattamento del dolore cronico pelvico relativo all'endometriosi.

Nel 2002 era stato dimostrato che la PEA, somministrata in un soggetto con esteso infarto cerebrale da occlusione dell'arteria cerebrale media, riduceva il rilascio di biomarkers da insulto ipossico, attribuendo a tale composto un ruolo neuroprotettivo antiinfiammatorio (Schabitz W.R et al., 2002). Nel 2010, Guida et al., hanno condotto uno studio in doppio cieco, randomizzato, in cui la PEA era somministrata alla dose di 300 mg/die versus placebo in pazienti affetti da lombosciatalgia. Lo studio ha evidenziato che il trattamento con PEA attenua l'intensità del dolore, valutato attraverso la scala analogica visiva (VAS) e parallelamente anche una riduzione sul consumo di farmaci anti-infiammatori non steroidei.

Nel 2013, pazienti affetti da neuropatia diabetica sono stati sottoposti al trattamento con PEA (300mg/die). Il trattamento induceva attenuazione del dolore e miglioramento delle funzioni neuropsicologiche. Di recente, è stato condotto uno studio per confermare i benefici clinici ed elettrofisiologici della PEA in pazienti diabetici affetti dalla Sindrome del Tunnel Carpale (STC), la più frequente neuropatia focale. L'effetto della PEA è stato evidente nel tempo; in particolare il miglioramento clinico indotto dalla PEA era associato ad un miglioramento di tutti i parametri elettrofisiologici (Assini A et al., 2010).

Negli ultimi anni, numerosi studi, i cui risultati hanno confermato le proprietà antiinfiammatorie della PEA, propongono tale composto, privo di psicoattività e dotato di un ottimo profilo di tollerabilità, per il trattamento di quelle condizioni cliniche nelle quali i processi infiammatori si associano e/o inducono processi neurodegenerativi. A conferma di tale importanza, Mancardi e collaboratori nel 2009, hanno dimostrato come questa aciletanolamide sia capace di ridurre l'infiammazione spesso presente nelle patologie neurodegenerative come la MS (Mancardi GL et al., 2009).

2. Sclerosi Multipla; caratteristiche generali della patologia

La MS è una patologia infiammatoria cronica demielinizzante, a patogenesi autoimmune, che colpisce il SNC (Sospedra, M. et al., 2005).

A seguito dell'attacco autoimmune viene gradualmente distrutta la guaina mielinica (demyelinizzazione) che riveste parte del corpo dei neuroni (assoni). La mielina, una sostanza ricca di acidi grassi, permette la trasmissione rapida ed integra degli impulsi nervosi, che dal cervello e dal midollo spinale si dipartono verso le parti periferiche del corpo e viceversa. La distruzione della guaina mielinica, nel SNC, causa il blocco o il rallentamento della normale conduzione degli impulsi nervosi portando al manifestarsi di un'estrema varietà di sintomi. Possiamo distinguere i sintomi, a seconda della loro natura, in:

- sintomi primari sono quelli conseguenti direttamente alla demielinizzazione, come debolezza, intorpidimento, tremore, perdita della vista o disfunzione della vescica.
- sintomi secondari sono le complicazioni derivanti dai sintomi primari. Ad esempio, la disfunzione vescicale può causare infezioni croniche del tratto urinario; la paralisi può portare le piaghe da decubito.
- sintomi terziari sono le conseguenze sociali, professionali e psicologiche dei sintomi primari e secondari. La depressione è molto diffusa tra i malati di MS.

I disturbi visivi sono rappresentati da numerosi sintomi molto variabili, *parestesie a tipo formicolii* o intorpidimento, a volte con sensazione dolorosa. Si può presentare un calo di sensibilità, con difficoltà a maneggiare gli oggetti e a riconoscerli al tatto, oppure a percepire il caldo e il freddo. Queste sensazioni possono interferire con la funzionalità della parte colpita: ad esempio, l'intorpidimento alle mani può creare impedimenti nello scrivere, nel vestirsi o nel tenere oggetti. La percezione di dolore può dipendere da varie cause: da contratture muscolari o da problemi di postura, modificata per sopperire al deficit motorio, oppure da placche lungo le vie nervose sensoriali (dolore neuropatico), e si presenta spesso come fastidio sordo e continuo, a volte come punture. Tale sindrome dolorosa può consistere in una sensazione di "scossa" lungo la colonna vertebrale e le gambe, conseguente alla flessione della testa (segno di Lhermitte), oppure in sensazioni trafittive spesso al volto (nevralgia del trigemino).

Spesso si manifestano disturbi motori con ipostenia di uno o più arti, indicati come paresi. Può essere colpito un solo arto (monoparesi o monoplegia), gli arti di un lato del corpo (emiparesi o emiplegia), entrambi gli arti inferiori (paraparesi o paraplegia), o tutti e 4 gli arti (tetraparesi o tetraplegia). Associata al deficit di forza può aversi ipertono muscolare, che si manifesta con una resistenza ai movimenti passivi maggiore del normale, fino ad arrivare, in certi casi, ad una grave spasticità, uno dei sintomi più debilitanti della MS. Può essere talmente grave da portare spasmi incontrollati, anche dolorosi, alle estremità. Può inoltre causare dolore o rigidità delle articolazioni. Questo meccanismo è il tentativo dell'organismo di bilanciare la ridotta forza muscolare: la rigidità permette di stare in piedi e camminare. La spasticità può peggiorare per temperature rigide, umidità o infezioni.

I disturbi visivi possono derivare dall'inflammazione del nervo ottico o delle vie nervose motorie dell'occhio, nel tronco encefalico. Nel primo caso (neurite ottica, uno dei più frequenti sintomi d'esordio) si verifica un calo della vista, parziale o totale, generalmente ad un occhio solo, spesso accompagnato da dolore all'orbita oculare. Si calcola che circa il 55% dei malati di MS subiscono un episodio di neurite ottica. Il secondo caso invece si manifesta con uno sdoppiamento della visione (diplopia): la coppia di muscoli che controlla i movimenti dell'occhio non è perfettamente coordinata a causa della debolezza muscolare.

I disturbi della coordinazione sono invece dovuti a lesioni del cervelletto e delle vie cerebellari che causano alterazione della fluidità dei movimenti a livello sia di arti e tronco, che dei muscoli della fonazione. Ne seguono disturbi dell'equilibrio ed instabilità durante la deambulazione, che diventa incerta ed oscillante (atassia, che generalmente comporta l'uso di un appoggio per camminare). Il movimento tende al tremore (tremore intenzionale, considerato uno dei sintomi più difficili da trattare) e si interrompe durante la realizzazione, più vistosamente quando si avvicina all'obiettivo (ad esempio nell'afferrare un oggetto). La perdita di fluidità nel linguaggio, può portare al fenomeno della parola scandita.

Da studi recenti risulta che danni gravi alle funzioni cognitive sono rari (10%), mentre disturbi lievi possono riguardare fino al 50% dei malati di MS. La presenza di tali disfunzioni non dipende da un'eventuale disabilità motoria.

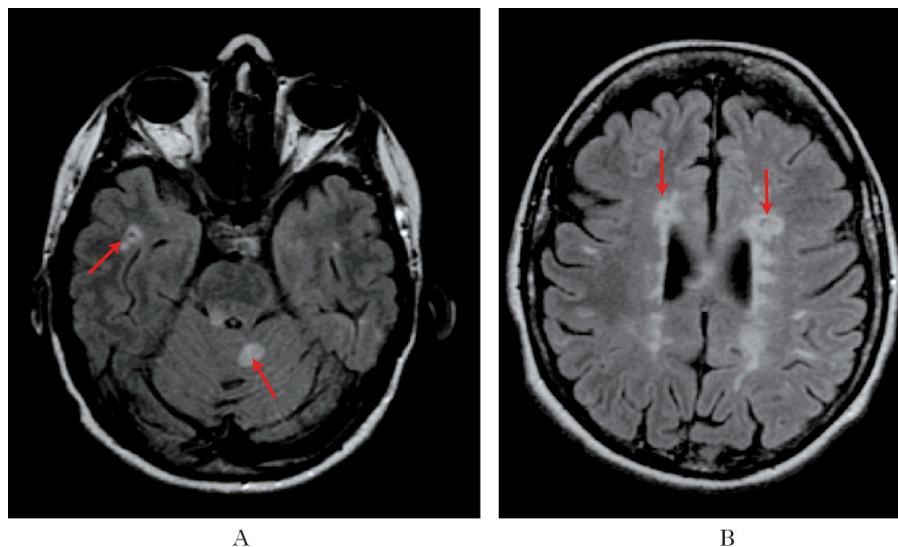
Nella MS i disturbi cognitivi più diffusi interessano la concentrazione, l'attenzione, la memoria, la velocità di elaborazione delle informazioni ed il ragionamento astratto.

Sintomo molto comune nella MS (presente per il 90% dei casi) è l'affaticamento, spesso invalidante. Può insorgere anche anni prima dell'esordio della malattia. A volte è il sintomo più marcato nei casi di minimo danno neurologico e può interferire pesantemente con le attività quotidiane. La fatica da MS peggiora con il clima caldo-umido e regredisce dopo brevi periodi di riposo. Relativamente alla causa, le ipotesi principali sostengono un'alterazione dell'equilibrio neuroendocrino o metabolico cerebrale o dei neurotrasmettitori cerebrali oppure l'influenza di fattori immunitari (Cook KF et al.,2013).

2.1 Patogenesi della MS

Dal punto di vista patogenetico, sulla base di studi preclinici e in pazienti, si ipotizza che alla base del processo infiammatorio che sottende la MS, vi sia un attacco autoimmunitario contro antigeni della mielina degli oligodendrociti, tra i quali i più studiati sono: la proteina basica della mielina (MBP), la proteina proteolipidica (PLP), e la glicoproteina associata alla mielina oligodendrocitaria (MOG). Tuttavia, anche altri antigeni mielinici e neuronali (i.e., proteine neuronali, glicolipidi, sfingolipidi) nonché proteine codificate da DNA esogeni incorporate nelle guaine mieliniche (i.e., antigeni virali) potrebbero costituire il bersaglio di una risposta autoimmune. Gli aspetti più caratteristici del danno infiammatorio, nelle aree in cui la mielina viene danneggiata, sono rappresentate da “placche” da cui prende il nome di “Sclerosi a placche”.

Le placche vengono definite multifocali sia in senso spaziale (Fig.A), in quanto possono comparire in diverse aree del SNC, che in senso temporale (Fig.B), in quanto alcune placche regrediscono completamente; ma in generale il numero di lesioni aumenta nel tempo. Queste regioni d’infiammazione possono essere rilevate con tecniche di neuroimaging, quali la risonanza magnetica (RM).



Le placche sono causate dall’attacco del sistema autoimmunitario, da parte dei linfociti T autoreattivi attivati CD4+ e CD8+ che, una volta attivati in periferia, sono in grado di superare la barriera emato-encefalica (BEE), entrando nel parenchima cerebrale (cuffing perivenulare linfocitario) dove avviano una cascata di eventi che culminano nel danno mielinico e neuronale. L’attivazione dei linfociti T pro-infiammatori nella periferia è

causata dal riconoscimento, da parte del recettore delle cellule T (T cell receptor, TCR), di antigeni presentati sul complesso maggiore di istocompatibilità di classe II (Major histocompatibility complex, MHC-II) e dalle cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cell, APC). Tali linfociti T, migrano, aderiscono e penetrano la barriera ematoencefalica mediante meccanismi di adesione molecolare, con l'intervento di proteasi e citochine pro-infiammatorie: Interferone gamma (INF γ), Tumor necrosis factor alfa (TNF α) e Interleuchina 17 (IL-17) e richiamo di ulteriori cellule mononucleate che superano la barriera ematoencefalica quali; macrofagi, che fagocitano i frammenti di mielina, e i polimorfonucleati, che liberano sostanze citotossiche e citolitiche (Fig.6.)

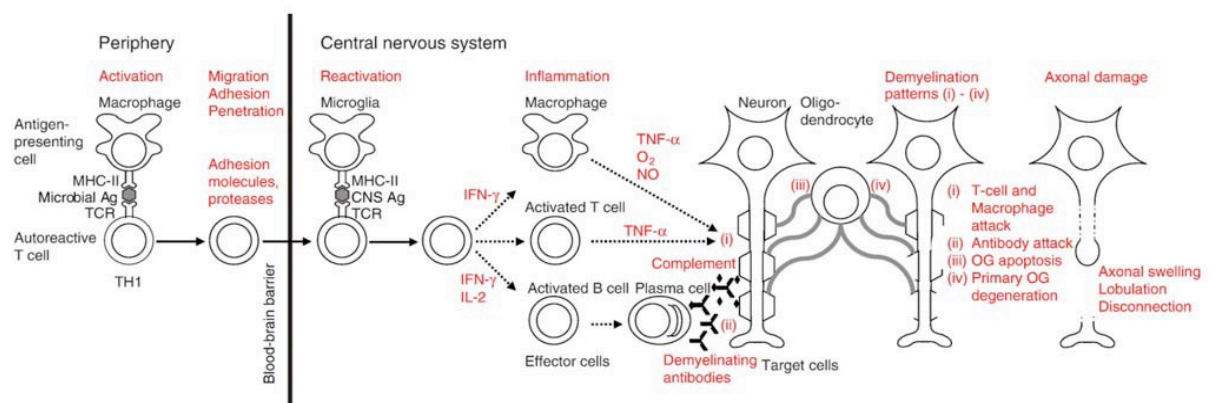


Figura 6. Meccanismo patogenetico della MS

Nonostante la documentata importanza dei linfociti T CD4+ e CD8+, recenti evidenze sperimentali suggeriscono un possibile ruolo di altre cellule immunitarie (sia effettrici che regolatorie) (Jensen J et al., 2004), nonché di fattori intrinseci del tessuto bersaglio nella patogenesi della MS. I linfociti B, le cellule presentanti l'antigene (APC), i linfociti T- $\gamma\delta$, le cellule natural killer (NK) e NKT, tra le cellule immunitarie effettrici, ed i linfociti T CD4+CD25bright (Okuda Y et al., 2005) e CD56, tra le cellule regolatorie, sono oggetto di ricerche immunopatologiche nei pazienti con MS. Inoltre, anche il ruolo di fattori solubili plasmatici e liquorali, tra cui le immunoglobuline (Ig) della classe M (IgM), è stato recentemente studiato, con l'obiettivo di identificare marcatori di malattia diagnostico-prognostici (Giunti D et al., 2003) e di fare luce sui meccanismi patogenetici della MS.

2.2 Decorso clinico della MS

La MS è caratterizzata da un decorso clinico variabile e vengono riconosciute diverse forme, riconducibili ad un diverso andamento della patologia (Lucchinetti C et al., 2000). Si possono distinguere quattro forme; la recidivante-remittente, la secondariamente progressiva, la primariamente progressiva e la progressiva con ricadute. A queste si aggiunge una quinta forma detta MS benigna, la quale ha la peculiarità di esordire con uno o due episodi acuti, seguiti da un recupero completo che non lascia tracce di disabilità e non peggiora con il passare del tempo. Questa forma viene individuata anche quando è presente solo una minima disabilità, per almeno 15 anni dalla data di esordio. In generale la MS benigna tende a essere associata a sintomi sensitivi (parestesie) o visivi (neurite ottica).

La forma clinica più frequente (circa l'85%) è rappresentata dalla MS a decorso **recidivante-remittente (MS-RR)**, nella quale si presentano episodi acuti di malattia (detti 'poussè' o 'ricadute', che regrediscono del tutto o in parte) alternati a periodi di benessere (definiti 'remissioni'). Le recidive si verificano circa una volta all'anno e queste ricadute inducono la rapida insorgenza di difetti neurologici, differenti in base alle regioni del cervello o del midollo spinale, coinvolte. Queste recidive sono di solito seguite da un certo recupero delle funzioni neurologiche perse, chiamata fase di remissione.

La MS secondariamente progressiva (MS-SP), si sviluppa come evoluzione della forma recidivante-remittente ed è caratterizzata da una disabilità persistente che progredisce gradualmente nel tempo. Circa il 30-50% delle persone con MS, che inizialmente hanno una forma recidivante-remittente, sviluppano entro 10 anni circa, una forma secondariamente progressiva.

La MS primariamente progressiva (MS-PP), che colpisce circa il 10% degli affetti MS, è caratterizzata dall'assenza di vere e proprie ricadute; all'esordio i sintomi iniziano in modo graduale e tendono a progredire lentamente nel tempo.

Infine nel 5% dei casi, oltre al presentarsi di un andamento progressivo dall'esordio, si manifestano anche episodi acuti di malattia, con scarso recupero dopo l'episodio (decorso progressivo con ricadute).

Il grado di severità della malattia, sia per quanto concerne la progressione della disabilità, viene valutata attraverso un punteggio da 0 a 10, definito dalla scala clinica

proposta dal neurologo americano Kurtzke nel 1983; Expanded Disability Status Scale (EDSS) e riproposta in figura 7.

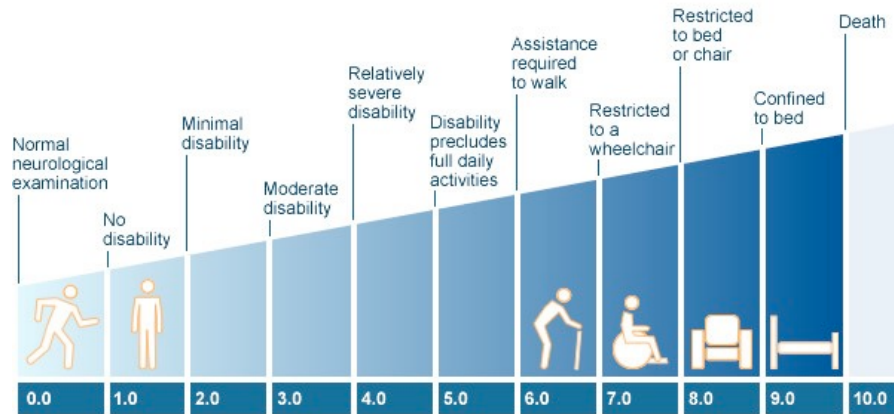


Figura.7-. Valutazione del grado di disabilità EDSS

Sino ad ora, non esistono trattamenti curativi a disposizione per la MS, sebbene siano disponibili diversi farmaci che svolgono un ruolo nel modificare e rallentare il decorso della malattia, ovvero, riducono il numero di attacchi della forma più comune della malattia.

3. Il sistema degli endocannabinoidi (ECS)

Sebbene tradizionalmente la conoscenza degli endocannabinoidi (EC) venga fatta risalire all'anno 1964 (Gaoni Y & Mechoulam R, 1964) quando venne identificato il Δ -9 tetraidrocannabinolo (THC), il componente attivo della Cannabis, responsabile degli effetti psicoattivi legati all'uso della marijuana, la ricerca scientifica sugli EC è stata fortemente intensificata solo agli inizi degli anni '90. Infatti, in tale periodo venne messa in evidenza la capacità dei cannabinoidi di origine vegetale di legarsi a proteine di membrana appartenenti alla superfamiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (G protein-coupled receptors, GPCR), denominati recettori dei cannabinoidi (CBR) (Abadji V.,1999)

I CBR sono costituiti da un'unica catena polipeptidica caratterizzata da sette tratti transmembrana, un dominio N- terminale extracellulare e un dominio C-terminale intracellulare (Devane et al., 1992). I recettori cannabinoidi, insieme agli endocannabinoidi, costituiscono il sistema cannabinoide endogeno (ECS). Negli ultimi anni la ricerca ha permesso l'identificazione di un numero crescente di endocannabinoidi tra i quali vanno menzionati anandamide (Devane WA et al., 1992) e 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (Sugiura T et al., 1995) che a tutt'oggi sono quelli maggiormente studiati. Vanno menzionati anche l'oleiletanolamina (OEA), l' N-arachidonoildopamina (NADA) e la palmitoiletanolamina (PEA).

A differenza degli ormoni tradizionali e dei neurotrasmettitori, i quali una volta formati sono stoccati in vescicole secretorie fino al momento del rilascio, gli endocannabinoidi sono sintetizzati ed immediatamente rilasciati in seguito a stimoli quali la depolarizzazione della membrana oppure l'aumento del calcio intracellulare. Inoltre, tali sostanze vengono immediatamente degradate al termine della loro azione. È nozione accettata ormai che il sistema endocannabinoide agisca "su richiesta", con una selettività finemente regolata spazialmente e temporalmente, ovvero esercita le sue azioni modulatorie solo "quando" e "dove" esse servono.

A livello cerebrale, gli endocannabinoidi agiscono come neurotrasmettitori retrogradi, essi sono, cioè, in grado di inibire l'attività sinaptica.

Di regola, la sinapsi è formata da una terminazione nervosa terminale presinaptica che contiene vescicole di neurotrasmettitori (quali ad esempio dopamina, GABA, serotonina,

oppioidi), da un terminale post-sinaptico che esibisce siti recettoriali per tali neurotrasmettitori e da uno spazio intersinaptico. Tradizionalmente, una volta ricevuto un impulso il neurone presinaptico è attivato, ed induce un incremento di calcio intracellulare, il quale a sua volta determina un rilascio di neurotrasmettitori già stoccati nelle vescicole, i quali interagendo con la membrana postsinaptica determinano una serie di eventi che possono portare ad un'eccitazione o un'inibizione della cellula postsinaptica. Gli endocannabinoidi sono generalmente prodotti a livello postsinaptico e dopo essere stati rilasciati si legano ai recettori cannabinoidi presenti sulle cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, comportandosi così come mediatori paracrini o autocrini (Piomelli D et al., 2003). La loro natura chimica, estremamente poco idrosolubile, ne impedisce infatti la facile diffusione nella matrice extracellulare o nel sangue. Dopo il legame con i recettori, s'innescano eventi di trasduzione del segnale cannabimimetico, quali, ad es., l'inibizione della formazione di AMP ciclico o dell'ingresso di ioni calcio nella cellula, che sono alla base dell'azione biologica degli endocannabinoidi (Piomelli D., 2003). Una volta espletata la loro funzione, gli endocannabinoidi possono essere internalizzati nelle cellule attraverso un meccanismo di trasporto ad alta affinità, denominato "trasportatore degli endocannabinoidi" (Di Marzo V et al 1998, Hillard et al 1997).

Una volta all'interno della cellula, gli endocannabinoidi vengono rimossi attraverso una sequenza di meccanismi di degradazione molecolare:

- a) ricaptazione per diffusione attraverso la membrana cellulare, che nel caso dell'anandamide viene facilitata da trasportatori di membrana;
- b) idrolisi enzimatica e/o esterificazione;
- c) riesterificazione dei prodotti dell'idrolisi in fosfolipidi di membrana.

L'enzima che catalizza l'idrolisi dell'anandamide è stato caratterizzato e denominato "fatty acid amide hydrolase" (FAAH), mentre l'idrolisi del 2-AG è catalizzata dall'enzima monogliceride lipasi (MGL) (Ueda N et al., 2002, Matias I et al 2006).

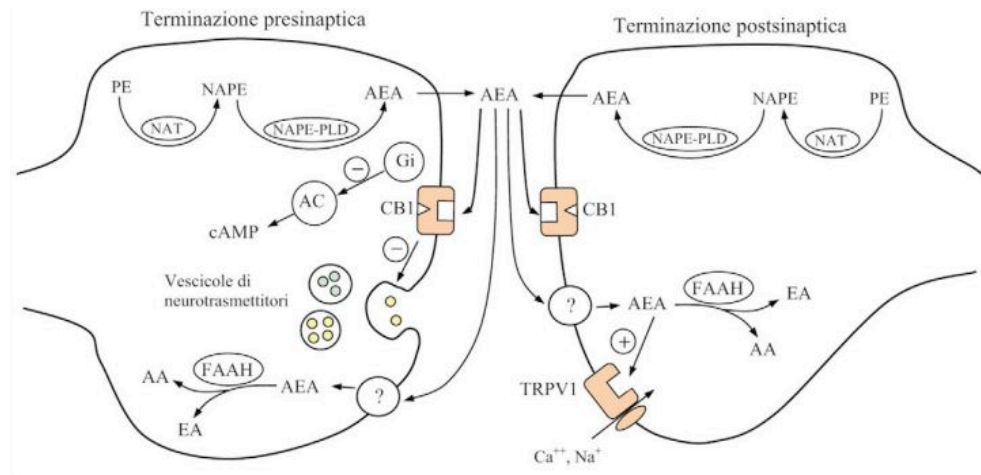


Fig-8. Rappresentazione schematica della sintesi, azione e degradazione dell'anandamide a livello sinaptico.

Di regola, attraverso questi meccanismi intraneuronali, il sistema endocannabinoide è coinvolto non solo nel controllo dell'appetito ma anche in svariate funzioni fisiologiche, la gran parte delle quali correlate alla risposta allo stress e al mantenimento dell'omeostasi. Gli endocannabinoidi dispongono di proprietà neuroprotettrici e nocicettive, sono in grado di regolare l'attività motoria e di controllare alcune fasi del processo della memoria. Inoltre, il sistema endocannabinoide è coinvolto nella modulazione delle risposte immunitarie, infiammatorie ed endocrine.

Fino ad oggi sono stati identificati e clonati due sottotipi di recettori dei cannabinoidi, i CB1 e i CB2. In realtà, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di altri bersagli molecolari in grado di mediare effetti simili a quelli prodotti dall'attivazione dei recettori CB1 e CB2, denominati nell'insieme recettori "orfani" dei cannabinoidi non-CB1, non-CB2 come il GPR55 (Munro S, et al., 1993 Lauckner R et., 2008,). I recettori CB1 sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo, e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali. Aree particolarmente ricche di recettori CB1 sono i gangli della base, il cervelletto e la corteccia (Herkenam M et al 1991). Sebbene in minor densità, i recettori CB1 sono rilevabili anche in aree limbiche quali il nucleus accumbens.

Sebbene i recettori CB1 siano localizzati prevalentemente a livello del SNC, basse densità recettoriali sono state identificate anche in tessuti periferici quali la milza, il cuore, i testicoli, il timo, il midollo osseo e le tonsille (Amery A et al 1998). Nel SNC i recettori CB1 sono prevalentemente presinaptici, suggerendo un loro ruolo generalmente inibitorio nella modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori (Tsou K et al 1998). I recettori CB1 appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle G proteine, con i sette domini transmembrana, la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare (Howlett AC et al 1998). Attraverso le G proteine di tipo inibitorio (Gi/Go), i recettori CB1 transducono il segnale agendo su diversi effettori intracellulari. In particolare i cannabinoidi inibiscono l'adenilato ciclasi (Felder CC et al 1992, Gerard C et al 1990), modulano alcuni canali ionici inducendo la chiusura dei canali del calcio voltaggio dipendenti e l'apertura di quelli del potassio rettificanti entranti e modulano l'attivazione di diverse proteine chinasi intracellulari: MAP (mitogen activated protein) kinasi, specificatamente della famiglia di ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases type 1 and 2) e di JNK (c-jun N-terminalkinase),

PKB (protein kinase B), FAK (Focal Adesion Kinase) e PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Howlett AC et al 2002,2004).

3.1 Il sistema endocannabinoide nella Sclerosi Multipla

Negli ultimi anni, da studi condotti sul modello animale di encefalomielite allergica sperimentale (EAE) della MS è stato evidenziato come il sistema degli EC sia in grado di modulare il processo infiammatorio (Baker D et al., 2003; Walter L and Stella N, 2004) e i danni neurodegenerativi (Grundy RI et al., 2001). Se l'MS o il modello EAE perturbino il sistema degli EC è tuttora oggetto di discussione. Aumentati livelli di AEA, e non di altri endocannabinoidi, sono stati riportati da studi condotti su pazienti in fase attiva di lesione corticale (Eljaschewitsch E et al., 2006). In un altro studio, tuttavia, si evidenziò come l'espressione degli enzimi coinvolti nella degradazione dell'AEA erano sovra espressi nei pazienti che presentavano lesioni attive, indicando come i livelli endogeni di questo endocannabinoide potrebbero essere ridotti nei pazienti affetti da MS (Benito C et al., 2007). Risultati ottenuti dal modello Lewis di EAE, evidenziarono che durante il processo infiammatorio, la produzione di AEA e 2-AG non era alterata (Shohami E and Mechoulam R, 2006; Witting A et al., 2006); mentre, i livelli di entrambi gli endocannabinoidi erano elevati nel modello SJL/J di EAE relapse-remitting della MS (Baker D et al., 2001). Centonze e collaboratori, nel 2007, analizzarono i livelli degli endocannabinoidi sia nel liquido cerebro spinale (CSF) di pazienti affetti da MS sia nel modello murino EAE (Centonze D et al., 2007). I loro risultati evidenziarono che l'MS e il modello EAE sono associati ad una alterazione del ECS. Aumentati livelli di AEA, e non del 2-AG, furono trovati nel CSF dei pazienti MS, indicando che i 2 endocannabinoidi sono arruolati diversamente durante il processo neuroinfiammatorio. Sebbene, l'AEA e il 2-AG, condividano molte azioni farmacologiche, presentano differenti meccanismi regolatori, e l'AEA, ma non il 2-AG, è prevalentemente coinvolta durante un processo neuroinfiammatorio (Chevalere V et al., 2006).

Inoltre, da questo studio si evidenziò come i livelli di AEA erano alti nei linfociti dei pazienti affetti da MS. Questi risultati suggeriscono un importante ruolo dell'AEA in questi soggetti ed è in linea con uno studio preliminare il quale evidenziò come i livelli di questo endocannabinoide erano elevati nei pazienti con lesioni attive rispetto a quelli che presentavano lesioni quiescenti. Al contrario, dal modello EAE, Centonze e collaboratori (2007) riscontrarono elevate concentrazioni di AEA nel cervello del ratto e

una bassa espressione del recettore CB1. La scarsa espressione, a carico del recettore CB1, indica un ridotto controllo sulla trasmissione GABA in particolari regione del cervello quali il nucleo striato, un'area subcorticale particolarmente vulnerabile al processo neurodegenerativo associato alla MS (Bakshi R et al., 2002; Bermel RA et al., 2003). Questa regione è anche il sito preferenziale dell'azione del ECS in condizioni fisiologiche che patologiche. (Piomelli D, 2003). Basato sul concetto che l'attivazione del ECS nella MS ha come scopo quello di limitare il danno neuronale, si potrebbe ipotizzare che la down-regolazione del recettore dei cannabinoidi CB1 riduca la sinapsi GABA prendendo parte all'azione protettiva dell'ECS. Infatti, l'eccitossicità, gioca un ruolo importante nella MS e nel modello EAE in quanto i livelli di glutammato sono significativamente alti nel CSF (Stover JF et al., 1997; Sarchielli P et al., 2003) e nel cervello di pazienti con MS (Srinivasan R et al., 2005). Nel 2009, Jean-Gilles e collaboratori condussero uno studio simili, andando ad analizzare i livelli plasmatici e nel CSF di diversi endocannabinoidi in pazienti affetti da diverse forme cliniche di MS. I loro risultati evidenziarono che i livelli plasmatici di AEA, rispetto ad un gruppo sano, erano significativamente elevati nella MS-RR, nella forma MS-PP ed nella MS-SP. Mentre, i livelli endogeni dell'OEA risultavano significativamente elevati solo nella forma MS-SP. Infine, i livelli plasmatici della PEA erano elevati nella forma MS-RR e in quella MS-SP rispetto al gruppo di controllo.

Gli alti livelli plasmatici di PEA, OEA e AEA, riscontrati soprattutto nella forma MS-SP, potrebbero derivare da una ridotta espressione dell'enzima FAAH, responsabile del catabolismo degli endocannabinoidi.

L'insieme di questi studi, suggerisce che durante un processo neurodegenerativo, l'azione del ECS rappresenta un meccanismo neuroprotettivo con lo scopo di ridurre sia i danni neurodegenerativi che infiammatori.

Studi condotti sui modelli animali EAE hanno evidenziato come i recettori CB1 rientrano nella modulazione del processo infiammatorio della MS. Di recente, grazie a tecniche d'immunofluorescenza, è stato evidenziato come i recettori CB1 sono espressi nei macrofagi all'interno delle placche infiammatorie della MS (Benito C et al., 2007). Quale sia il meccanismo, non è ancora chiaro; di sicuro la presenza dei recettori CB1 all'interno delle placche infiammatorie, quindi attive, della MS è indice di un'attività anti-infiammatoria e protettiva esplicita da questi recettori. Attività confermata da uno studio, recentemente pubblicato, condotto sul modello EAE che dimostra che il recettore CB1 esplica la sua attività anti-infiammatorie e protettiva modulando l'espressione del

TNF- α (Rossi S et al., 2011). Di forte importanza, è lo studio condotto su pazienti affetti da MS-RR, dal quale è emerso una maggiore suscettibilità alla neuroinfiammazione in coloro che erano corredati del polimorfismo del gene codificante il recettore CB1 rispetto a coloro che non lo presentavano (Rossi S et al., 2013).

In questo studio, è stato investigato il ruolo dei recettori CB1 nella fisiopatologia della SM attraverso l'ablazione del gene CB1Rs. È emerso infatti, che la mancanza dell'espressione di questo gene innesca un importante processo neurodegenerativo e studiando dettagliatamente questo gene, si è visto che la sua espressione è legata ad un polimorfismo microsatellite ovvero un trinucleotide Short Tandem Repeat (STR)_n AAT che modifica l'espressione della proteina codificata da questo gene.

Anche per i recettori CB2, numerosi studi ne hanno evidenziato il ruolo nel processo infiammatorio della MS. In particolare, diversi studi ne hanno evidenziata la loro presenza sugli astrociti all'interno delle lesioni corticali formatesi nella sostanza bianca. Per quanto, sia poco noto il ruolo dei CB2 sugli astrociti, la loro presenza starebbe ad indicare un loro controllo nel rilascio di fattori pro-infiammatori. (Ortega- Gutierrez S et al., 2005; Sheng WS et al., 2005).

Il recettore CB2 fu individuato per la prima volta da Munro nel 1993 (Munro S et al., 1993) e possiede un'omologia del 48% con il recettore CB1; è principalmente localizzato nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti (Klein TW et al 1998)

Anche il recettore CB2 trasduce il segnale mediante G proteine, ma conosce effettori solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1. In particolare, il recettore CB2 non è in grado di modulare i canali ionici, mentre, come il recettore centrale, è negativamente accoppiato all'adenilato ciclasi ed è in grado di attivare le MAP kinasi (Amery A 1998). Recenti studi hanno rilevato l'espressione di mRNA del recettore CB2 anche a livello di alcune aree cerebrali come il cervelletto ed il midollo allungato. In quest'ultimo, l'immunoreattività del recettore CB2 è stata trovata nei neuroni all'interno del nucleo motorio dorsale del vago, nel nucleus ambiguous e nel nucleo trigemino spinale. Diverse evidenze scientifiche assegnano ai recettori CB2 la capacità di ridurre sia l'infiammazione indotta sperimentalmente sia l'iperalgia di origine flogistica; inoltre, esistono preliminari evidenze farmacologiche dell'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali (recettore non-CB1 o CB3) per i cannabinoidi a livello del SNC la cui caratterizzazione molecolare non è ancora stata definita. (Breivogel CS et al 2001, Calignano A et al 1998, 2001, Di Marzo V et al 2000).

4. Trattamento farmacologico della sclerosi multipla

Non esiste ancora una terapia farmacologica specifica e risolutiva della malattia. I trattamenti sono mirati al controllo degli episodi acuti, alla prevenzione delle ricadute e al miglioramento generale del quadro sintomatologico. La farmacoterapia dei sintomi acuti si basa sul controllo dell'infiammazione acuta con i corticosteroidi (preferibilmente per pochi giorni ad alto dosaggio, tradizionalmente endovena, ma secondo uno studio recente anche per via orale), che abbreviano la durata e accelerano la remissione dei sintomi. In questo modo si ha un minimo di effetti collaterali, al contrario di quello che avviene nella terapia prolungata con corticosteroidi, che non è indicata nella sclerosi multipla in quanto inefficace. Nei casi in cui sintomi acuti non regrediscono in modo sufficiente con la terapia cortisonica, la plasmateresi (un tipo di dialisi che elimina gli anticorpi dal siero) può essere impiegata con dimostrato beneficio. Per prevenire le ricadute sono utilizzati farmaci immunomodulanti, quali i beta-interferoni, molecole fisiologiche già presenti nell'organismo che regolano le risposte immunitarie. Esistono due specialità contenenti interferone beta-1a (Avonex®, Rebif®) e una contenente interferone beta-1b (Betaferon®) che sono state studiate in pazienti con forme a ricaduta e remissione. L'interferone è prodotto da vari tipi di cellule inclusi i fibroblasti e i macrofagi.

L'interferone beta-1a è glicosilato e possiede una singola molecola di zucchero complesso legato all'azoto. È noto che la glicosilazione ha effetto sulla stabilità, attività, distribuzione biologica ed emivita della citochina nel sangue. Tuttavia gli effetti dell'interferone beta-1a che sono dipendenti dalla glicosilazione non sono completamente noti. L'Avonex® è indicato anche per il trattamento dei pazienti con sindrome clinicamente isolata (CIS).

Il Rebif® nelle sue due formulazioni da 22 e 44mg, trova la sua principale indicazione nella terapia della MS-RR. Il Rebif® (interferone beta-1a) condivide la stessa sequenza aminoacidica dell'interferone beta umano endogeno. Viene prodotto in cellule di mammifero (cellule ovariche di criceto cinese) ed è quindi glicosilato come la proteina endogena.

Il Betaferon®, oltre ad essere utilizzato nella terapia della MS-RR, è stato autorizzato nella terapia della MS-SP. È stato dimostrato che l'interferone beta-1b possiede

proprietà sia antivirali sia immunomodulanti. I meccanismi mediante i quali l'interferone beta-1b esercita i suoi effetti nella sclerosi multipla non sono ancora chiaramente definiti. Comunque, è noto che le proprietà dell'interferone beta-1b di modificare la risposta biologica sono mediate dalla sua interazione con recettori cellulari specifici localizzati sulla superficie delle cellule umane. Il legame dell'interferone beta-1b con questi recettori induce l'espressione di una serie di prodotti genici, che si ritiene siano i mediatori delle attività biologiche dell'interferone beta-1b.

Comune a tutti gli interferoni, anche se con frequenza diversa, è la flu-like-syndrome, un effetto collaterale, transitorio, che si manifesta poco dopo la somministrazione del farmaco e che può presentarsi ad ogni somministrazione.

Un altro farmaco che modifica la decorso della malattia, è il copolimero 1 o glatiramer acetato (Copaxone®) che consiste di una miscela di aminoacidi i quali riproducono la composizione della proteina basica della mielina, agendo come falso bersaglio.

Interferoni e glatiramer hanno efficacia comparabile, il vantaggio del glatiramer è di avere meno effetti collaterali degli interferoni e di essere una terapia in genere molto ben tollerata.

Si utilizzano anche farmaci immunosoppressori come l'azatioprina, il metotressato, la ciclofosfamida e il mitoxantrone, che bloccano la replicazione cellulare del sistema immunitario. Gli immunosoppressori sono tendenzialmente più usati nei pazienti con forme aggressive (per cercare di frenare l'attività del sistema immunitario e per cercare di prevenire gli attacchi attraverso una soppressione globale delle cellule del sistema immunitario stesso). Essendo sostanze tossiche usate anche nella chemioterapia dei tumori, sono riservate a casi di sclerosi multipla con progressione rapida e disabilitante e la loro somministrazione è riservata a centri clinici specializzati. Attualmente, l'unico farmaco in grado di rallentare il decorso della malattia è senza dubbio il Natalizumab (TYSABRI®); anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato IgG4k contro le α 4 integrine_{4,5} (α 4 β 1 nel SNC), molecole espresse sulla superficie cellulare dei leucociti (tranne i neutrofili), che promuovono meccanismi di adesione e di trasporto cellulare. Il meccanismo ipotizzato è quello che il farmaco blocca la migrazione delle cellule immunitarie dal circolo sanguigno al cervello, impedendo in tal modo il processo infiammatorio e prevenendo il danneggiamento delle fibre nervose. Quando il Natalizumab si lega alla subunità alfa-4 dell'integrina, previene l'adesione alfa-4 mediata dei leucociti al loro recettore (VCAM-1, MadCAM-1), impedendo in tal modo il passaggio dei leucociti, attraverso l'endotelio, nel tessuto parenchimale infiammato.

Un ulteriore meccanismo d'azione di Natalizumab può consistere nella soppressione delle reazioni infiammatorie in atto nei tessuti ammalati, mediante l'inibizione dell'interazione dei leucociti che esprimono $\alpha 4$ con i loro ligandi nella matrice extracellulare e sulle cellule del parenchima. In tal modo, Natalizumab può sopprimere l'attività infiammatoria presente nell'area malata ed inibire un'ulteriore migrazione nei tessuti infiammati di cellule del sistema immunitario.

Studi clinici nel trattamento delle forme recidivanti della Sclerosi Multipla hanno dimostrato che Natalizumab è in grado di ritardare l'accumulo di disabilità e di ridurre la frequenza delle esacerbazioni cliniche.

L'Ocrelizumab condivide lo stesso meccanismo d'azione di Rituximab, un anticorpo mono-clonale chimerico diretto contro i CD20. La CD20 è una proteina di membrana presente sulle cellule linfocitarie B allo stato maturo. Dai dati emersi sembrerebbe che Ocrelizumab provoca la scomparsa di tali cellule nel sangue e negli organi linfoidi. Si ritiene che anche i linfociti B siano responsabili dei processi autoimmunitari che promuovono la patogenesi di tutte le varianti cliniche della MS, inclusa la forma primariamente progressiva. La loro eliminazione dal circolo sanguigno potrebbe, pertanto, interrompere il processo infiammatorio che promuove l'autoimmunità cronica. Così come l'Ocrelizumab, anche il Daclizumab è un anticorpo monoclonale antagonista specifico per la sub-unità alfa (CD25). CD25 è poco espresso sulle cellule T quiescenti, ma aumenta la sua concentrazione rapidamente quando le cellule T, cellule responsabili dell'infiammazione, sono attivate. Anticorpi come questo inducono una espansione di un determinato clone di cellule T in grado di inattivare i linfociti T attivi riducendone, la capacità di provocare una risposta auto infiammatoria, responsabile della comparsa di recidive o di nuove lesioni demielinizzanti.

A differenza di quanto accade con l'Ocrelizumab, tuttavia, legandosi alle cellule target il Daclizumab non ne causa la distruzione, quanto piuttosto una minore attivazione. La terapia con Daclizumab sembra rafforzare anche l'immunoregolazione propria dell'organismo.

La disponibilità di farmaci per via orale migliora l'aderenza al trattamento. Il primo principio attivo a formulazione orale, autorizzato nel gennaio del è stato il Gilenya® (Fingolimod) approvato nei soggetti con MS-RR (dose quotidiana di 0,5 mg). Gilenya deriva dal myrocin, principio attivo di origine naturale ad azione immunosoppressiva, ricavato dai funghi *Isaria sinclairii* e *Myrothecium verrucaria*, tradizionalmente usati nella medicina popolare cinese come elisir di lunga vita. Era stato originariamente

proposto come farmaco antirigetto. E' un analogo della sfingosina, principale costituente degli sfingolipidi. La sfingosina si forma all'interno della cellula a partire dal ceramide e viene fosforilata a sfingosina-1-fosfato (S1P), la forma biologicamente attiva, per opera di due kinasi (sfingosina kinasi di tipo 1 e 2).

La distribuzione della S1P-liasi è peculiare poiché è scarsamente presente nel plasma e nei vasi linfatici, mentre la concentrazione dell'enzima è elevata nel parenchima linfonodale. Questa caratteristica è rilevante in quanto strettamente connessa all'azione del Fingolimod. Esistono 5 sottotipi di recettori della S1P, accoppiati a differenti sottoclassi di proteine G che attivano specifiche vie di segnale intracellulare. Fingolimod agisce come modulatore del recettore S1P. Esso infatti, una volta entrato nella cellula, viene fosforilato per opera di una kinasi: quindi esce dalla cellula dove può legarsi ai recettori della S1P. Inoltre, a differenza della S1P, Fingolimod ha una liposolubilità molto elevata ed è quindi in grado di passare attraverso barriere che sono invece impenetrabili alla S1P quali, per esempio, quella emato-encefalica. Di particolare importanza, è l'azione sul sottotipo recettoriale S1P1 presenti sulla superficie di neuroni, astrociti, cellule muscolari e endoteliali. Il principale meccanismo avviene a livello dei linfonodi e comporta la fuori uscita di alcune sottopopolazioni linfocitarie. Il passaggio dei linfociti dai linfonodi al sangue è mediato dal recettore S1P1. Fingolimod, agendo da antagonista funzionale, down-regola tale recettore e determina di conseguenza un sequestro dei linfociti nei linfonodi e una loro riduzione numerica nel sangue periferico. Infine, è stata evidenziata la capacità della Cannabis sativa, di ridurre la spasticità, uno dei sintomi più comuni associati alla sclerosi multipla e una delle principali cause di disabilità legate a questa malattia. Il Sativex®, è il primo trattamento specifico per la spasticità da moderata a grave in pazienti che non hanno risposto adeguatamente al trattamento con altri farmaci anti-spastici.

Si tratta di un modulatore del sistema endocannabinoide composto da due principi attivi - THC (delta-9-tetraidrocannabinolo) e CBD (cannabidiolo) . I suoi principi attivi, i cannabinoidi THC e CBD interagiscono con i recettori endocannabinoidi umani CB1 e CB2 modulando le vie motorie e del dolore e migliorando la spasticità, senza causare debolezza muscolare.

Parte Sperimentale

5. Disegno dello studio clinico

5.1 Obiettivo primario dello studio

Valutare se la PEA, oggi disponibile sul mercato come alimento dietetico destinato a fini medici speciali (ADDFMS), in associazione all'Interferone beta-1a, potenzi l'effetto immunomodulante, anti infiammatorio e neuroprotettivo nei pazienti affetti da MS, forma recidivante-remittente (R-R) rispetto al gruppo trattato solo con Interferone beta-1a, attraverso la modulazione delle principali citochine coinvolti nel processo infiammatorio (INF- γ , TNF- α e IL-17), nella sintesi e nei livelli degli endocannabinoidi (Anandamide (AEA), Palmitoiletanolamide (PEA), l'Oleiletanolamide (OEA)) e neurosteroidi (Allopregnanolone (ALLO)).

5.2 Obiettivi Secondari

Valutare l'efficacia della PEA sulla frequenza di "relapses" rispetto all'anno precedente e sulla mancata progressione di 1 punto della disabilità motoria alla scala di valutazione EDSS. Infine è stata valutata la sicurezza e la tollerabilità del farmaco.

5.3 Popolazione in studio

Sono stati reclutati 20 consecutivi pazienti affetti da MS-RR, in forma clinica diagnostica secondo i criteri di McDonald (2001) e rivisti da Polman (2005) e rispondenti a stabiliti criteri di inclusione ed esclusione. I pazienti che hanno risposto ai criteri d' inclusione e che hanno firmato il consenso informato sono stati randomizzati con interferone beta-1a e interferone-beta-1a+PEA per un periodo di 12 mesi. I pazienti sono stati valutati in follow-up per 12 mesi.

Nella fase di screening sono stati raccolti i dati anamnestici, è stato eseguito un esame obiettivo generale, sono stati valutati i parametri vitali e si è proceduto alla raccolta delle caratteristiche della storia clinica della SM (data e modalità di esordio, durata di

malattia, decorso di malattia, numero di poussées totali, nei 2 anni e nei 3 mesi precedenti all'arruolamento). È stato eseguito l'esame obiettivo neurologico nel quale è stato valutato il grado di disabilità motoria funzionale secondo la scala di valutazione EDSS. I pazienti sono stati poi sottoposti a prelievo ematico per l'esecuzione dei test di laboratorio previsti dallo studio. I sieri sono stati conservati in eppendorf da 1,5 ml (6 ml totali) a -80°C . Ciascun siero è stato analizzato per la valutazione dell'espressione delle citochine pro-infiammatorie, mediante saggio ELISA. Infine ciascun soggetto arruolato è stato sottoposto ad una RM senza somministrazione di gadolinio (Gd).

5.4 Criteri d' inclusione

- Et  compresa tra 18-55 anni;
- Sclerosi Multipla tipo R-R (recidivante-remittente);
- Paziente in trattamento con interferone beta-1a da almeno 6 mesi
- EDSS compreso tra 1.0 e 3.5
- Paziente che abbia fornito consenso informato scritto

Criteri di esclusione

- Sclerosi Multipla tipo S-P (secondaria – progressiva);
- Sclerosi Multipla tipo P-P (primaria – progressiva);
- Presenza di patologie cardiaca, epatica e/o renale concomitanti che controindichino il trattamento con PEA o con Interferone;
- Trattamento con antiepilettici e antidepressivi (pregabalin, duloxetina);
- Scarsa compliance al trattamento;
- Pazienti di sesso femminile (non sessualmente attive, sterili, e pazienti in menopausa sono esclusi da questi criteri):
 - Gravidanza
 - Allattamento
 - Contracezione inadeguata
- Ipersensibilit  alla PEA o ad uno dei suoi eccipienti;
- Paziente non consenziente a dare il proprio consenso informato scritto.

5.5 Trattamento

Ai pazienti sono stati somministrati 600 mg/die di Normast® (1 compressa/die) o placebo (equivalente al farmaco) per os, per un periodo di 12 mesi.

La fornitura del farmaco e del placebo   stata assicurata, incondizionatamente, da Epitech.Group per tutta la durata dello studio. Tutti i pazienti (gruppo trattati e placebo) hanno continuato il trattamento con interferone beta-1a (via sotto-cutanea-3 volte a settimana), che avevano iniziato nei 6 mesi precedenti.

6. MATERIALE E METODI

6.1 Analisi degli Endocannabinoidi

Il dosaggio degli endocannabinoidi è stato condotto presso il laboratorio di analisi chimico-tossicologica del dipartimento di scienze farmaceutiche, dal gruppo del Prof. Veniero Gambaro dell'Università degli studi di Milano.

I campioni di sangue, raccolto in provette con acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), sono stati centrifugati e il plasma è stato separato in criovials e congelati a -80°C.

Il plasma è stato trattato con una miscela di CHCl₃/ MeOH/ Tris-HCl 50mM pH 7,4 (2:1:1 v/v) in presenza degli standard interni per AEA, PEA e OEA (Cayman Chemicals, Michigan, USA). I lipidi contenuti nella fase organica sono stati purificati su colonna di silice mediante open-bed chromatography. Per questo tipo di purificazione, la colonna è stata impaccata con una sospensione di silice in CHCl₃ (in rapporto di massa 5:1 riferito al peso dell'estratto organico). Caricata la fase organica, sono state fatte eluire miscele di solventi a polarità crescente: due volumi di CHCl₃/MeOH in rapporto 8:2 la cui frazione era costituita principalmente da steroli; due volumi di CHCl₃/MeOH in rapporto 9:1 contenente le N-aciletanolammine ed i monoacilgliceroli; infine, due letti di CHCl₃/MeOH in rapporto 1:1, contenente composti appartenenti alla famiglia delle N-acil-fosfatidil-etanolammine (NAPEs), ivi compreso il N-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE) precursore biosintetico dell'AEA. Tutte le frazioni sono state raccolte, l'eccesso di solvente è stato allontanato e le frazioni contenenti AEA, PEA e OEA sono state analizzate mediante la spettrometria di massa, accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS). Le analisi sono state condotte utilizzando un apparecchio Shimadzu per HPLC (LC-10ADVP) accoppiato ad un quadrupolo MS (Shimadzu, LCMS-2010) attraverso un'interfaccia APCI (Shimadzu) e una colonna HPLC Phenomenex (C-18, 150mm, 5 µm, 4.6 mm) a fase inversa. La fase mobile, costituita da una miscela di metanolo/acqua/acido acetico (85/15/0.1), attraversava la colonna ad una velocità di 1ml/min. La determinazione dello spettro di massa è avvenuta secondo il monitoraggio di ioni selezionati (SIM). Gli ioni selezionati corrispondevano ai valori massa/carica (m/z) di 348 e 356 (ioni molecolari dell'AEA non deuterata e

deuterata). Il rapporto delle aree tra il composto endogeno, non deuterato, e quello deuterato, ha permesso di determinare quantitativamente i livelli dell'AEA, PEA, e OEA. La determinazione dei livelli di questi endocannabinoidi è stata ottenuta per diluizione isotopica degli standard interni e le pmol degli endocannabinoidi ottenute sono state normalizzate per milligrammi di estratto lipidico.

6.2 Analisi dei Neurosteroidi

La quantificazione dei neurosteroidi sui campioni di plasma è stata eseguita mediante analisi radioimmunologica (RIA), sistema analitico ad elevata sensibilità e specificità. La quantificazione è stata condotta, presso il dipartimento di biologia sperimentale, dal gruppo del Prof. Giovanni Biggio, dell'università degli studi di Cagliari, in collaborazione con la Prof.ssa Mariangela Serra.

La specificità è raggiunta mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico, capace di riconoscere e legare selettivamente la sostanza da dosare. La sensibilità è garantita dall'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

La quantificazione radioimmunologica si basa sulla reazione di competizione tra un antigene marcato con un tracciante radioattivo e l'analita che si vuole quantificare per un anticorpo specifico comune. La competizione tra antigene marcato e l'analita si determina perché l'anticorpo è presente in difetto: ciò significa che maggiore è la concentrazione dell'analita presente, minore sarà la quantità del tracciante radioattivo che si legherà all'anticorpo.

6.3. Estrazione dei Neurosteroidi

L'analisi radioimmunologica è stata condotta utilizzando 1 ml di plasma come matrice di partenza. In regime ambulatoriale, il plasma è stato ottenuto mediante prelievo ematico, compiuto tra le 7:00 e le 9:00 AM, per evitare variazioni circadiani, posto in -80° C fino al momento dell'analisi. Per l'estrazione dei neurosteroidi i campioni di plasma sono stati diluiti con 2 ml di acqua e con 3 ml di etanolo assoluto. Dopo 20 minuti di agitazione, le provette sono state centrifugate (3500xg per 15 minuti a 4°C) per sedimentare le proteine denaturate. Il surnatante è stato decantato e posto in tubi di polipropilene e portato a secco mediante procedura sotto vuoto. Per rimuovere gli steroidi non coniugati, il surnatante è stato raccolto e posto in tubi di polipropilene da 5 ml contenete 40µL d' idrogeno fosfato di potassio a pH 8.0. ed estratti 3 volte con etere etilico.

Gli estratti etilici, decantati una volta che la fase acquosa è stata rimossa, sono stati disciolti in 3 ml di n-esano (70%) e propanolo (30%). Gli steroidi sono stati poi quantificati utilizzando specifico anticorpo per ALLO.

6.4 Determinazione dei livelli sierici di citochine coinvolte nella patologia

La quantificazione nei livelli sierici delle citochine è stata condotta mediante il metodo ***Enzyme-Linked Immunosorbent (ELISA)***

La soluzione contenente l'anticorpo primario, specifico per l'antigene da individuare, è stata posta nei 96 pozzetti di una piastra da saggio in polistirene, con saturazione del fondo del pozzetto con l'anticorpo e lavaggio con una soluzione di fosfato salino (PBS), dopodiché sono stati aggiunti i campioni da esaminare. Contemporaneamente sono stati allestiti pozzetti di controllo in cui sono state distribuite soluzioni standard delle citochine a differenti concentrazioni.

Le piastre così preparate sono state incubate per 2 ore a 37°C; durante l' incubazione l'anticorpo si lega alla citochina presente nei sovranatanti. Le piastre sono state lavate con PBS per 2 volte per allontanare eventuali interferenze. Le piastre sono state trattate con un anticorpo policlonale specifico per la citochina, ed incubati a 37°C per 1 ora. Sono stati fatti nuovamente 3 lavaggi con PBS al fine di rimuovere l'eccesso di

anticorpo policlonale. Quindi è stato aggiunto il substrato costituito da tetrametilbenzidina (TMB) e acqua ossigenata (H_2O_2) per determinare lo sviluppo della reazione enzimatica colorata, che risulta direttamente proporzionale alla quantità di citochina presente. Infine è stato aggiunto H_2SO_4 6 N in modo da bloccare la reazione enzima-substrato, e le piastre sono state lette con un colorimetro per micropiastre a 450 nm. In base ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura, sono state ricavate le concentrazioni delle citochine presenti nei campioni, riferendosi alla curva standard calcolata per ciascun dosaggio.

7. Risultati

Dopo aver ottenuto l'approvazione del protocollo di ricerca, in data 14-11-2011 da parte del Comitato Etico per le Attività Biomediche "Carlo Romano", Università degli Studi di Napoli Federico II, sono stati arruolati e randomizzati fino a Gennaio 2014 20 pazienti di cui 10 di sesso femminile e 10 di sesso maschile. Dalla lista di randomizzazione si evince che 5 dei pazienti di sesso maschile sono entrati in trattamento con la PEA e 5 nel gruppo placebo. Per quanto concerne i pazienti di sesso femminile, 5 sono entrati nel gruppo trattato e 5 nel gruppo placebo. La durata media di malattia espressa in mesi è pari a 15 ± 8 . Nell'ambito delle caratteristiche cliniche al tempo iniziale T0 oppure al momento di inclusione, l'EDSS medio è pari a 3 ± 1.5 .

7.1. Analisi del quadro infiammatorio

Prima dell'arruolamento nello studio, i pazienti eseguivano da 6 mesi, il trattamento con interferone-beta-1a per verificarne la tollerabilità da parte del paziente.

Tutte le citochine oggetto di studio sono risultate dosabili nel siero dei pazienti e sono state espresse con la media \pm deviazione standard. Nel caso dell'INF- γ , abbiamo riscontrato una differenza statisticamente significativa nel gruppo trattato rispetto al gruppo placebo (Fig.9).

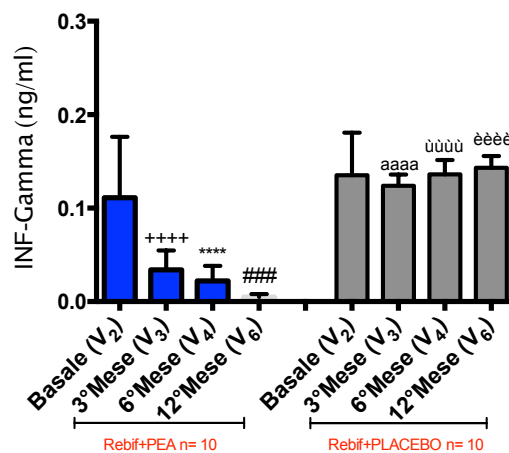


Fig.9. Livelli sierici dell'INF- γ in pazienti trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo

++++ p<0.0001 vs Basale PEA, **** p<0.0001 vs Basale PEA, ### p<0.001 vs Basale PEA,
 aaaa p<0.0001 vs 3°Mese PEA, ùùùù p<0.0001 vs 6°Mese PEA, èèèè p<0.0001 vs 12°Mese PEA.

Dal 3° mese di trattamento, i pazienti trattati con la PEA hanno mostrato una netta riduzione dei valori sierici della citochina effetto, che si è mantenuto anche al 6° mese e al 12° mese di trattamento rispetto al basale. Nel gruppo placebo, si osservava un' aumentato livello di INF- γ a tutti i tempi di osservazione. Analizzando in base al genere, nei pazienti di sesso maschile trattati, è stata evidenziata una marcata riduzione dell' INF- γ a tutti i tempi di osservazione; mentre i livelli di INF- γ nel gruppo placebo erano significativamente più elevati (Fig.10).

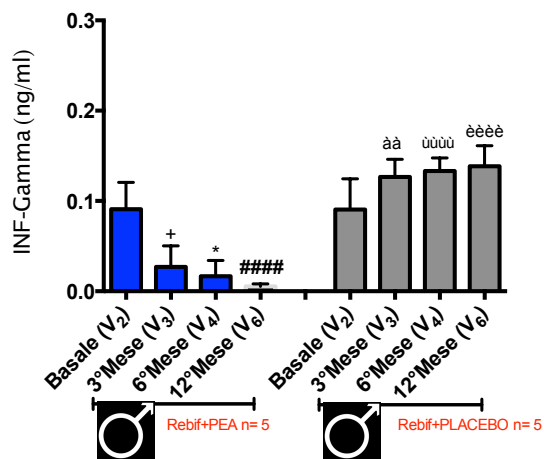


Fig.10. Livelli sierici dell'INF- γ in pazienti di sesso maschile trattati (Rebir44mg+PEA 600mg) vs placebo

+ p<0.05 vs Basale PEA, * p<0.05 vs Basale PEA, #### p<0.0001 vs Basale PEA,
aa p<0.01 vs 3° Mese PEA, uuuu p<0.0001 vs 6° Mese PEA, eeee p<0.0001 vs 12° Mese PEA.

Simile differenze sono state osservate nel gruppo di pazienti di sesso femminile (Fig.11).

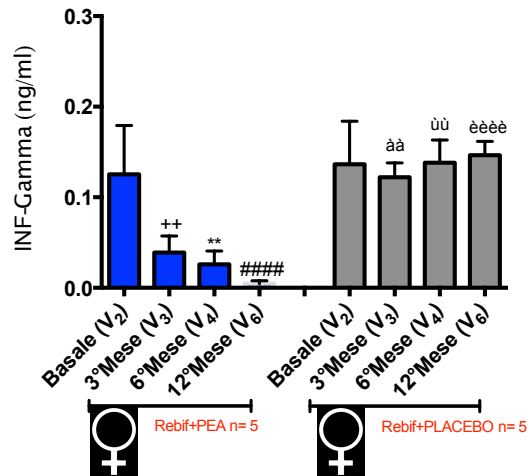


Fig.11. Livelli sierici dell'INF- γ in pazienti di sesso femminile trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo

++ p<0.01 vs Basale PEA, ** p<0.01 vs Basale PEA, #### p<0.0001 vs Basale PEA,
 aa p<0.01 vs 3° Mese PEA, uu p<0.0001 vs 6° Mese PEA, èèèè p<0.0001 vs 12° Mese PEA.

Per quanto concerne il TNF- α , abbiamo una significativa riduzione dei livelli sierici al 3°, 6° e 12° mese di trattamento rispetto al basale mentre nel gruppo placebo riscontriamo livelli di TNF- α significativamente elevati in particolare al 6° e 12° mese (Fig.12.).

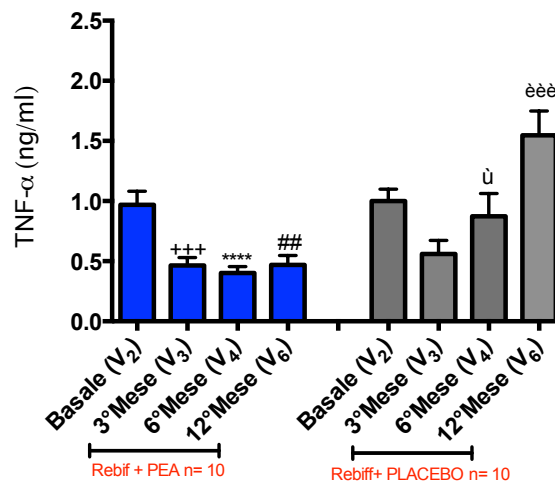
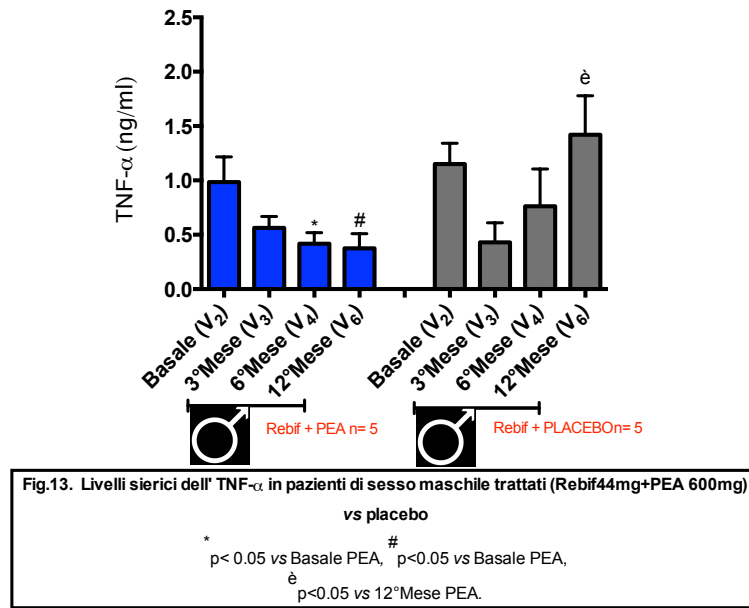


Fig.12. Livelli sierici dell' TNF- α in pazienti trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo

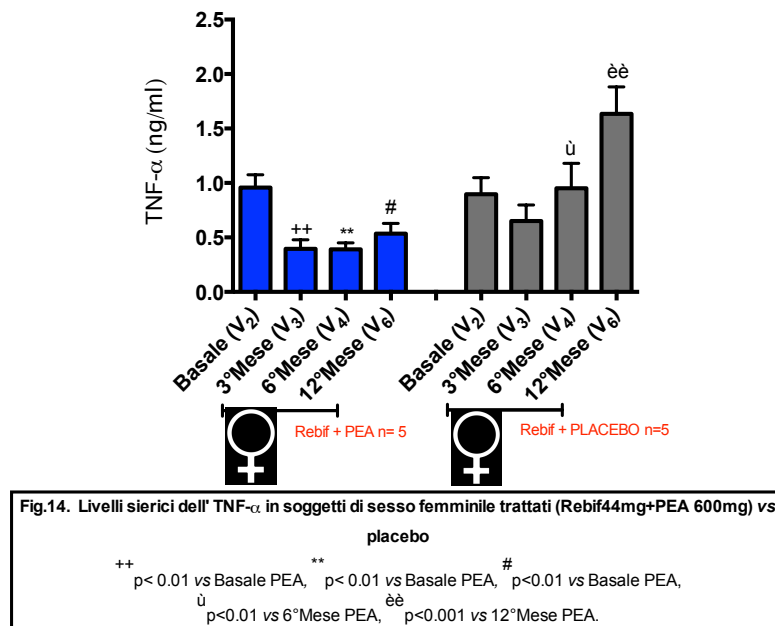
+++ p<0.001 vs Basale PEA, **** p<0.0001 vs Basale PEA, ## p<0.01 vs Basale PEA,
 u p<0.01 vs 6° Mese PEA, èèè p<0.001 vs 12° Mese PEA.

Analizzando per genere, riscontriamo nel gruppo dei pazienti trattati, di sesso maschile, una riduzione dell' espressione del TNF- α significativa al 6° e 12° mese di trattamento;

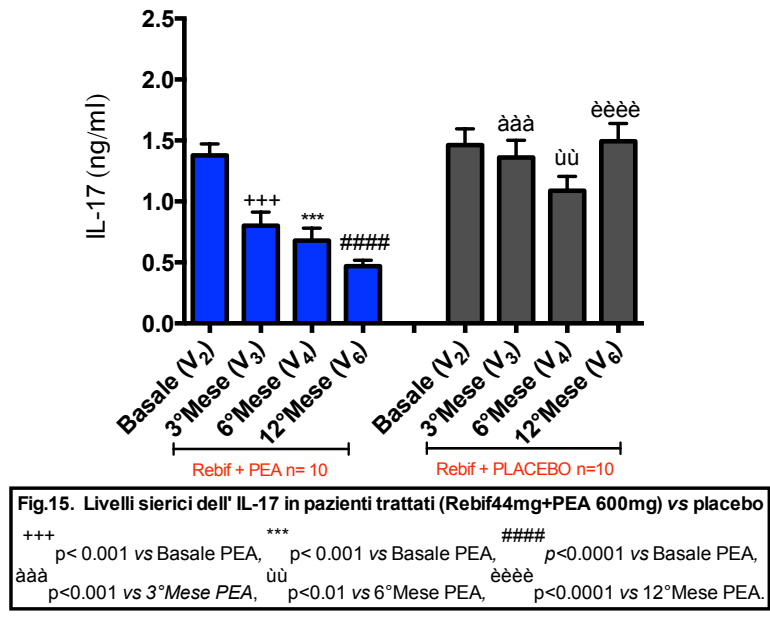
mentre nel rispettivo gruppo placebo, si osservava un chiaro trend di incremento del TNF- α , significativo solo al 12° mese di trattamento (Fig.13).



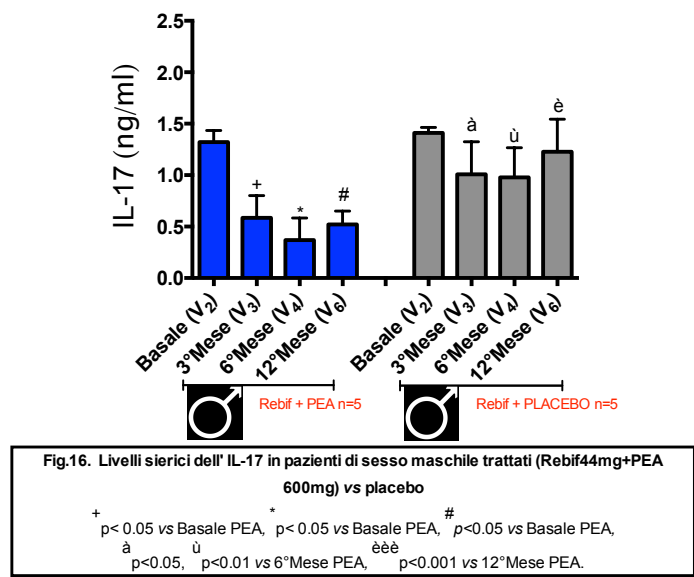
I pazienti sotto trattamento con PEA di sesso femminile hanno bassi livelli di TNF- α al 3°, 6°, e 12° mese di trattamento rispetto al basale. Mentre, nel placebo, si osserva un trend in aumento dei livelli di TNF- α significativi al 6° e 12° mese (Fig.14).

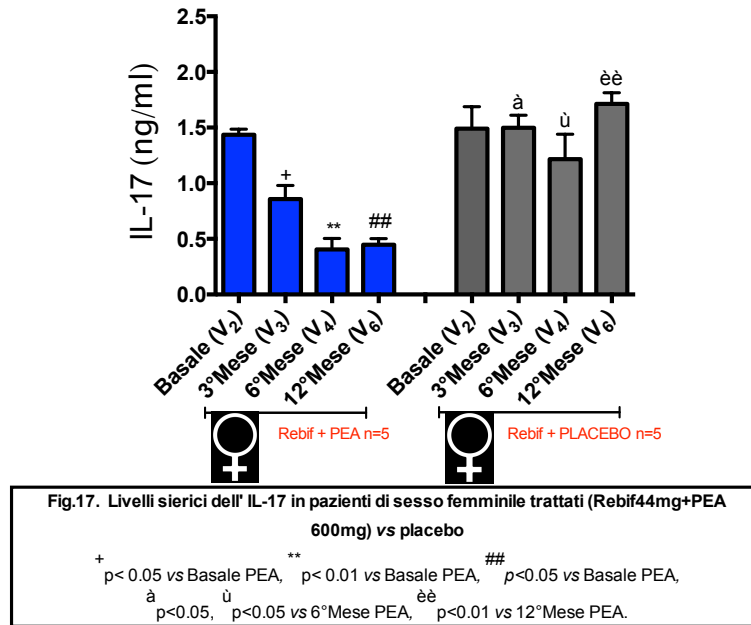


Anche la determinazione dei livelli dell' IL-17 ha seguito analogo profilo. I livelli sierici di IL-17 diminuivano in funzione del trattamento con la PEA mentre non si osservava alcuna riduzione dei livelli di IL-17 nei pazienti trattati con placebo (Fig.15).



In particolare, all'interno del gruppo trattato abbiamo osservato una differenza significativa al 3°, 6° e 12° mese di trattamento, con una ridotta espressione dell' IL-17 rispetto al basale. L'analisi dei dati in base alla divisione per genere ha evidenziato che i pazienti di sesso maschile trattati, hanno mostrato una ridotta espressione dell'IL-17 al 3°, 6° e 12° mese rispetto al basale (Fig.16). Nei pazienti di sesso femminile trattati, sono state evidenziate analoghe differenze statisticamente significative. (Fig.17).

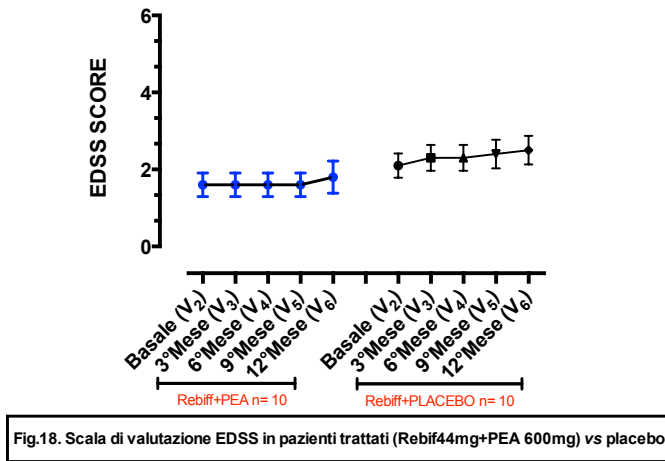




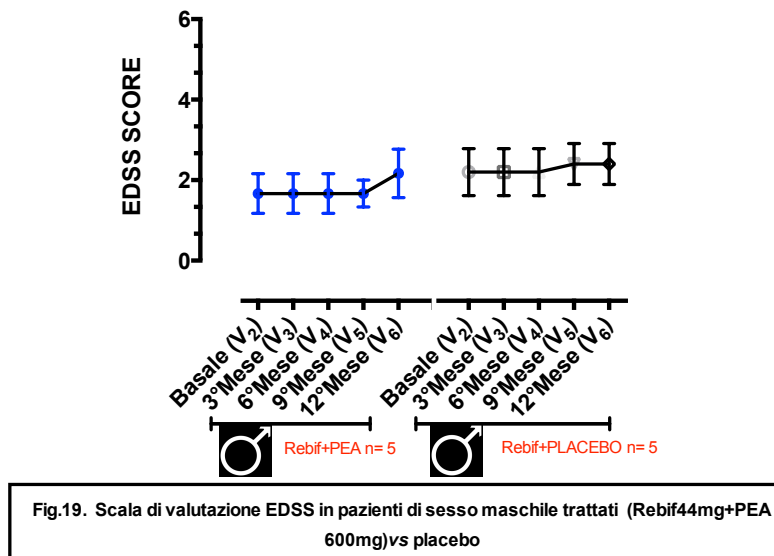
7.2 Valutazione della disabilità motoria mediante la scala EDSS (Expanded Disability Status Scale)

L' Expanded Disability Status Scale (EDSS) è una scala che ha lo scopo di valutare i livelli di disabilità delle persone con MS; va da 0, corrispondente a un esame neurologico normale, a 10, morte MS. Il punteggio si ottiene sommando i punteggi parziali dei diversi sistemi funzionali legati all'attività del sistema nervoso (piramidale, cerebellare, sfinterica, eccetera).

L'EDSS è largamente utilizzato in tutti i centri MS, dato che consente una più agevole valutazione dell'evoluzione della malattia e permette inoltre di verificare l'efficacia della terapia in atto. Nell' ambito del suddetto progetto di ricerca, la progressione della disabilità motoria è rimasta pressoché costante, senza variazione statisticamente significative, sia nel gruppo trattato che nel gruppo placebo (Fig.18.).



Suddividendo i due gruppi nei pazienti di sesso maschile (Fig.19) e in quelli di sesso femminile (Fig.20) abbiamo riscontrato che la progressione della disabilità non è variata sia rispetto all'inizio del trattamento sia rispetto ai gruppi placebo.



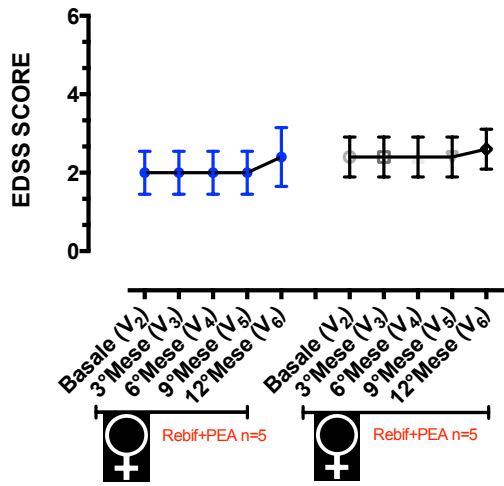


Fig.20. Scala di valutazione EDSS in pazienti di sesso femminile trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo

7.3. Valutazione del dolore mediante la scala VAS (Scala visiva analogica)

La scala è una retta di 10 cm con due estremità che corrispondono a “nessun dolore” e il “massimo possibile” (ovvero il massimo di cui si ha avuto esperienza). E’ uno strumento unidimensionale che quantifica ciò che il paziente soggettivamente percepisce come dolore oppure come sollievo nel complesso delle loro variabili fisiche, psicologiche e spirituali senza distinguere quali di queste componenti abbia ruolo maggiore. I risultati ottenuti confermano che il trattamento con la PEA riduca in maniera fortemente significativa la percezione del dolore nei pazienti trattati con PEA rispetto all’inizio del trattamento e rispetto al gruppo placebo (Fig.21).

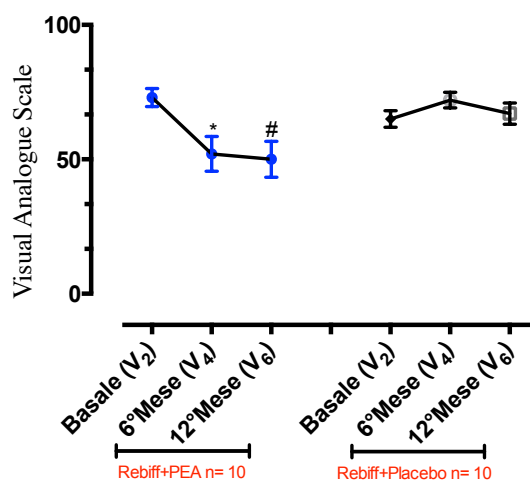


Fig.21. Scala di valutazione VAS in pazienti trattati (Rebiff44mg+PEA 600mg) vs placebo

* $p < 0.05$ vs Basale PEA, # $p < 0.05$ vs Basale PEA,

Scomponendo in due gruppi, in base al genere, si evince che i pazienti di sesso maschile hanno ottenuto significativo beneficio in termini di riduzione del dolore, (in particolare agli arti inferiori) rispetto al corrispettivo gruppo placebo. Mentre nei pazienti di sesso femminile, pur osservando un forte trend di riduzione del dolore, per l’esiguità del numero di pazienti non è stata osservata nessuna variazione significativa (Fig.22), (Fig.23)

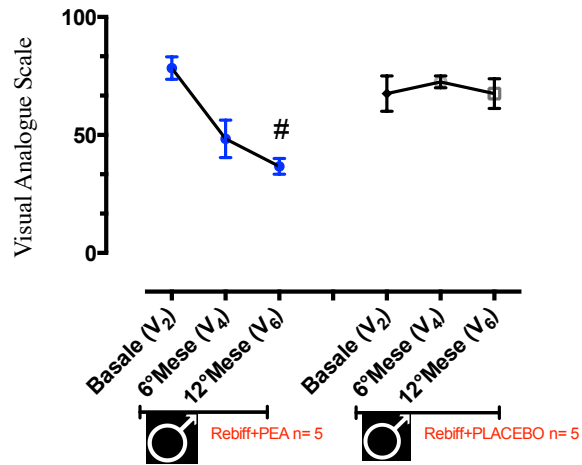


Fig.22. Scala di valutazione VAS in pazienti di sesso maschile trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo

p<0.05 vs Basale PEA,

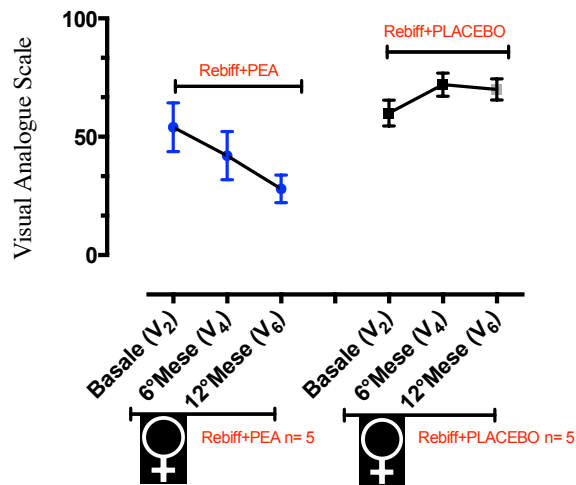


Fig.23. Scala di valutazione VAS in pazienti di sesso femminile trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo

7.4 Livelli plasmatici degli endocannabinoidi

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni plasmatici, prelevati durante l'arruolamento (Visita 2) a pazienti già in terapia con Rebif da sei mesi, hanno evidenziato un significativo aumento delle tre principali aciletanolamidi (PEA, AEA e OEA) rispetto al gruppo controllo. (Fig.24,25,26).

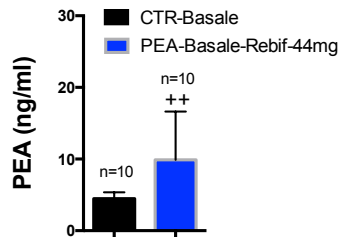


Fig.24. Livelli plasmatici di PEA in pazienti con MS al basale vs gruppo di controllo
++
 $p < 0.01$ vs CTR-Basale

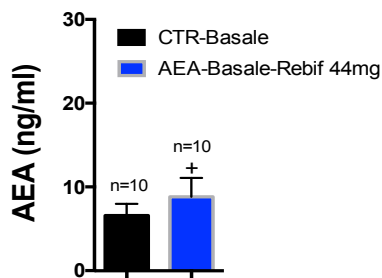


Fig.25. Livelli plasmatici di AEA in pazienti con MS al basale vs gruppo di controllo
+
 $p < 0.05$ vs CTR Basale

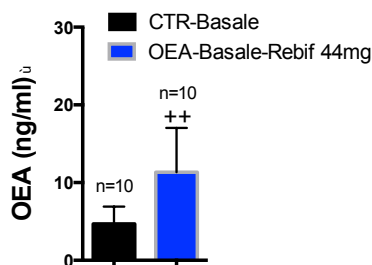


Fig.26. Livelli plasmatici di OEA in pazienti con MS al basale vs gruppo di controllo
++
 $p < 0.01$ vs CTR Basale

La somministrazione orale della PEA ha portato ad un aumento dei livelli plasmatici endogeni della PEA stessa durante il 3°, 6° 9° e 12° mese di trattamento rispetto al tempo basale. Nel gruppo placebo non si riscontrano variazioni dei livelli endogeni della PEA (Fig.27)

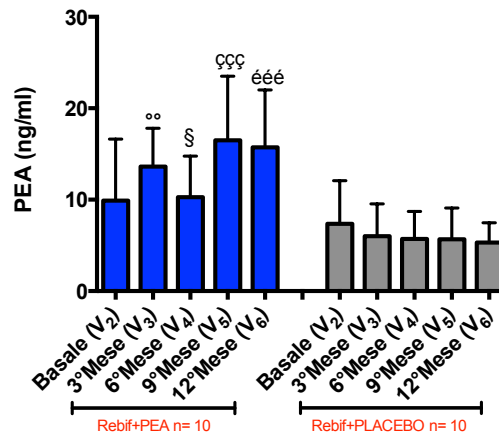


Fig.27. Livelli plasmatici di PEA in pazienti trattati (Rebif44mg+ PEA 600mg) vs placebo
^{°°} $p < 0.01$ vs 3° Mese PLACEBO, [§] $p < 0.05$ vs 6° Mese PLACEBO, ^{¶¶¶} $p < 0.001$ vs 9° Mese PLACEBO, ^{ééé} $p < 0.001$ vs 12° Mese PLACEBO

Analizzando i risultati in rapporto al genere, non ci sono significative differenze tra genere in quanto l'aumento della PEA è dello stesso livello sia nei maschi che nelle femmine. (Fig.28) (Fig.29).

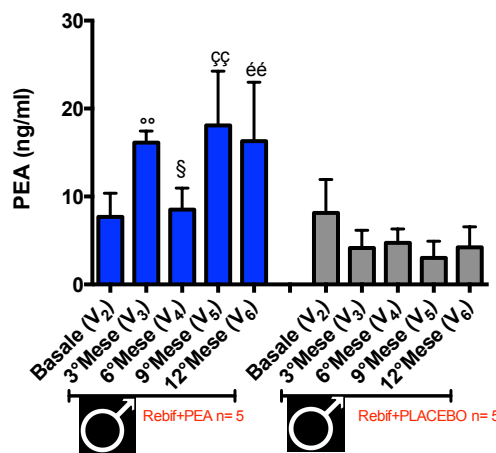
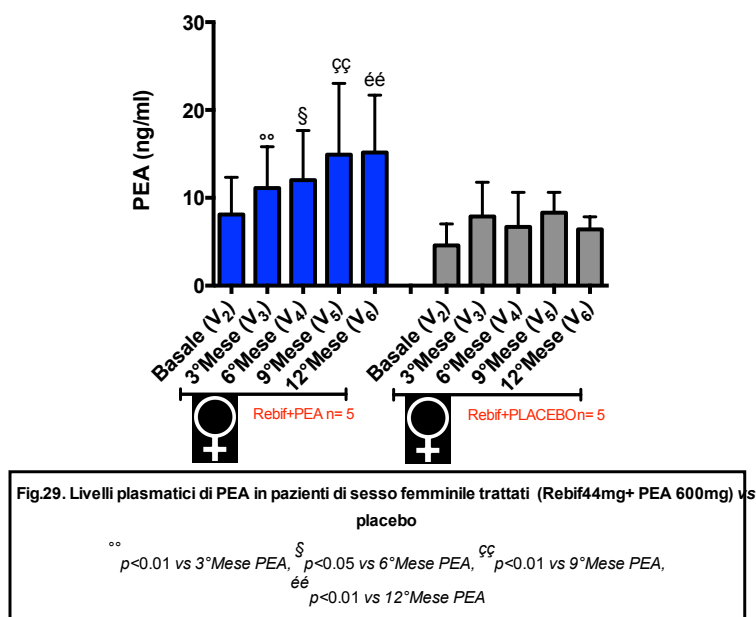
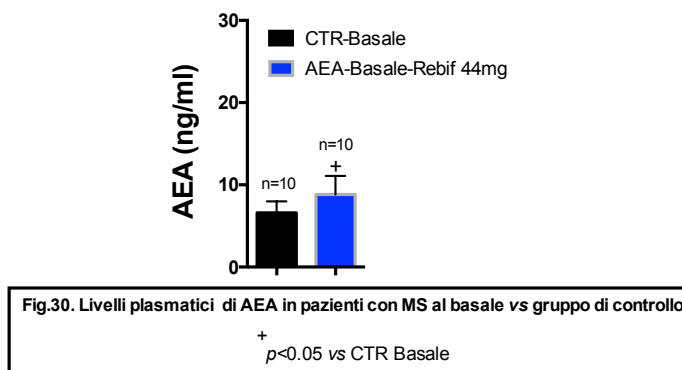


Fig.28. Livelli plasmatici di PEA in pazienti di sesso maschile trattati (Rebif44mg+ PEA 600mg) vs placebo
^{°°} $p < 0.01$ vs 3° Mese PLACEBO, [§] $p < 0.05$ vs 6° Mese PLACEBO, ^{¶¶} $p < 0.01$ vs 9° Mese PLACEBO, ^{éé} $p < 0.01$ vs 12° Mese PLACEBO



In merito all'AEA, abbiamo evidenziato livelli endogeni lievemente più alti ma significativi alla visita 2 quando erano solo sotto trattamento con Rebif rispetto al controllo (Fig.30).



Durante il trattamento con la PEA si è potuto osservare un significativo aumento dei livelli plasmatici di AEA, sia al 3°, 6°, 9° e 12° mese di trattamento (Fig.31).

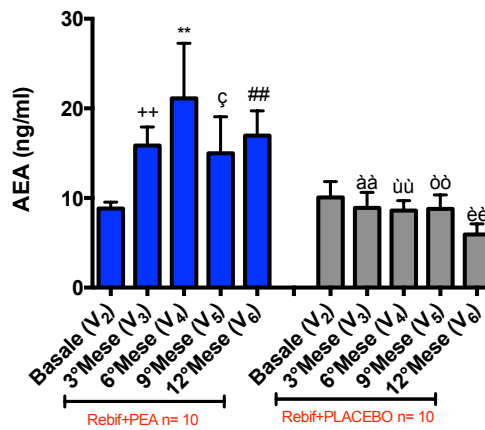


Fig.31. Livelli plasmatici di AEA in pazienti trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo
 ++ $p < 0.01$ vs Basale PEA, ** $p < 0.01$ vs Basale PEA, ç $p < 0.01$ vs Basale PEA, ## $p < 0.01$ vs Basale PEA,
 àà $p < 0.01$ vs 3° Mese PEA, ùù $p < 0.05$ vs 6° Mese PEA, òò $p < 0.001$ vs 9° Mese PEA,
 èè $p < 0.001$ vs 12° Mese PEA

Il gruppo placebo, mostrava livelli endogeni di AEA poco variabili durante i 12 mesi di trattamento.

I pazienti di sesso maschile trattati, hanno mostrato, rispetto al basale, un aumento significativo dei livelli endogeni di AEA nel 3°, 6°, 9° e 12° mese di trattamento (Fig.32).

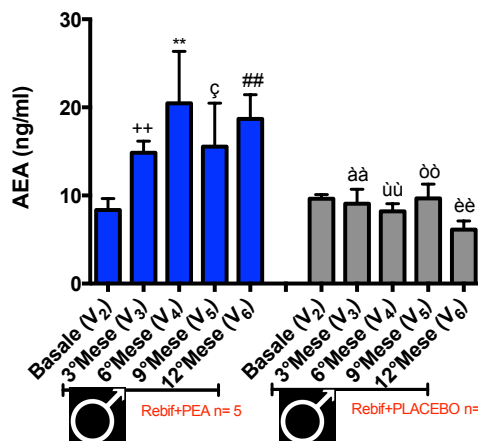
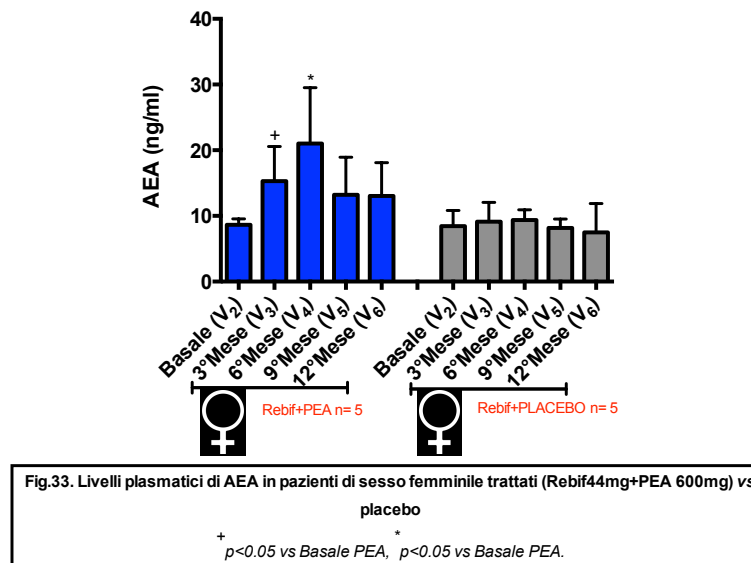


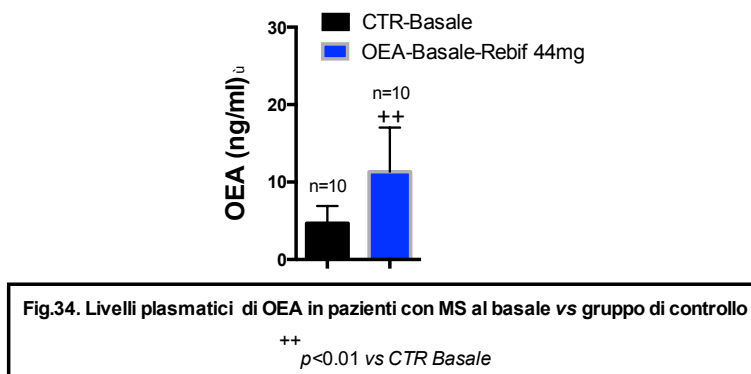
Fig.32. Livelli plasmatici di AEA in pazienti di sesso maschile trattati (Rebif44mg+PEA 600mg) vs placebo
 ++ $p < 0.01$ vs Basale PEA, ** $p < 0.01$ vs Basale PEA, ç $p < 0.01$ vs Basale PEA,
 ## $p < 0.01$ vs Basale PEA, àà $p < 0.01$ vs 3° Mese PEA, ùù $p < 0.05$ vs 6° Mese PEA,
 òò $p < 0.001$ vs 9° Mese PEA, èè $p < 0.001$ vs 12° Mese PEA

Differenze significative sono risultate dalla comparazione con il rispettivo gruppo placebo. Nei pazienti di sesso femminile, alti livelli endogeni di AEA sono risultati significativi al 3° e 6° mese di trattamento con PEA rispetto al basale (Fig.33), nessuna differenza è stata rinvenuta dalla comparazione con il rispettivo gruppo placebo che ha

mostrato, comunque, una riduzione dei livelli endogeni plasmatici di questa aciletanolamide rispetto al gruppo trattato.



Infine, anche per livelli endogeni dell'OEA si evidenziava una differenza statisticamente significativa alla visita 2 tra il gruppo di pazienti trattati con Rebif, rispetto al gruppo di controllo (Fig.34).



Dopo 12 mesi di trattamento con PEA, i livelli endogeni di OEA sono risultati significativamente aumentati rispetto al gruppo placebo. (Fig.35).

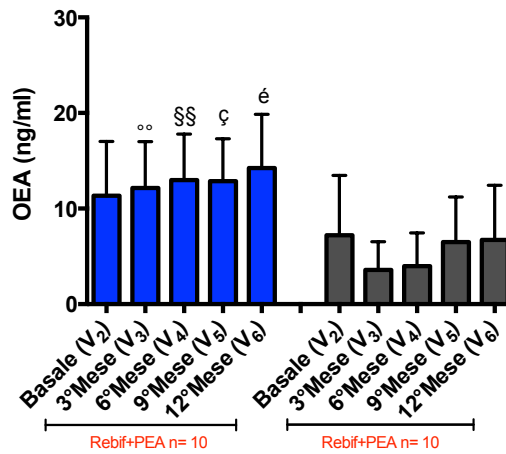


Fig.35. Livelli plasmatici di OEA in pazienti trattati (Rebif44mg+ PEA 600mg)vs placebo a
^{°°} $p<0.01$ vs 3°Mese PLACEBO, ^{§§} $p<0.01$ vs 6°Mese PLACEBO, ^ζ $p<0.05$ vs 9°Mese PLACEBO,
^é $p<0.05$ vs 12°Mese PLACEBO

Analizzando invece le variazioni dei livelli plasmatici di OEA in rapporto al genere, abbiamo riscontrato che all'interno del gruppo di sesso maschile i livelli endogeni di OEA, sono significativamente elevati rispetto al gruppo placebo agli stessi tempi di trattamento (Fig.36).

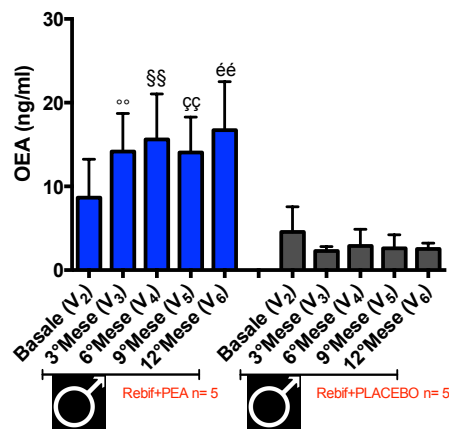
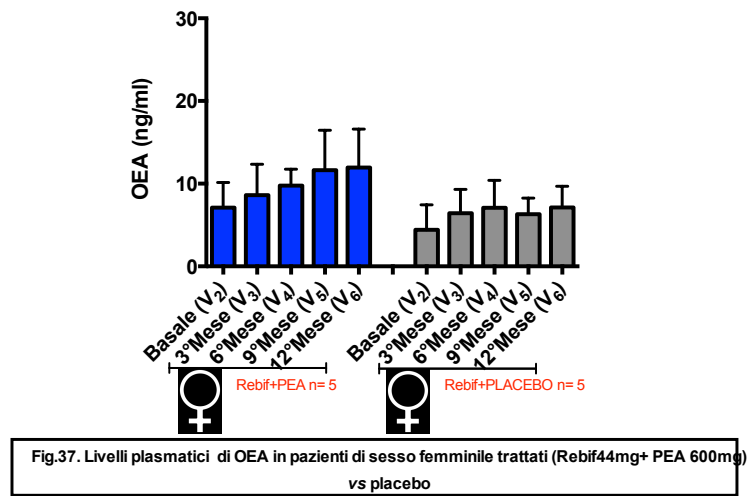


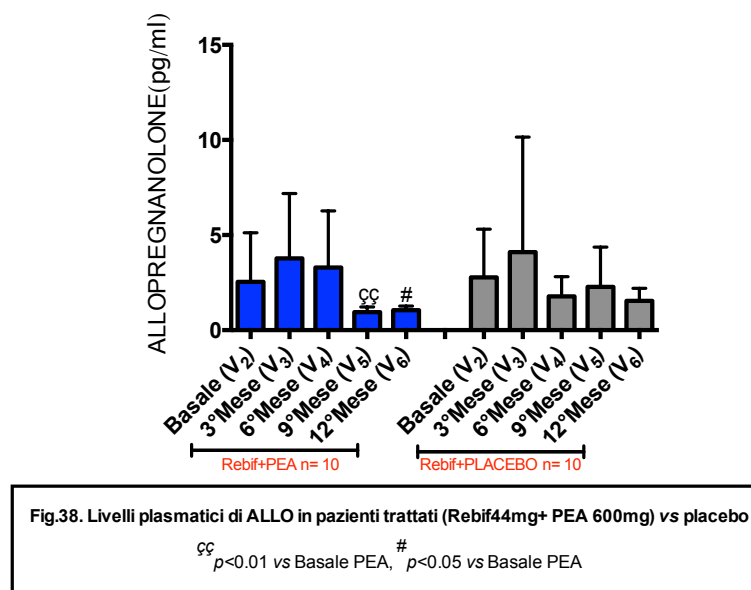
Fig.36. Livelli plasmatici di OEA in pazienti di sesso maschile trattati (Rebif44mg+ PEA 600mg) vs placebo
^{°°} $p<0.01$ vs 3°Mese PLACEBO, ^{§§} $p<0.01$ vs 6°Mese PLACEBO, ^{ζζ} $p<0.05$ vs 9°Mese PLACEBO,
^{éé} $p<0.05$ vs 12°Mese PLACEBO

La somministrazione orale della PEA, invece, all' interno del gruppo di sesso femminile non ha portato ad un aumento significativo dei suoi livelli endogeni. (Fig.37)



7.5. Livelli plasmatici dell' allopregnanolone (ALLO)

Nel caso di questo neurosteroido, abbiamo riscontrato una riduzione, statisticamente significativa ($p < 0.05$), dei suoi livelli plasmatici nel gruppo trattato con PEA al 9° e 12° mese di terapia rispetto al basale. Dalla comparazione tra il gruppo trattato con PEA e il placebo non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa dei livelli plasmatici di ALLO (Fig.38).



Nella scomposizione del gruppo trattato con PEA, nei pazienti di sesso maschile (Fig.39), rispetto al basale, abbiamo riscontrato un' aumento significativo dei livelli plasmatici del neurosteroido solo al 3° mese di trattamento. Nessuna variazione significativa dei livelli plasmatici dell'ALLO è stata riscontrata nei pazienti trattati con PEA femminili rispetto al basale; dalla comparazione con il rispettivo gruppo placebo è stata rinvenuta una riduzione dell'ALLO nel 3° mese di trattamento (Fig.40).

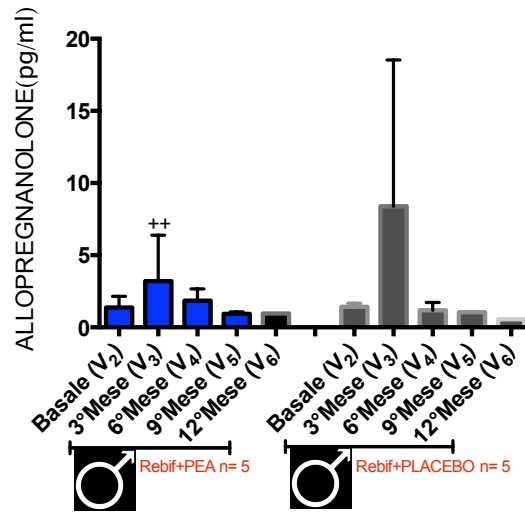


Fig.39. Livelli plasmatici di ALLO in pazienti di sesso maschile trattati (Rebif44mg+ PEA 600mg) vs placebo
 ++
 $p < 0.01$ vs Basale PEA

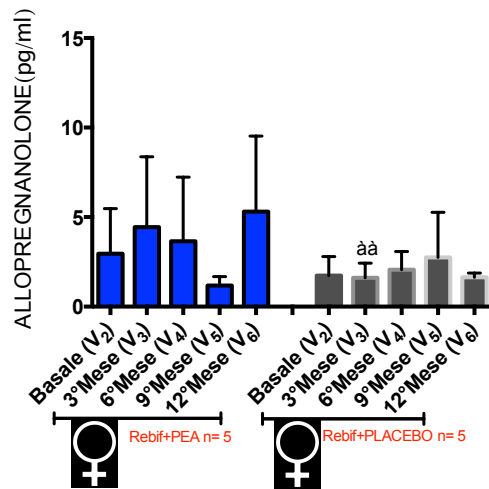


Fig.40. Livelli plasmatici di ALLO in pazienti di sesso femminile trattati (Rebif44mg+ PEA 600mg) vs placebo
 àà
 $p < 0.01$ vs 3° Mese PEA

7. Conclusioni

La capacità della PEA di modulare le risposte protettive messe in atto dall'organismo in condizioni d'infiammazione ha portato a sviluppare l'ipotesi secondo cui la PEA endogena farebbe parte di un complesso sistema omeostatico, preposto al controllo della soglia basale dell'infiammazione. I dati che più fortemente depongono a favore dell'ipotesi di un sistema endogeno di controllo della soglia basale dell'infiammazione e di neuroprotezione mediato dalla PEA, sono quelli che emergono dal quadro infiammatorio delle citochine e degli endocannabinoidi.

Per quanto ulteriori studi siano necessari per comprendere il meccanismo fisiologico operato dalla PEA, di sicuro essa gioca un ruolo fondamentale nel controllare il meccanismo dell'infiammazione. Come ormai più volte confermato, la PEA viene sintetizzata e rilasciata in seguito a stimoli lesivi. Sulla base di questi risultati, si è ipotizzato che la produzione cellulare di PEA in seguito alla risposta infiammatoria possieda un importante significato protettivo. L'orientamento terapeutico attuale nella MS è quello di utilizzare approcci "disease-oriented", che vadano, cioè, ad incidere sui meccanismi alla base della neuropatologia; poter disporre di sostanze preposte per natura al controllo dei meccanismi di difesa endogeni assume una straordinaria importanza. In questo senso l'acronimo ALIA, inteso come Autacoid Local Injury Antagonism, è quello che meglio descrive l'effetto della PEA. La sua natura autacoide ("Autacoid" deriva dalle parole greche "autos" [auto] e "akos" [rimedio]), la capacità di agire localmente, e l'attività di protezione rispetto al danno infiammatorio rappresentano i tre presupposti alla base di altrettanti vantaggi terapeutici.

In primo luogo, l'assenza di effetti collaterali durante tutto il corso di trattamento. In secondo luogo, la duplicità dell'effetto, sia di tipo antinfiammatorio che di tipo antinocicettivo. Il presente è uno studio che ha prodotto evidenze tese a confermare l'efficacia della PEA nella modulazione dell'infiammazione e del dolore in una coorte di pazienti affetti da MS-RR. In particolare, abbiamo messo in luce come la PEA espleti un effetto antiinfiammatorio, riducendo la concentrazione delle citochine proinfiammatorie INF- γ , TNF- α e IL-17. I risultati ottenuti indicano somministrazione di PEA, a pazienti in terapia con Rebif, ha ridotto, in maniera significativa, la sintomatologia dolorosa associata alla patologia della MS attraverso la modulazione dei

più importanti parametri del processo infiammatorio implicati nella progressione della patologia . La riduzione di questi parametri ci lascia presagire che in studi più nutriti e prolungati nel tempo, queste precoci osservazioni possano trovare una significativa conferma dell'efficace associazione.

Inoltre, questo studio ha dimostrato che nella MS, il sistema degli EC è coinvolto nel processo neurodegenerativo. Infatti, analizzando i livelli plasmatici di differenti endocannabinoidi (PEA, AEA e OEA), si è riscontrato un aumento di quest' ultimi rispetto al gruppo controllo segno, del tentativo dell' organismo di ridurre lo stato infiammatorio . Nonostante l'effetto antiinfiammatorio della PEA, la progressione della disabilità motoria, valutata attraverso la scala EDSS, non ha subito nessuna variazione rispetto all'ingresso in trattamento. Mentre, il significativo miglioramento della percezione del dolore, valutata attraverso la scala di valutazione VAS, riconferma l'efficacia di questa molecola nel controllo del dolore che è uno dei principali segni che si accompagnano alla evoluzione della MS. In questo studio è emersa una maggiore sensibilità delle donne a sviluppare una patologia più refrattaria ai trattamenti farmacologici. Infatti, l'andamento del quadro infiammatorio e dei livelli endogeni plasmatici degli endocannabinoidi è sensibilmente a favore nei pazienti trattati di sesso maschile. Tuttavia, l'introduzione della PEA alla terapia immunomodulante per il trattamento di questa forma clinica di MS, ha portato a risultati incoraggianti nel trattamento del processo neurodegenerativo. Anche se non tutti i parametri clinici hanno presentato un significativo miglioramento legato alla esigua numerosità campionaria sebbene sia sempre evidenziabile un trend positivo nei trattamenti, il trattamento con la PEA ha portato ad una riduzione dei principali markers del processo infiammatorio che sostengono lo sviluppo della patologia nel tempo. Pertanto, la PEA si propone come possibile strumento terapeutico atto a ridurre segni importanti nella qualità della vita dei pazienti affetti da MS e probabilmente nel limitarne o rallentarne l'evoluzione.

Bibliografia

A. Balboa RC, Pinna G, Zhubi A, Maloku E, Veldic M, Costa E, Guidotti A. Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 14602– 14607.

Abadji V., Lucas-Lenard JM., Chin C., Kendall DA. (1999). Involvement of the carboxyl terminus of the third intracellular loop of the cannabinoid CB1 receptor in constitutive activation of Gs. *J Neurochem* 72: 2032-2038.

Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R. A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions*. 1993;39 Spec No:C145-7.

Amery A, (1998) The effect of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol* 58:315-348.

Assini A., Iaricchia D., Pizzo R., Belletti M., Pandolfini L., Frenzo C., Parodi C.I., Ratto Ss. Miglioramento clinico ed elettrofisiologico dopo trattamento con palmitoiletanolamide SSC di Neurofisiopatologia, E.O. Ospedali Galliera, Genova. Abstract .

Akk G, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. Mechanisms of neurosteroid interactions with GABA(A) receptors. *Pharmacol Ther* 2007; 116: 35–57.

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

Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2003; 2: 291–8.

Bakshi R, Benedict RH, Bermel RA, Caruthers SD, Puli SR, Tjoa CW, et al. T2 hypointensity in the deep gray matter of patients with multiple sclerosis: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol* 2002; 59: 62–8.

Benani A, Heurtaux T, Netter P, Minn A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in rat spinal cord after peripheral noxious stimulation. *Neurosci Lett*. 2004 Oct 7;369(1):59-63.

Benito C, Romero JP, Tolón RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2007 Feb 28;27(9):2396-402.

Breivogel C.S., Griffin G., Di Marzo V., Martin B.K. (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol.* 60(1): 155-63.

Bermel RA, Innus MD, Tjoa CW, Bakshi R. Selective caudate atrophy in multiple sclerosis: a 3D MRI parcellation study. *Neuroreport* 2003; 14: 335–9.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35. Review. PubMed PMID: 11818483.

Berdyshev EV, Schmid PC, Dong Z, Schmid HH. Stress-induced generation of N-acylethanolamines in mouse epidermal JB6 P+ cells. *Biochem J.* 2000 Mar 1;346 Pt 2:369-74. PubMed PMID: 10677355; PubMed Central PMCID: PMC1220862.

Bisogno T, Katayama K, Melck D, Ueda N, De Petrocellis L, Yamamoto S, Di Marzo V. Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells--implications for cell proliferation and differentiation. *Eur J Biochem.* 1998 Jun 15;254(3):634-42.

Bracey, M.H., Hanson, M.A., Masuda, K.R., Stevens, R.C. & Cravatt, B.F. (2002). Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*, 298, 1793-6.

Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci.* 1996 Jun 15;16(12):3934-42. PubMed PMID: 8656287

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

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 1998 Jul 16;394(6690):277-81. PubMed PMID: 9685157.

Calignano A, La Rana G, Piomelli D. Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* 2001 May 11;419(2-3):191-8. PubMed PMID: 11426841.

Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:455-80. Review. PubMed PMID: 15473848.

Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Bernardi G, Bernardini S, Martino G, Maccarrone M. The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2007 Oct;130(Pt 10):2543-53. Epub 2007 Jul 11. PubMed PMID: 17626034.

Chevalyre V, Takahashi KA, Castello PE. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 37–76.

Cobellis L, Castaldi MA, Giordano V, Trabucco E, De Franciscis P, Torella M, Colacurci N. Effectiveness of the association micronized N-Palmitoylethanolamine (PEA)-transpolydatin in the treatment of chronic pelvic pain related to endometriosis after laparoscopic assessment: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Sep;158(1):82-6. doi: 10.1016/j.ejogrb.2011.04.011. Epub 2011 May 23.

Coburn AF, Graham CE, Haninger J. The effect of egg yolk in diets on anaphylactic arthritis (passive Arthus phenomenon) in the guinea pig. *J Exp Med.* 1954 Nov 1;100(5):425-35.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol.* 2002 Jan;135(1):181-7. PubMed PMID: 11786493; PubMed Central PMCID: PMC1573125.

Cook KF, Bamer AM, Roddey TS, Kraft GH, Kim J, Amtmann D. Multiple sclerosis and fatigue: understanding the patient's needs. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2013 Nov;24(4):653-61. doi: 10.1016/j.pmr.2013.06.006. Epub 2013 Sep 3. PubMed PMID: 24314683; PubMed Central PMCID:

Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of

neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 2008 Oct 31;139(3):541-50. doi: 10.1016/j.pain.2008.06.003. Epub 2008 Jul 3. PubMed PMID: 18602217.

Costa B, Conti S, Giagnoni G, Colleoni M. Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclooxygenase systems. *Br J Pharmacol*. 2002 Oct;137(4):413-20.

Costa B, Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G. The endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, has anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects in a murine model of neuropathic pain: involvement of CB(1), TRPV1 and PPARgamma receptors and neurotrophic factors. *Pain*. 2008 Oct 31;139(3):541-50. doi: 10.1016/j.pain.2008.06.003. Epub 2008 Jul 3.

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. Acute intracerebroventricular administration of palmitoylethanolamide, an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist, modulates carrageenan-induced paw edema in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Sep;322(3):1137-43. Epub 2007 Jun 12.

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. Central administration of palmitoylethanolamide reduces hyperalgesia in mice via inhibition of NF-kappaB nuclear signalling in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jun 24;613(1-3):54-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.04.022. Epub 2009 Apr 20. PubMed PMID: 19386271.

D'Agostino G, Russo R, Avagliano C, Cristiano C, Meli R, Calignano A. Palmitoylethanolamide protects against the amyloid- β 25-35-induced learning and memory impairment in mice, an experimental model of Alzheimer disease. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37:1784-1792.

Darmani NA, Izzo AA, Degenhardt B, Valenti M, Scaglione G, Capasso R, Sorrentini I, Di Marzo V. Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoyl-ethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: review of the available pre-clinical data, and first human studies. *Neuropharmacology*. 2005 Jun;48(8):1154-63. Review. PubMed PMID: 15910891.

De Filippis D, Russo A, De Stefano D, Cipriano M, Esposito D, Grassia G, Carnuccio R, Russo G, Iuvone T. Palmitoylethanolamide inhibits rMCP-5 expression by regulating MITF activation

in rat chronic granulomatous inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2014 Feb 15;725:64-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.12.021. Epub 2014 Jan 16. PubMed PMID: 24440533.

De Filippis D, Luongo L, Cipriano M, Palazzo E, Cinelli MP, de Novellis V, Maione S, Iuvone T. Palmitoylethanolamide reduces granuloma-induced hyperalgesia by modulation of mast cell activation in rats. *Mol Pain.* 2011 Jan 10;7:3. doi: 10.1186/1744-8069-7-3. PubMed PMID: 21219627; PubMed Central PMCID: PMC3034677.

Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol.* 2001 Jun;169(3):453-9. Review. PubMed PMID: 11375115.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999 Oct;20(5):649-88. Review.

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34(5):605-613,1988.

Devchand PR, Hihi AK, Perroud M, Schleuning WD, Spiegelman BM, Wahli W. Chemical probes that differentially modulate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and BLTR, nuclear and cell surface receptors for leukotriene B(4). *J Biol Chem.* 1999 Aug 13;274(33):23341-8. PubMed PMID: 10438511.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J.* 1996 Jun 15;316 (Pt 3):977-84. PubMed PMID: 8670178; PubMed Central PMCID: PMC1217444.

Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. "Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action". *Trends Neurosci* 1998;; 21:521-528

Esposito E, D. Impellizzeri, E. Mazzon, I. Paterniti, and S. Cuzzocrea, "Neuroprotective activities of Palmitoylethanolamide in an animal model of parkinson's disease," *PLoS ONE*, vol. 7, 2012.).

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, et al. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* 2006; 49: 67–79.

Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM and Matsuda LA (1992) Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol* 42:838–845.

Fezza, F., De Simone, C., Amadio, D. & Maccarrone, M. (2008). Fatty Acid Amide Hydrolase: A Gate-Keeper of the Endocannabinoid System. *Subcell Biochem*, 49, 101-132.

Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome-activated receptors α and β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4312–4317.

Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci*. 2003 Aug 27;23(21):7767-75.

Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1- tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc*. 93(1):217-224,1971.

Gerard, C., Mollereau, C., Vassart, G. & Parmentier, M. (1990) Nucleotide sequence of a human cannabinoid receptor cDNA. *Nucl. Acids Res.*, IV, 7142±7148.

Giunti D, Borsellino G, Benelli R, Marchese M, Capello E, Valle MT, Pedemonte E, Noonan D, Albin A, Bernardi G, Mancardi GL, Battistini L, Uccelli A. Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol*. 2003 May;73(5):584-90

Grundy RI, Rabuffetti M, Beltramo M. Cannabinoids and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 2001; 24: 29–51.

Guida G, De Fabiani A, Lanaia F, Alexandre A, Vassallo G.M, Cantieri L, De Martino M, Rogai M, Petrosino S; La palmitoiletanolamida en el dolor neuropatico cronico por lumbociatalgia de tipo compresivo: estudio clinico multicentrico. *Dolor* 2010, 25:35-42

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci*. 1991 Feb;11(2):563-83.

Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB. "Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion". *J Neurochem* 1997;; 69:631–638.

Howlett, A.C., Song, C., Berglund, B.A., Wilken, G.H. & Pigg, J.J. (1998) Characterization of C1 cannabinoid receptors using receptor peptide fragmentsandsite-directedantibodies.*Mol.Pharmacol.*,SQ,504±510.

Howlett AC (2004) Efficacy in CB1 receptor-mediated signal transduction. *Br J Pharmacol* 142: 1209-1218.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202

Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, and Porrino LJ (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47

Jean-Gilles L, Feng S, Tench CR, Chapman V, Kendall DA, Barrett DA, Constantinescu CS. Plasma endocannabinoid levels in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2009 Dec 15;287(1-2):212-5. doi: 10.1016/j.jns.2009.07.021. Epub 2009 Aug 20. PubMed PMID: 19695579.

Jaggar SI, Sellaturay S, Rice AS. The endogenous cannabinoid anandamide, but not the CB2 ligand palmitoylethanolamide, prevents the viscerovisceral hyper-reflexia associated with inflammation of the rat urinary bladder. *Neurosci Lett.* 1998 Sep 4;253(2):123-6. PubMed PMID: 9774165.

Jensen J, Langkilde AR, Fenst C, Nicolaisen MS, Roed HG, Christiansen M, Sellebjerg F. CD4 T cell activation and disease activity at onset of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2004 Apr;149(1-2):202-9.

Klein T.W., Newton C., Friedman H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol. today.* 1998;19:373

Kliwer, S.A., Forman, B.M., Blumberg, B., Ong, E.S., Borgmeyer, U., Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994). Differential expression and activation of a family of

murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7355–7359.

Kostadinova R, Wahli W, and Michalik L (2005) PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem* 12:2995–3009.

Lauckner J. E., Jensen J. B., Chen H. Y., Lu H. C., Hille B., Mackie K. (2008). GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 2699–2704.

Lo Monte G, Soave I, Marci R. Administration of micronized palmitoylethanolamide (PEA)-transpolydatin in the treatment of chronic pelvic pain in women affected by endometriosis: preliminary results. *Minerva Ginecol.* 2013 Aug;65(4): 453-63

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol.* 2005 Jan;67(1):15-9. Epub 2004 Oct 1. PubMed PMID: 15465922.

Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000 Jun;47(6):707-17. PubMed PMID: 10852536.

Mancardi GL, Infante MT, Capello E, Sormani MP, Uccelli A., Palmitoylethanolamide relieves neuropathic pain associated to Multiple Sclerosis. *Italian Society of Neurology- 2009- Padova.*

Matias I, Bisogno T, Di Marzo V. “Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake”. *Int J Obesity* 2006;; 30:S7-S12.

G. Mattace Raso, E. Esposito, S. Vitielloà, A. Iacono, A. Santoro, G. D’Agostino, O. Sasso, R. Russo, P. V. Piazzaà, A. Calignano and R. Meli. Palmitoylethanolamide Stimulation Induces Allopregnanolone Synthesis in C6 Cells and Primary Astrocytes: Involvement of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor- α . *Journal of Neuroendocrinology* 23, 591–600-2011

Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, Pistis M. Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. *J Neurosci.* 2008 Dec 17;28(51):13985-94. doi:

10.1523/JNEUROSCI.3221-08.2008. PubMed PMID: 19091987; PubMed Central PMCID: PMC3169176.

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., and Ceru, M.P. 2004. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* 123: 131–145.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):61-5.

Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):137-43. PubMed PMID: 9744270.

Ortega-Gutierrez S, Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A, Correa F, Viso A, Lopez-Rodriguez ML, Di Marzo V, Guaza C (2005a) Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J* 19:1338 –1340.

Okuda Y, Okuda M, Apatoff BR, Posnett DN. The activation of memory CD4(+) T cells and CD8(+) T cells in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2005 Aug 15;235(1-2):11-7.

Petrosino S, Palazzo E, de Novellis V, Bisogno T, Rossi F, Maione S, Di Marzo V. Changes in spinal and supraspinal endocannabinoid levels in neuropathic rats. *Neuropharmacology*. 2007 Feb;52(2):415-22. Epub 2006 Sep 29. PubMed PMID: 17011598.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 873–84.

Puffenbarger RA. Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005 Dec;4(6):625-31. Review. PubMed PMID: 16375680.

Rossi S, Bozzali M, Bari M, Mori F, Studer V, Motta C, Buttari F, Cercignani M, Gravina P, Mastrangelo N, Castelli M, Mancino R, Nucci C, Sottile F, Bernardini S, Maccarrone M, Centonze D. Association between a genetic variant of type-1 cannabinoid receptor and inflammatory neurodegeneration in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12).

Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Muzio L, Musella A, Motta C, Studer V, Cavasinni F, Bernardi G, Martino G, Cravatt BF, Lutz B, Maccarrone M, Centonze D. Cannabinoid CB1 receptors regulate neuronal TNF- α effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2011 Aug;25(6):1242-8. doi: 10.1016/j.bbi.2011.03.017. Epub 2011 Apr 5. PubMed PMID: 21473912.

Sarchielli P, Greco L, Floridi A, Floridi A, Gallai V. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Arch Neurol* 2003; 60: 1082–8.

Schabitz W.R., Giuffrida A., Berger C., Aschoff A., Schwaninger M., Schwab S., Piomelli D. Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke. *Stroke* 33:2112-2114,2002

Schmid PC, Wold LE, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. Anandamide and other N-acylethanolamines in human tumors. *Lipids*. 2002;37(9):907-12.

Sheerin AH, Zhang X, Saucier DM, Corcoran ME. Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid. *Epilepsia*. 2004 Oct;45(10):1184-8

Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK (2005) Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1 β -stimulated human astrocytes. *Glia* 49:211–219.

Shohami E, Mechoulam R. Multiple sclerosis may disrupt endocannabinoid brain protection mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6087–8.

Sospedra, M. and R. Martin, Immunology of multiple sclerosis. *Ann Rev Immunol*, 2005. 23: p. 683-747.

Srinivasan R, Sailasuta N, Hurd R, Nelson S, Pelletier D. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3T. *Brain* 2005; 128: 1016–25

Stover JF, Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Lowitzsch K, Kempinski OS. Neurotransmitters in cerebrospinal fluid reflect pathological activity. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 1038–43.

Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A. & WAKU K. (1995). 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 215:89-97.

Sugiura, T., Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A. & Waku K. (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215, 89–97.

Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 7;94(1):237-41. PubMed PMID: 8990192; PubMed Central PMCID: PMC19300.

Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, MC., Mackie, k. & Walker, JM. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411.

Ueda N, Yamamoto S. “The fatty acid amide hydrolase (FAAH)”. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66:201-210.

Ueda N, Yamanaka K, and Yamamoto S (2001) Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 276: 35552-35557.

Walter L, Stella N. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 775–85.

Witting A, Chen L, Cudaback E, Straiker A, Walter L, Rickman B, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid- mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6362–7.

