

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA**



**Corso di Dottorato di ricerca in**

## **Farmacologia Clinica e sperimentale**

**Coordinatore: Prof.ssa Franca Marino**

**L'AUMENTO DEL TONO ENDOCANNABINOIDE,  
SECONDARIO AL BLOCCO DEL CATABOLISMO DI  
ANANDAMIDE E 2-ARACHIDONOILGLICEROLO,  
INDUCE ANALGESIA E MODULA L'ATTIVAZIONE  
GLIALE IN UN MODELLO ANIMALE DI EMICRANIA**

**Tesi di dottorato del Dr. Antonina Stefania Mangione**

**Matricola: 715860**

**Docente guida: Dott. Fabio Blandini**

**Anno accademico 2012-2013**

# INDICE

---

<b>1. Eemicrania: patologia neurovascolare</b>	<b>5</b>
1.1 Eemicrania: definizione	6
1.1.1 Patogenesi dell'emierania	7
1.2 Nitroglicerina e modello animale di emierania	10
<b>2. Sistema Endocannabinoide e dolore emieranico</b>	<b>13</b>
2.1 Sistema endocannabinoide	14
2.1.1 Recettori cannabinoidi (CB)	14
<i>Recettori CB1</i>	15
<i>Recettori CB2</i>	16
<i>Altri recettori cannabinoidi: GPR55</i>	17
2.1.2 Endocannabinoide e meccanismo d'azione	16
<i>Meccanismo d'azione</i>	18
2.2 Meccanismi di analgesia del sistema endocannabinoide	20
2.3 Endocannabinoide e dolore emieranico: dati clinici e sperimentali	21
<i>Studi clinici</i>	22
<i>Studi sperimentali</i>	23
<b>3. Neuroinfiammazione e dolore</b>	<b>24</b>
3.1 Neuroinfiammazione e dolore	25
3.1.1 Attivazione delle cellule gliali e dolore	25
<i>Microglia</i>	26
<i>Astroglia</i>	28
3.2 Neuroinfiammazione e sistema endocannabinoide	29
3.2.1 Espressione dei recettori cannabinoidi in cellule microgliali	29
3.2.2 Espressione dei recettori cannabinoidi in cellule astrogliali	30
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>31</b>
<b>4. Materiali e Metodi</b>	<b>33</b>

# INDICE

---

4.1 FASE 1: valutazione del comportamento nocicettivo mediante Tail	34
Flick e Formalin test	
Tail Flick test (modello di dolore fisiologico)	34
Formalin test (modello di dolore infiammatorio)	36
Valutazione statistica	38
4.2 FASE 2: valutazione dell'attivazione neuronale dei nuclei cerebrali attivati da NTG	38
Perfusione transcardiaca	39
Immunofluorescenza	40
Valutazione statistica	40
4.3 FASE 3: valutazione dell'attivazione astrogliale e microgliale	41
Immunofluorescenza	41
Valutazione statistica	41
<b>5. Risultati</b>	<b>43</b>
5.1 FASE 1: valutazione del comportamento nocicettivo mediante Tail	44
Flick e Formalin test	
5.1.1 Effetto iperalgesico di NTG al Tail Flick e Formalin test	44
5.1.2 Effetto del DMSO sul comportamento nocicettivo al Tail Flick e al Formalin test	45
5.1.3 Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasici in condizioni basali (in assenza di NTG) al Tail Flick e Formalin test	47
5.1.4 Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasici in condizioni iperalgiche indotte da NTG al Tail Flick e Formalin test	48
5.2 FASE 2: valutazione dell'attivazione neuronale	49
5.2.1 Effetto degli inibitori idrolasici sull'attivazione neuronale in condizioni basali (in assenza di NTG)	51
5.2.2 Effetto degli inibitori idrolasici sull'attivazione neuronale indotta da NTG	52
5.3 FASE 3: valutazione dell'attivazione astro gliale e microgliale	55
5.3.1 Effetto degli inibitori idrolasici sull'attivazione microgliale e astrogliale	56

# INDICE

---

in specifiche aree cerebrali

<b>6. Discussione e Conclusioni</b>	<b>59</b>
6.1 Modello animale di emicrania: utilità e valenza del modello sperimentale utilizzato	60
6.2 Effetti dell'inibizione del catabolismo dei principali endocannabinoidi nel modello animale di emicrania	62
<b>URB602, inibitore di MAGL</b>	62
<b>URB937, inibitore di FAAH periferica</b>	63
<b>URB597, inibitore non selettivo di FAAH</b>	64
6.3 Valutazione gliale nel modello animale di emicrania	65
<i>Modulazione dell'attivazione gliale indotta dagli endocannabinoidi, nel modello animale di emicrania</i>	67
CONCLUSIONI	68
<b>Bibliografia</b>	<b>69</b>
<b>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI</b>	<b>82</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>84</b>

# **CAPITOLO 1**

## **Emicrania: patologia neurovascolare**

## 1.1 Eemicrania: definizione

Con il termine cefalea si intende un dolore avvertito in corrispondenza del cranio, provocato dalla stimolazione di strutture intracraniche sensibili al dolore. Le cefalee sono disturbi dolorosi ricorrenti o cronici che coinvolgono trasversalmente la popolazione generale.

Il 90% degli individui lamenta un attacco di dolore alla testa almeno una volta nella vita. Il 15% della popolazione ha dolore almeno una volta al mese; il 4% per almeno 15 giorni al mese ed il 1-2% quotidianamente.

Nella grande maggioranza dei casi il dolore è di tipo primario cioè non sostenuto da alcuna patologia sottostante, in un certo numero di casi, la cefalea può risultare secondaria a patologia intracraniche o sistemiche, anche severe, con possibile rischio per la vita. Accanto ad una sostanziale benignità in termini prognostici va sottolineato il grado di impatto che queste forme hanno sulla qualità della vita dei pazienti potendo ridurre in modo significativo le loro capacità di funzionamento sia da un punto di vista lavorativo che sociale.

Tra i vari tipi e sottotipi di cefalea primaria, l'emigrania è la forma di maggiore rilevanza clinica e quella alla quale le donne in età fertile pagano il maggiore tributo. Nei paesi occidentali, ne soffrono circa il 18% delle donne ed il 6% degli uomini. L'emigrania si manifesta con attacchi ricorrenti di dolore intenso al capo, prevalentemente monolaterali, che durano da poche ore a qualche giorno e si accompagnano a sintomatologia neurovegetativa.

Il dolore ed i disturbi associati sono accentuati dal movimento tanto da costringere il paziente a cercare sollievo nel riposo a letto, lontano da stimoli luminosi o sonori sin a risoluzione della crisi.

La totale, se pur temporanea disabilità che un attacco emigranico può comportare finisce per avere un impatto rilevante sulla qualità della vita di chi ne soffre.

Frequentemente ogni aspetto della vita quotidiana, dal rendimento lavorativo, alle relazioni sociali e familiari, possono risultare severamente compromessi e questo problema è avvertito da molti individui come ancora più insopportabile del dolore in sé. L'impossibilità di prevedere con esattezza i giorni a rischio è fonte di ulteriore disagio in termini di qualità di vita, rendendo problematica la programmazione degli impegni di lavoro così come di ogni altra attività.

## CAPITOLO 1 Eemicrania: patologia neurovascolare

---

Per queste ragioni l'attenzione dei clinici e dei ricercatori al problema della disabilità indotta dalle cefalee primarie ed in particolare dall'emigrania è molto cresciuta negli ultimi decenni.

Nonostante la sua gravità l'emigrania è tuttavia un disturbo ancora poco conosciuto, frequentemente oggetto di errata diagnosi e spesso non trattato o trattato in maniera inadeguata. Più dei 2/3 delle persone affette da emigrania preferiscono ricorrere a prodotti da banco e non richiedono consulenza specialistica. Una delle conseguenze di tal atteggiamento è la trasformazione di forme a carattere episodico in forme croniche e farmaco-resistenti, un fenomeno spesso sostenuto da un uso di analgesici eccessivo o improprio.

Va precisato che anche nel caso in cui l'emigranico si rivolga a strutture e centri specializzati, i farmaci disponibili in commercio per la prevenzione degli attacchi consentono di ridurre la frequenza degli attacchi, ma non di eliminarli completamente. In maniera analoga, la terapia sintomatica permette di bloccare gli attacchi in una buona percentuale di soggetti, ma con una tempistica spesso piuttosto lunga (diverse ore).

Molta strada deve essere ancora percorsa per far sì che una proporzione significativamente maggiore di sofferenti possa ricevere diagnosi corrette e cure efficaci.

### **1.1.1 Patogenesi dell'emigrania**

Anche se la patofisiologia dell'emigrania è ancora oscura e fonte di dibattito è ormai riconosciuto che l'attivazione del sistema trigemino vascolare, che innerva densamente i vasi durali, seguita dall'infiammazione neurogenica della dura madre, rappresenta uno dei principali attori nel causare e mantenere il dolore emigranico.

Questa teoria ha portato Moskowitz a definire l'emigrania un disordine neuro-vascolare (Buzzi e Moskowitz, 2005). Diverse evidenze hanno suggerito che il dolore emigranico può derivare anche da una disfunzione nei centri del tronco encefalico coinvolti nella regolazione della sensazione di dolore (Goadsby, 2002; Knight et al., 2005). Un'attivazione tronco-encefalica, controlateralmente alla sede del dolore, è riferibile al coinvolgimento della sostanza grigia periacquoduttale (PAG) e del locus coeruleus (LC), situato nella parte

## CAPITOLO 1 Eemicrania: patologia neurovascolare

---

dorsolaterale del ponte. Il locus coeruleus (LC) è il principale nucleo noradrenergico del sistema nervoso centrale che, oltre alla nota azione di controllo sul tono vascolare cerebrale, modula la permeabilità della barriera emato-encefalica ed interviene nella regolazione dei processi di informazione sensoriale. Tuttavia disfunzioni nella regolazione neurovascolare e neurovegetativa, da parte dei vari nuclei tronco-encefalici correlati funzionalmente, spiegherebbero solo parzialmente i sintomi caratteristici dell'emicrania. Infatti la disfunzione dei centri del tronco cerebrale è associata con l'attivazione del sistema trigeminovascolare e con dilatazione dei vasi sanguigni cerebrali (Myers, 1999; Welch, 2003).

Nel ratto, per esempio, le fibre perivascolari del cranio sono costituite da proiezioni che terminano a livello del TCC (complesso trigemino cervicale) di cui fa parte il nucleo trigeminale caudale (NTC). Il sistema trigeminovascolare ha delle connessioni ascendenti con diverse aree del tronco encefalico e con strutture cerebrali, come i nuclei talamici ed ipotalamici, che a loro volta hanno connessioni ascendenti con la corteccia (Akerman et al., 2011; Edvinsson et al., 2011; Nosedà et al., 2011).

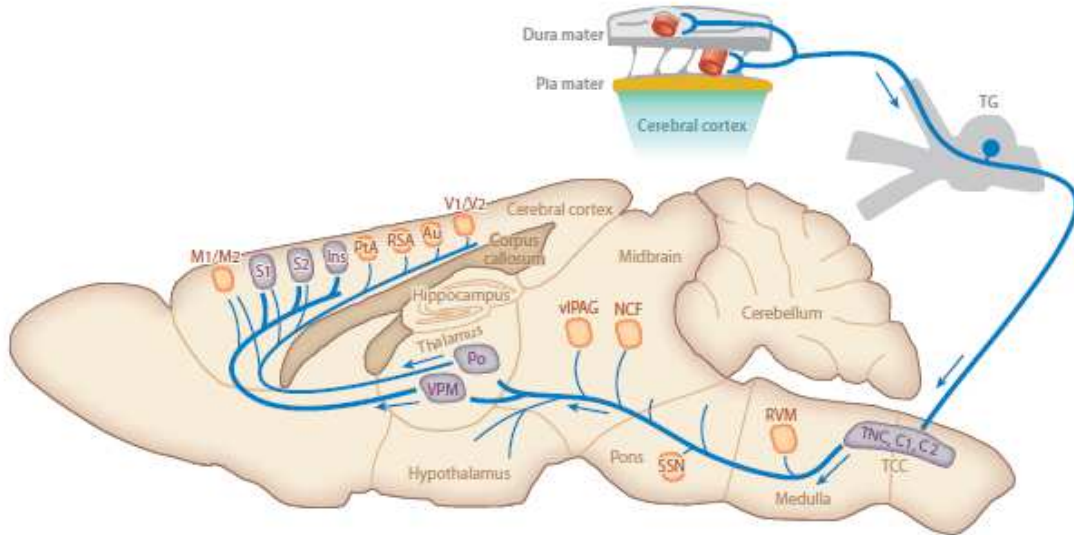
La stimolazione delle fibre afferenti durali, di fatto comporta l'attivazione dei neuroni del trigeminovascolare (principalmente in lamina I, II e V) e, conseguentemente, attivazione di nuclei che ricevono le proiezioni dal TCC: aree del tronco encefalico, tra cui PAG e RVM (medulla ventromediale rostrale), aree ipotalamiche e talamiche, in particolare VPM (nucleo talamico ventroposteriomediale) e Po (gruppo nucleare talamico posteriore). I neuroni talamici VPM proiettano a livello della corteccia somatosensoriale primaria e secondaria e della corteccia insulare (Ins), componenti della cosiddetta "matrice del dolore" (Fig. 1; Pietrobon and Moskowitz 2013).

I neuroni talamici Po proiettano a livello di componenti corticali auditori, visivi contribuendo verosimilmente agli altri aspetti dell'esperienza emicranica, quali la fotofobia e la fonofobia (Nosedà et al., 2010a e b, 2011; Edelmayer et al., 2009; Burstein et al., 2010; Summ et al., 2010). Le proiezioni del sistema trigeminovascolare a livello di specifici nuclei ipotalamici e del tronco encefalico contribuiscono a spiegare altri aspetti della complessa sintomatologia dei pazienti emicranici, quali perdita di appetito, ritenzione idrica, irritabilità, stress e sintomi autonomi (Akerman et al., 2011). La dilatazione a carico dei vasi meningei è responsabile dell'attivazione meccanica delle fibre nervose sensoriali del trigemino, poiché induce il rilascio di glutammato, sostanza P (SP), *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) e altri neuropeptidi dalle terminazioni nervose sensoriali (Moskowitz et al., 1989; Moskowitz, 1993). Queste sostanze chimiche irritano e dilatano ulteriormente i vasi sanguigni, inducendo

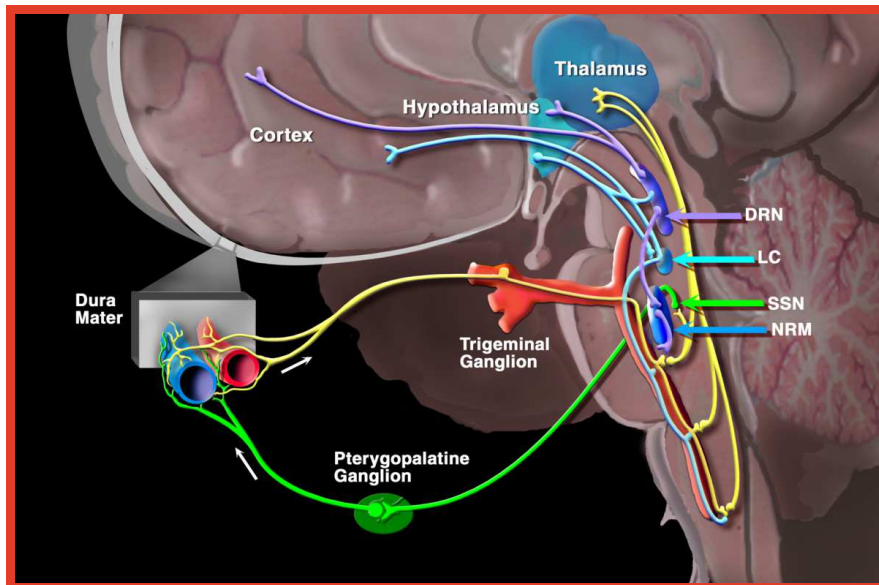


# CAPITOLO 1 Eemicrania: patologia neurovascolare

un ulteriore rilascio di neuropeptidi dai neuroni sensoriali e un aumento del dolore trasmesso dal NTC ai centri cerebrali superiori tra cui il talamo e la corteccia (Fig.2).



**Figura 1.** Disegno schematico delle principali strutture neuronali e connessioni del sistema trigemino vascolare coinvolti nel dolore emicranico. Le frecce indicano la direzione delle informazioni. Abbreviazioni: A11, nucleo ipotalamico dopaminergico; Au, corteccia auditiva; Ins, corteccia insulare; M1/M2, corteccia motoria; NCF, nucleo cuneiforme; PH, ipotalamo posteriore; Po, gruppo nucleare talamico posteriore; PtA, corteccia parietale; SSN, nucleo salivatorio superiore; RSA, corteccia retroplenale; RVM, medulla ventromediale rostrale; S1/S2, corteccia somatosensoriale primaria e secondaria; TCC, complesso trigemino cervicale (comprendente le corna dorsali C1/C2 del midollo spinale cervicale e il nucleo trigeminale caudale (NTC)); TG, ganglio trigeminale; vPAG, grigio periaquedutale ventrolaterale; VPM, nucleo talamico ventroposteriomediale; V1/V2, corteccia visiva (Pietrobon and Moskowitz 2013).



**Figura 2.** Rappresentazione riassuntiva della via trigemino-vascolare responsabile della patogenesi dell'emicrania.

## CAPITOLO 1 Eemicrania: patologia neurovascolare

---

Diversi studi suggeriscono un ruolo chiave del CGRP nella fisiopatologia dell'emigrania, come dimostra l'efficacia degli antagonisti del recettore per CGRP nel trattamento dell'emigrania (Olesen J et al., 2004; Ho TW et al., 2008) e la capacità di CGRP di indurre attacchi migraine-like dopo somministrazione endovenosa in pazienti emigranici. Ciò suggerisce una maggiore ipersensibilità nella modulazione dei circuiti nocicettivi, indotta da CGRP nella maggior parte dei pazienti emigranici (Lassen LH et al., 2002). Tuttavia, i meccanismi alla base di tale ipersensibilità, così come l'esatto sito d'azione degli antagonisti del recettore CGRP rimangono ancora poco chiari (Villalon e Olesen 2009; Reober e Russo 2009; Ho TW et al., 2010).

### **1.2 Nitroglicerina e modello animale di emigrania**

Uno dei principali attori responsabili dell'attivazione del sistema trigemino vascolare è l'ossido nitrico (NO), che agisce attivando le fibre nervose sensoriali afferenti alle meningi, causando così il rilascio di neuropeptidi vasoattivi (Lassen et al., 1998, Olesen et al., 1993; Messlinger et al., 2000; Strecker et al. 2002) e ulteriore vasodilatazione, seguita da infiammazione neurogenica.

Tra i diversi nitrovasodilatori disponibili in commercio, la nitroglicerina (NTG), composto altamente lipofilo che attraversa facilmente le membrane biologiche, compresa la barriera ematoencefalica, viene utilizzata da diversi anni nel trattamento di patologie cardiache. Tuttavia, è noto che nei soggetti emigranici la somministrazione sistemica di NTG evoca una crisi cefalica con tutte le caratteristiche degli attacchi spontanei che si manifesta abitualmente con un intervallo di alcune ore (Sicuteri et al., 1987; Iversen et al., 1989, 1994; Olesen et al., 1993, 1995; Buzzi et al, 2003; Sances et al., 2004; Tassorelli et al, 2006). Uno dei modelli sperimentali utilizzati per studiare i meccanismi fisiopatologici dell'emigrania è rappresentato dall'analisi delle alterazioni biochimiche, neurofisiologiche e comportamentali (nocicettive) indotte dalla NTG. Nell'animale, la somministrazione di NTG induce un'attivazione neuronale massima 4 ore dopo la sua somministrazione, a livello di specifiche aree cerebrali (Tassorelli et al, 1995, Greco et al., 2011) (tabella 1), che è associata ad uno stato di

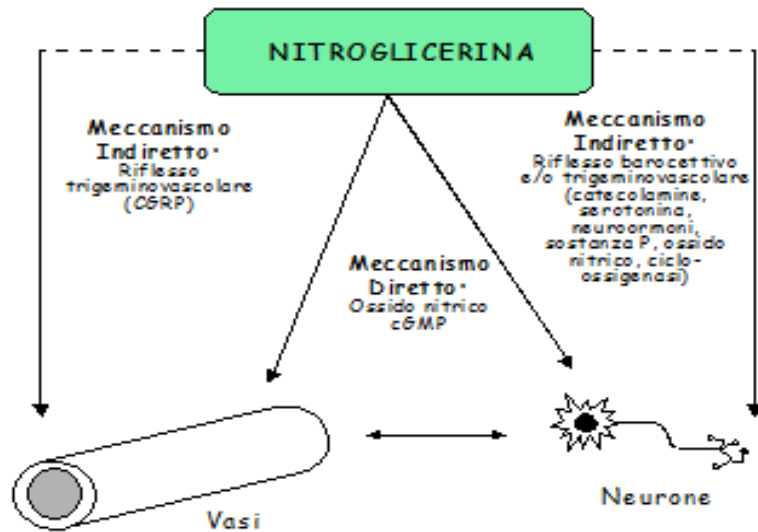
## CAPITOLO 1 Eemicrania: patologia neurovascolare

iperalgnesia (Tassorelli et al., 2003), ovvero di esagerata risposta a stimoli dolorifici, testimoniata dall'aumento delle risposte nocicettive a specifici test dolorifici quali Tail Flick test e Formalin test (Tassorelli et al, 2003).

**Tabella 1**-Nuclei attivati dalla somministrazione di NTG (10mg/kg, i.p) nel ratto.

NUCLEI CEREBRALI		FUNZIONE
<b>PVH</b>	nucleo paraventricolare dell'ipotalamo	funzioni neuroendocrine ed autonome
<b>AMI</b>	nucleo centrale dell'Amigdala	media un circuito che unisce stimoli emozionali con la risposta vegetativa
<b>PAG</b>	nucleo grigio periaqueduttale	coinvolto nei circuiti che regolano le funzioni autonome con stimoli nocicettivi
<b>PAB</b>	nucleo parabrachiale	possiede connessioni con i nuclei NTS,PVH, AMI
<b>LC</b>	locus coeruleus	regola la risposta in seguito a stimoli stressanti
<b>NTS</b>	nucleo del tratto solitario	riceve input dai barocettori e afferenze cardiovascolari
<b>NTC</b>	nucleo trigeminale caudale	regola il circolo cerebrale e la risposta al dolore
<b>AP</b>	area postrema	funzione barocettiva

E' stato suggerito che l'attivazione neuronale in queste aree è il risultato dell'azione (diretta ed indiretta) dell'NTG su un duplice bersaglio: il neurone ed il vaso (Fig. 3) (Tassorelli et al., 2003). Alcune di queste aree, come ad esempio il nucleo del tratto solitario (NTS), sono direttamente coinvolte nella regolazione pressoria ed è quindi possibile che la loro attivazione sia legata alla risposta barocettiva innescata dall'azione ipotensiva della NTG, mediata dalla formazione di NO nella parete vascolare. Tuttavia, l'attivazione di aree non direttamente coinvolte nei meccanismi barocettoriali, ma implicate nella percezione e nella trasmissione del dolore, come il NTC o il PAG, rafforzano l'ipotesi che l'espressione della c-Fos sia, almeno in parte, legata ad un effetto di NO liberato/indotto dalla NTG sulla trasmissione del dolore. Tale azione potrebbe manifestarsi sia a livello spinale/sovra spinale, sia sul sistema del trigeminovascolare coinvolto nella regolazione dei vasi cerebrali (Moskowitz et al, 1984; Moskowitz et al, 1992; Moskowitz et al, 1993) e meningei (Reuter et al., 2001). Pertanto, perturbazioni nella regolazione neurovascolare e neurovegetativa da parte di questi e di altri nuclei tronco-encefalici correlati funzionalmente, sembrano essere alla base di molti dei sintomi caratteristici dell'emigrania.



**Figura 3.** I bersagli della NTG con i possibili meccanismi diretti/indiretti e i mediatori coinvolti. In seguito a somministrazione sistemica, NTG raggiunge la parete dei vasi sanguigni dove induce vasodilatazione, sia direttamente, tramite la formazione locale di NO, che indirettamente attraverso la sua interazione con sostanze vasoattive, rilasciate dalle terminazioni nervose. NTG è in grado di raggiungere il compartimento cerebrale, dove potrebbe esercitare un effetto neuronale diretto, la formazione di NO. NTG potrebbe indurre indirettamente attivazione neuronale, attraverso l'attivazione riflessa di nuclei coinvolti nella funzione barocettiva e l'interazione con il sistema trigemino vascolare.

**CAPITOLO 2**

**Sistema Endocannabinoide e**

**dolore emicranico**

### 2.1 Sistema Endocannabinoide

Negli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito ad un ritorno d'interesse del mondo scientifico nei confronti della Canapa, una pianta erbacea a ciclo annuale il cui nome scientifico è *Cannabis sativa*. Nel 1971 un gruppo di ricercatori israeliani è riuscito ad isolare e sintetizzare il delta-9-tetraidroacannabinolo ( $\Delta^9$ -THC), il più potente tra i numerosi principi attivi presenti nella *Cannabis* (Gaoni and Mechoulam, 1971). Più recentemente, nel 1988, alcuni ricercatori scoprirono la presenza nel corpo umano di un recettore di membrana capace di essere attivato dal THC (Devane et al., 1988). Il sospetto che si trattasse del recettore per i cannabinoidi, fu confermato definitivamente nel 1988, quando, successive indagini decretarono che quel recettore isolato nel cervello di ratto, era effettivamente lo specifico recettore attraverso cui i cannabinoidi mediavano gli effetti farmacologici e comportamentali (Devane et al., 1988). Questo recettore fu battezzato CB1, perché, poco dopo, fu individuato un secondo recettore, CB2, che spiegava gli effetti immunosoppressivi che i derivati della cannabis presentavano nel sistema immunitario. La rivelazione dell'esistenza di specifici recettori per il THC fu prontamente seguita dalla ricerca dei ligandi endogeni per tali proteine (gli endocannabinoidi, EC).

Oggi è ampiamente accettato che il sistema endocannabinoide comprenda i recettori cannabinoidi (CB), i loro ligandi endogeni (endocannabinoidi) ed enzimi coinvolti nella sintesi e degradazione degli endocannabinoidi.

Di seguito in questo capitolo verranno discussi i singoli componenti del sistema endocannabinoide.

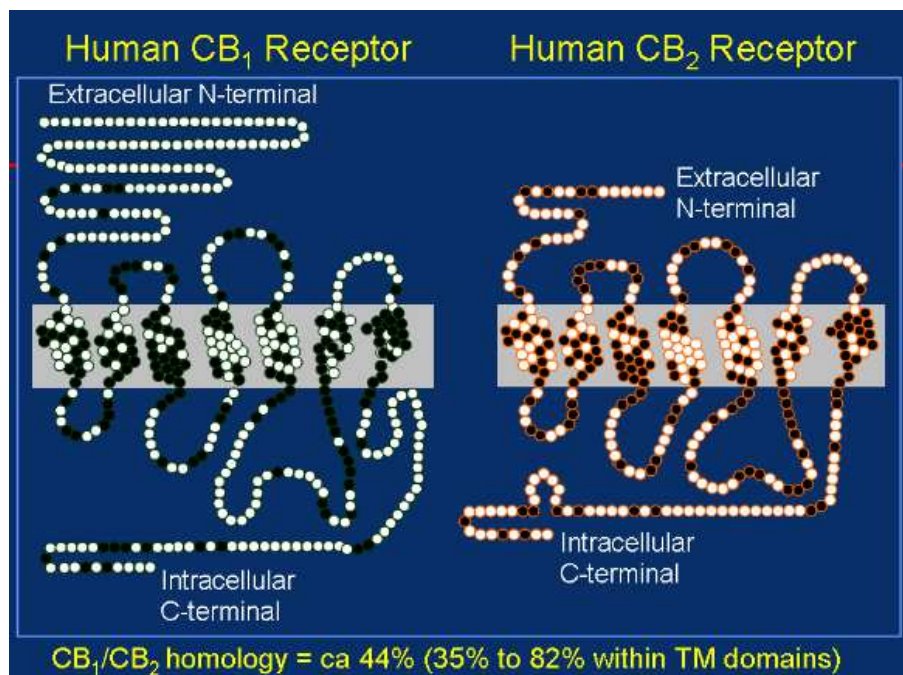
#### 2.1.1 Recettori Cannabinoidi (CB)

Cannabinoidi ed endocannabinoidi esercitano i loro effetti farmacologici attraverso l'attivazione di almeno due distinti recettori cannabinoidi (CB), CB1 e CB2. Si tratta di recettori accoppiati a G-protein con sette domini trans membrana, che presentano un'omologia di struttura del 68% (Fig.4). Gli EC interagiscono con una tasca idrofobica formata dalle eliche 3 e 6 collocandosi vicino al residuo cisteinico sull'elica 6 che permette la successiva attivazione del recettore (Tian et al., 2005).

La loro distribuzione è molto diversa nel sistema nervoso centrale e periferico. L'espressione del recettore CB1 è largamente ristretta ai neuroni, soprattutto in loci particolarmente importanti per il processamento nocicettivo a livello cerebrale, spinale e del sistema nervoso

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

periferico (Devane et al., 1988; Tsou et al., 1998; Egertova and Elphick 2000). CB2 è espresso principalmente da cellule immunitarie, compresa la glia nel cervello; per tale motivo si ipotizza un ruolo nella mediazione degli effetti immunosoppressivi del THC (Cabral et al., 2008), sebbene ci sono evidenze che supportano un ruolo di CB2 in processi neurologici, quali ansia e dipendenza (Onaivi, 2006).



**Figura 4.** Omologia strutturale dei due recettori cannabinoidi CB1 e CB2.

### ***Recettore CB1***

I recettori CB1 sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo, e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali. Diversi studi hanno rilevato una larga espressione di CB1 a livello cerebrale: corteccia, ippocampo, bulbi olfattivi, gangli della base (substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare e caudato-putamen laterale) e cervelletto, dove la sua distribuzione è del tutto coerente con gli effetti del THC osservati sull'attività locomotoria, sulla coordinazione motoria, sulla postura, sulla memoria e sull'apprendimento. Sebbene in minor densità, i recettori CB1 sono rilevabili anche in aree limbiche quali l'accumbens e l'amigdala, nell'ipotalamo, nel mesencefalo, nel midollo allungato e nel midollo spinale. A livello del midollo spinale, CB1 è espresso in aree importanti per i processi nocicettivi quali il funicolo dorsolaterale, il corno dorsale superficiale e la lamina X.

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

---

L'espressione a livello del periaqueductal gray (PAG), rostral ventromedial medulla (RVM) e talamo è particolarmente importante nel contesto analgesia.

L'assenza di recettori CB1 nel tronco cerebrale, dove sono localizzati i centri regolatori della funzione respiratoria e cardiaca (Millhorn e Eldridge, 1986), ben si accorda con la bassa letalità legata all'overdose di cannabis. A livello del sistema nervoso periferico, il CB1 è stato trovato nelle fibre periferiche sensoriali e autosomiche (negli interneuroni spinali della radice dorsale dei gangli, nei neuroni mienterici, nelle fibre pre-giunzionali della vescica e nelle fibre simpatiche dei gangli cervicali superiori) in perfetto accordo con alcuni degli effetti riportati sulla nocicezione e sulle funzioni del tratto vascolare e gastrointestinale (Farquhar-Smith et al., 2000; Pertwee 1999).

A livello neuronale, CB1 è espresso sulle fibre assonali, soprattutto sui loro terminali. A livello dei terminali presinaptici dei neuroni GABAergici (Katona et al., 2000) e glutammatergici (Katona et al., 2006). Questa distribuzione presinaptica è in accordo con l'ipotesi che gli endocannabinoidi agiscono come modulatori retrogradi del rilascio di neurotrasmettitori (Kreitzer and Regehr 2001; Ohno-Shosaku et al., 2001; Wilson and Nicoll 2001; Katona and Freund 2008). Attraverso le proteine G di tipo inibitorio (Gi/Go), i recettori CB1 trasducono il segnale agendo su diversi effettori intracellulari. In particolare i cannabinoidi inibiscono l'adenilato ciclasi (Felder et al., 1992, Gerard et al., 1991), modulano alcuni canali ionici, inducendo la chiusura dei canali del calcio voltaggio dipendenti, l'apertura di quelli del potassio e l'attivazione di diverse proteine chinasi intracellulari: MAP (mitogen activated protein) kinasi, JNK (c-jun N-terminal kinase), PKB (protein kinase B), FAK (Focal Adesion kinase) e PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) (Howlett 2002).

Il meccanismo d'azione degli endocannabinoidi verrà discusso in seguito.

### ***Recettore CB2***

Il recettore CB2 è principalmente localizzato nel sistema immunitario, in particolare nella zona marginale della milza, nelle tonsille e nelle cellule immunocompetenti (Schatz et al., 1997), dove è implicato nel controllo della risposta immunitaria sia umorale che cellulare (Parolaro, 1999; Klein et al., 2003). Tra le cellule immunitarie circolanti, i linfociti B e le cellule natural killer sono particolarmente ricchi in CB2 mRNA con minor espressione in monociti e leucociti polimorfonucleati (Galiegue et al., 1995). Anche microglia ed astroglia esprimono recettori CB2 funzionali (Walter et al., 2002).

Anche il recettore CB2 trasduce il segnale mediante G proteine, ma agisce su effettori solo parzialmente sovrapponibili a quelli del CB1. In particolare, il recettore CB2 non è in grado



## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

---

di modulare i canali ionici, mentre, come il recettore CB1, è negativamente accoppiato all'adenilato ciclasi ed è in grado di attivare le MAP kinasi (Amery, 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 nucleo ambiguo e nel nucleo trigemino spinale.

### ***Altri recettori cannabinoidi: GPR55***

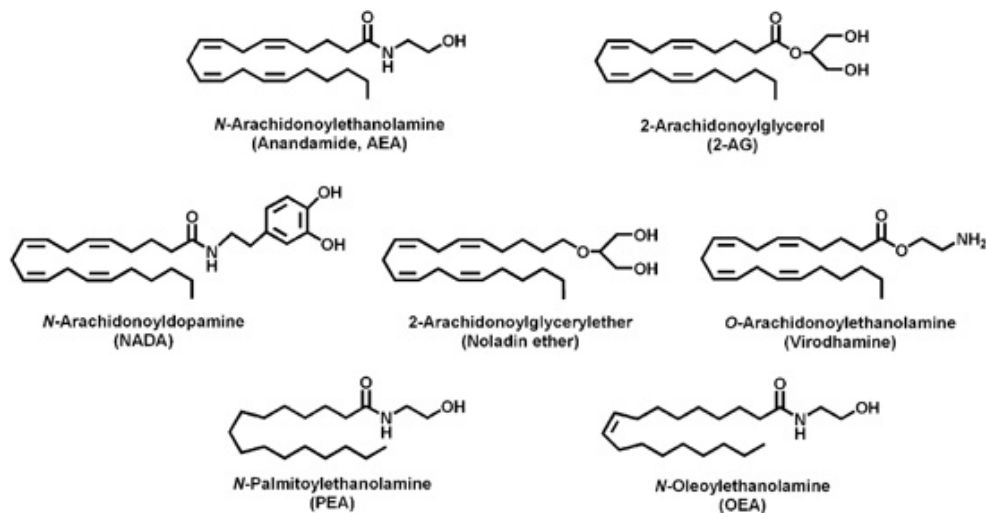
Più recentemente, è stato identificato un terzo recettore per i cannabinoidi, GPR55 (Baker et al., 2006). GPR55 risulta essere particolarmente sensibile al lipofisfatidilinositolo (che non è un classico ligando per i recettori cannabinoidi) e solo ad alcuni cannabinoidi ed endocannabinoidi. L'attivazione di GPR55 aumenta le correnti del calcio, utilizzando meccanismi di trasmissione del segnale distinti da CB1 e CB2 (Lauckner et al., 2008). Recentemente è stato assegnato un ruolo nocicettivo a tale recettore. Topi knockout per tale recettore, GPR55<sup>-/-</sup>, non sviluppano iperalgesia meccanica dopo trattamento con agenti infiammatori, quali complete Freund's adjuvant (CFA), o in seguito a parziale ligatione del nervo sciatico (PSNL) (Staton et al., 2008). Tuttavia rimangono da chiarire i meccanismi alla base di quest'azione.

### **2.1.2 Endocannabinoidi e meccanismo d'azione**

Gli endocannabinoidi (Fig. 5) sono una nuova classe di mediatori lipidici derivanti dall'acido arachidonico. L'anandamide (AEA) ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) sono stati i primi identificati e sono pertanto i ligandi endogeni per i CB meglio conosciuti. L'AEA è in grado di legare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi come un agonista parziale (Burkey et al., 1997; Glass and Northup, 1999); anche il 2-AG è in grado di attivare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi però come un agonista pieno (Mechoulam et al., 1995). Di recente sono stati individuati altri ligandi endogeni in grado di legare e di attivare i recettori CB: il 2-arachidonoilgliceriletere (2-AGE, noladin), un analogo etero del 2-AG che si comporta da agonista sia sul CB1 che sul CB2 con una maggiore affinità per il CB1 (Hanus et al., 2001); la *O*-arachidonoiletanolamina (virodammina), un analogo estereo dell'anandamide, che si comporta come parziale agonista/antagonista sul CB1 e agonista sul CB2 (Porter et al., 2002); infine la *N*-arachidonoildopamina (NADA), che risulta 40 volte più selettiva per il CB1 che per il CB2 (Bisogno et al., 2000) ed è in grado di attivare il recettore dei vanilloidi

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

(TRPV1) (Huang et al., 2002). La *N*-palmitoiletanolamide (PEA) già nota come anti-infiammatorio, fu proposta come nuovo ligando per il CB2 (Facci et al., 1995), ma questa ipotesi, in seguito, non ha trovato conferma. Infine, nel 1995 fu scoperta l'oleamide (cis-9-ottadecamamide, OEA), un fattore di induzione del sonno (Cravatt et al., 1995), la cui azione cannabimimetica è ancora oggetto di discussione (Leggett et al., 2004).

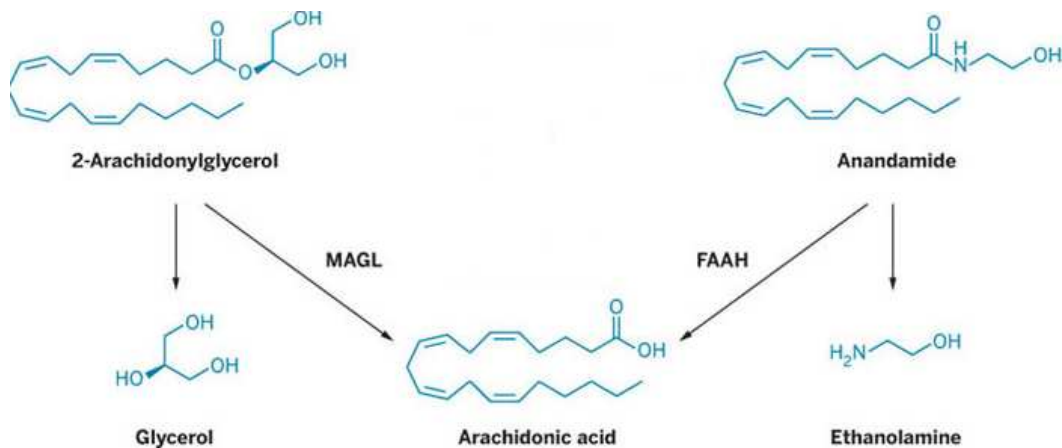


**Figura 5.** Struttura chimica degli endocannabinoidi biologicamente attivi.

### *Meccanismo d'azione*

Le vie biosintetiche più studiate e quindi meglio conosciute sono certamente quelle che riguardano i primi due EC scoperti: AEA e 2-AG. Sono considerati neuromodulatori locali che diversamente dagli altri neuromodulatori, non sono immagazzinati in vescicole secretorie, ma vengono prodotti “*on demand*” (su richiesta) dalle cellule, a partire da precursori di membrane per essere poi rilasciati nel versante extracellulare, analogamente ad altri eicosanoidi come le prostaglandine (PGs). L'AEA viene biosintetizzata attraverso l'idrolisi della corrispondente *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) per opera di una specifica fosfolipasi  $\text{Ca}^{++}$  dipendente di tipo D e di una *N*-aciltransferasi (Di Marzo et al., 1994); il 2-AG è biosintetizzato attraverso l'idrolisi dei diacilgliceroli (DAGs) catalizzata da una DAG lipase (Fig. 6).

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico



**Figura 6.** Le vie biosintetiche dei due endocannabinoidi più studiati: AEA e 2-AG.

I meccanismi di trasmissione degli EC nel sistema nervoso differisce da quelli dei sistemi di trasmissione classica (e.s. colinergico, aminoacidergico e monoaminergico). Nel classico modello di neurotrasmissione, la depolarizzazione del neurone presinaptico causa il rilascio dei neurotrasmettitori che agiscono su recettori presenti sul neurone postsinaptico (Siegel et al., 1999). In contrasto, la neurotrasmissione degli EC si verifica mediante un meccanismo retrogrado (Fig.7): una volta sintetizzati, gli EC vengono rilasciati dal neurone postsinaptico all'esterno della cellula dove vanno a legarsi ai recettori presenti sulle membrane presinaptiche.

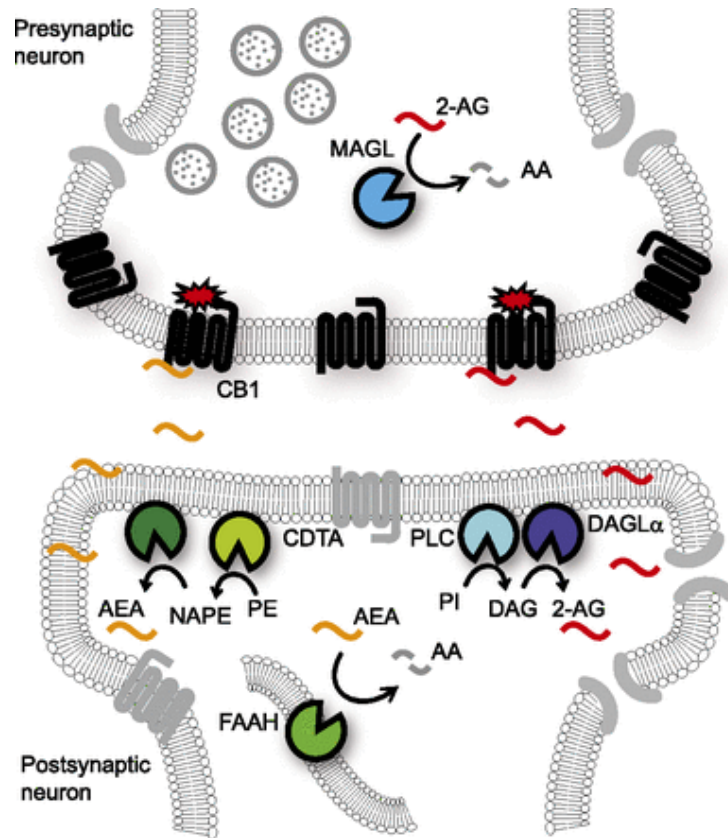
Lo spegnimento del segnale prevede, quindi, la ricaptazione degli EC da parte della cellula, l'idrolisi enzimatica e la riesterificazione dei prodotti ottenuti nei fosfolipidi di membrana (Fig.7). Il re-uptake degli EC sembrerebbe avvenire attraverso un meccanismo di diffusione facilitata guidata da uno specifico carrier di membrana, la cui esistenza è ancora oggi dibattuta (Glaser et al., 2005).

Dopo essere stati sequestrati dal versante extracellulare, gli EC, all'interno della cellula, sono soggetti ad un'idrolisi enzimatica. L'enzima maggiormente coinvolto nella degradazione degli EC (sia AEA e 2-AG) è una idrolasi specifica conosciuta come Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), proteina integrale di membrana. Il 2-AG può essere idrolizzato anche da un'altra classe di enzimi quali le monoacilglicerololipasi (MAGLs) che sono presenti sia a livello di membrana che a livello citosolico e che riconoscono come substrato anche altri monoacilgliceroli diversi dal 2-AG (Goparaju et al., 1999; Di Marzo et al., 1999).

Negli ultimi anni è emerso che l'insorgenza di alcune patologie, la manifestazione di alcuni sintomi e il decorso di alcune malattie, sono in qualche modo legate ad alterazioni del tono

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

EC. La scoperta del sistema EC e la delucidazione del suo funzionamento sono state, quindi, una pietra miliare nella ricerca in questo campo e rappresentano oggi un valido strumento per lo sviluppo di farmaci alternative per alcune stati patologici, tra cui il dolore.



**Figura 7.** Rappresentazione del meccanismo retrogrado degli endocannabinoidi.

### 2.2 Meccanismi di analgesia del sistema endocannabinoide

Il sistema endocannabinoide modula diversi livelli del pathway nocicettivo, centrali (cervello e midollo spinale) e periferico, agendo su entrambi i recettori CB1 e CB2. Inoltre questi siti d'azione non sono indipendenti tra loro, ma esiste un considerevole grado di interazione.

A livello centrale, il sistema endocannabinoide modula la trasmissione del dolore principalmente attraverso il recettore CB1 localizzato a livello sovrasinale e spinale (Ledent et al., 1999; Meng et al., 1998). Evidenze dirette implicano un ruolo per il PAG, RVM,

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

---

amigdala, talamo e nucleo noradrenergico A5 nell'effetto antinocicettivo mediato dai recettori CB1. A tale livello, il sistema endocannabinoide inibisce la trasmissione del dolore agendo sui pathway ascendenti, principalmente a livello del talamo (Martin et al., 1999) e modifica l'interpretazione soggettiva del dolore modulando l'attività neuronale delle strutture limbiche quali l'amigdala (Manning et al., 2003). Un altro meccanismo centrale antinocicettivo degli endocannabinoidi è la modulazione dei pathway inibitori discendenti. In questi pathway sono noti due differenti tipi di cellule, denominate "on cells" e "off cells" che modulano l'input dell'informazione per la trasmissione del dolore. "On cells" facilitano la trasmissione nocicettiva, mentre le "off cells" la inibiscono (Fields, 2004). Microiniezioni di agonisti cannabinoidi direttamente a livello del PAG (Martin et al., 1999) e RVM (Martin et al., 1998) provocano analgesia aumentando l'attività delle "off cells" attraverso un meccanismo mediato dai cannabinoidi: i cannabinoidi stimolano il pathway inibitorio discendente attivando i neuroni del PAG e RVM attraverso l'inibizione del rilascio di GABA in queste aree (Vaughan et al., 2000).

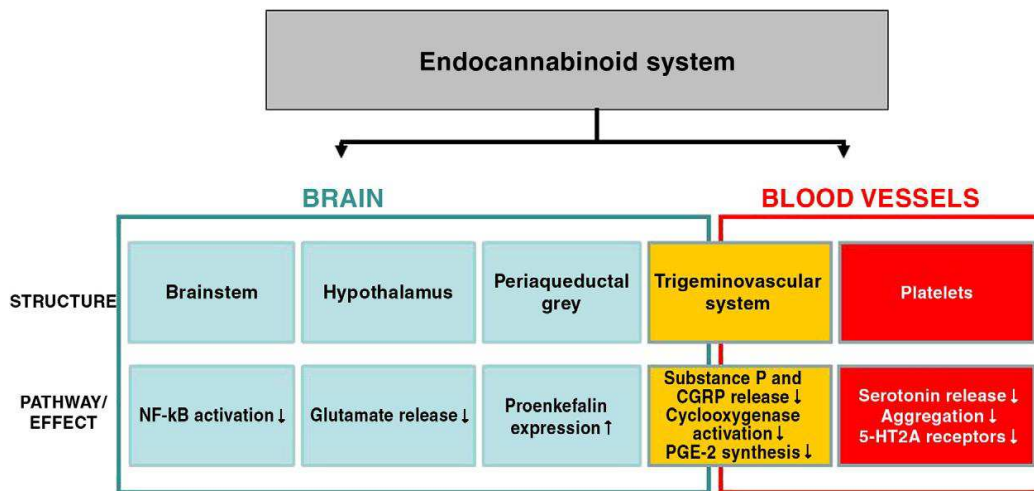
A livello spinale i recettori CB1, principalmente localizzati a livello del corno dorsale, modulano il passaggio del traffico nocicettivo a livello centrale. La maggior parte dei neuroni primari afferenti, che esprimono CB1, sono fibre di grosso calibro coinvolte nella trasmissione non nocicettiva (Hohmann and Herkenham, 1999). Tuttavia, il recettore CB1 è anche espresso a livello di fibre nocicettive di piccolo calibro incluse le fibre C, e inibisce il rilascio di neurotrasmettitori coinvolti nella trasmissione del dolore (Drew et al., 2000; Wilson and Nicoll, 2002). Poichè i recettori CB1 sono altamente espressi a livello dei gangli della radice dorsale (Bridges et al., 2003; Hohmann, 2002) una loro stimolazione a questo livello diminuisce il rilascio di neurotrasmettitori a livello periferico (Millns et al., 2001). Recentemente è stato rivalutato il ruolo dei recettori CB2 nella modulazione del dolore a livello spinale (Taylor, 2009). Inoltre le cellule immunitarie sembrano responsabili dell'analgesia periferica indotta dai recettori CB2 dal momento che questi recettori, una volta attivati, riducono il rilascio di molecole pro nocicettive da queste cellule.

### **2.3 Endocannabinoidi e dolore emicranico: dati clinici e sperimentali**

La ricerca sul sistema endocannabinoide in diverse condizioni patologiche della sfera nocicettiva, tra cui l'emicrania, è relativamente recente. Studi clinici e sperimentali hanno dimostrato ampiamente il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nella fisiopatologia

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

dell'emicrania (Cupini et al., 2008; Greco et al., 2010; Russo, 2004). In Figura 8 sono riportati i possibili siti e meccanismi di azione del sistema endocannabinoide nella patofisiologia dell'emicrania a livello cerebrale, neurovascolare e vascolare.



**Figura 8.** Effetti dell'attivazione del sistema endocannabinoide, a livello cerebrale e vascolare, potenzialmente correlati ai meccanismi fisiopatologici dell'emicrania.

### Studi clinici

Recenti studi clinici concordano con l'idea che ridotti livelli di endocannabinoidi giochino un importante ruolo nella patofisiologia dell'emicrania. Tra questi, il gruppo guidato da Sarchielli e collaboratori hanno riportato ridotti livelli di anandamide (AEA) ed elevati livelli di N-palmitoyletanolamine (PEA) nel liquido cerebrospinale dei pazienti con emicrania cronica. E' stato ipotizzato che ridotti livelli di AEA attivano il sistema del trigeminovascolare, mediante il rilascio di CGRP e ossido nitrico (Akerman et al., 2004; Sarchielli et al., 2007). Teoricamente, la riduzione dei livelli di AEA, e quindi la mancanza di un effetto inibitorio da parte di tale endocannabinoide, potrebbe contribuire a facilitare e mantenere la sensibilizzazione nei pazienti con emicrania cronica (Sarchielli et al., 2001, 2002). Invece, l'aumento dei livelli di PEA risulta poco rilevante in questo contesto e probabilmente rappresenta il risultato della risposta compensatoria alla riduzione dei livelli di anandamide. Inoltre, Rossi et al., (2008) hanno dimostrato che nelle piastrine dei pazienti emicranici e con cefalea da abuso di farmaci (MOH: Medication Overuse Headache), i livelli di 2-AG e AEA sono significativamente inferiori a quelli dei soggetti di controllo, senza differenze significative tra i due gruppi di pazienti (Rossi et al., 2008).

## CAPITOLO 2 Sistema endocannabinoide e dolore emicranico

---

A queste evidenze si aggiungono ulteriori studi che dimostrano la presenza del gene umano che codifica per il recettore CB1 (*cnr1*, chromosome 6q14-15) in una regione coinvolta nell'insorgenza dell'emicrania. Il gruppo guidato da Juhasz ha riportato un'associazione atipica significativa tra il gene *cnr1* e attacchi emicranici, mostrando che la presenza di aplotipo in un soggetto riduce l'espressione dei recettori CB1 e causa alterazione nell'attivazione del sistema trigeminovascolare. Ciò rende il portatore di tale aplotipo particolarmente vulnerabile ad attacchi emicranici (Juhasz et al., 2009).

### ***Studi sperimentali***

Recenti studi sperimentali hanno mostrato che l'azione antinocicettiva degli endocannabinoidi potrebbe essere utile nella ricerca di nuovi target per il trattamento dell'emicrania. In un recente studio abbiamo riportato cambiamenti significativi nell'attività dei due enzimi che catabolizzano AEA e 2-AG, rispettivamente FAAH e MAGL, a livello del brainstem ed ipotalamo di ratti trattati con NTG (10mg/Kg, i.p.), modello animale di emicrania. Tali cambiamenti erano paralleli a riduzione dell'iperalgia ed espressione della proteina c-Fos a livello di NTC, entrambi effetti indotti dalla somministrazione di NTG (Greco et al., 2009).

Diversi studi hanno indirizzato il loro interesse sugli inibitori di MAGL (monoacilglicerolipasi, enzima responsabile dell'idrolisi del 2-AG) e FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase, enzima responsabile dell'idrolisi dell'AEA) per meglio studiare e valutare il ruolo di AEA e 2-AG in diversi modelli sperimentali di dolore. Tra i vari inibitori idrolasici, in particolare URB602 e URB597 inibiscono in modo specifico e non competitivo l'attività rispettivamente di MAGL e FAAH (Makara et al., 2005). Tuttavia il problema principale degli endocannabinoidi, utilizzati come analgesici, è quello di causare importanti effetti collaterali. A tal proposito in uno studio recente è stato dimostrato che l'utilizzo di un inibitore idrolasico della FAAH periferica, URB937, riduce il comportamento nocicettivo in diversi modelli animali di dolore, poiché questo composto non attraversa la barriera ematoencefalica, il suo impiego eviterebbe l'insorgenza di effetti collaterali di tipo psichiatrico e l'intossicazione del sistema nervoso centrale (Clapper et al., 2010).

Questi dati suggeriscono che la modulazione del sistema endocannabinoide, in modelli animali di dolore, rappresenta uno strumento per la comprensione dei meccanismi alla base dell'insorgenza del dolore emicranico.

## **CAPITOLO 3**

### **Neuroinfiammazione e dolore**



### 3.1 Neuroinfiammazione e dolore

La neuroinfiammazione è un processo infiammatorio “citochina-mediato” che può essere provocato da un danno tissutale sistemico o, più spesso, associato a un danno diretto a carico del sistema nervoso centrale (SNC). Si differenzia dall’infiammazione in altri tessuti per la scarsa presenza di vasi linfatici all’interno del parenchima cerebrale, per la mancanza di cellule endogene capaci di presentare l’antigene e per la presenza della barriera emato-encefalica, che riduce lo scambio di cellule immunitarie e mediatori dell’infiammazione con il circolo sanguigno.

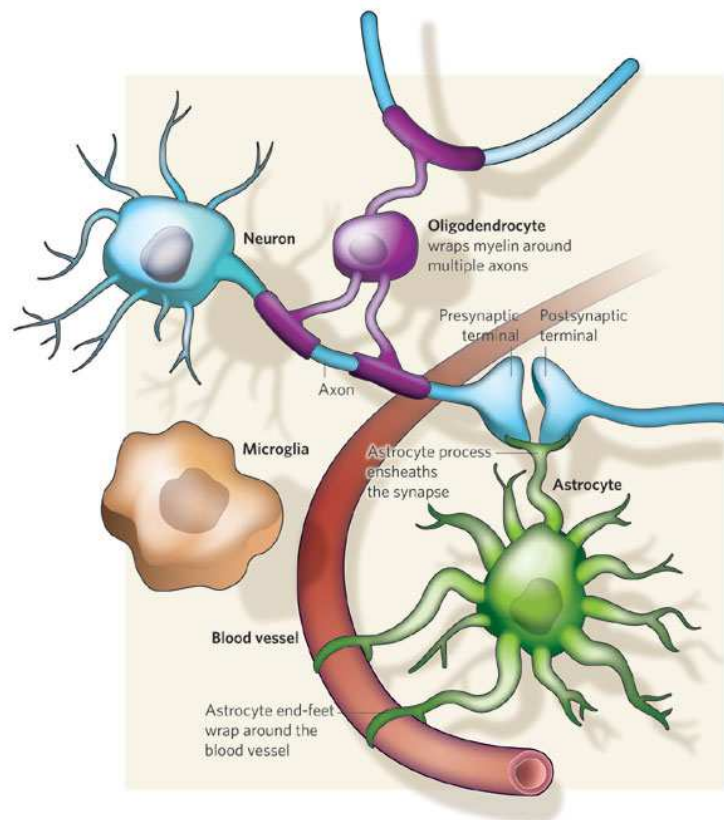
Durante il processo neuroinfiammatorio, cellule non neuronali del tessuto nervoso come le cellule microgliali e gli astrociti, vengono attivate e richiamate al sito di danno (Aloisi, 1999). Tale attivazione è stata ampiamente descritta in precedenza (Kreutzberg, 1996; Weiner and Selkoe, 2002), ma il reale impatto che essa esercita sulla patogenesi e/o l’eventuale progressione del danno rimane tutto da chiarire. In presenza di un processo neurotossico in atto, l’insieme delle risposte gliali potrebbe esacerbare il danno o, al contrario, esercitare un effetto neuroprotettivo, a seconda dell’equilibrio che si viene a determinare tra le funzioni citoprotettive e gli effetti citotossici legati all’attivazione di questa popolazione cellulare, dipendenti, a loro volta, dall’entità e dalla durata dello stimolo lesivo (Hirsch et al., 2003; Scharz and Kipnis, 2004). La persistenza dei processi infiammatori risulta in una risposta incontrollata che causa danno irreversibile ai neuroni fino a comprometterne l’integrità funzionale. Questi concetti generali si applicano a diversi stati patologici tra cui il dolore. È ormai ampiamente dimostrato che l’instaurarsi del dolore è accompagnato da un’intensa attivazione gliale (Paulsen et al., 1987; Hassel et al., 1992; Meller et al., 1994; Milligan et al., 2003).

#### 3.1.1 Attivazione delle cellule gliali e dolore

Nel sistema nervoso centrale è possibile distinguere tre tipi di cellule gliali: microglia, astroglia e oligodendrociti (Fig. 9). Tuttavia l’eventuale ruolo di questi ultimi nella nocicezione è ancora sconosciuto. Recenti studi dimostrano un ruolo delle cellule gliali non solo di “pulitori” in condizioni fisiologiche e patologiche ma anche possono contribuire, una volta attivate, ad iperalgesia ed allodinia in modelli di dolore cronico (Milligan and Watkins 2009). Mediatori quali glutammato, sostanza P, ATP, prostaglandine, bradikina e chemochine, rilasciate dai neuroni dopo danno centrale o periferico, possono indurre attivazione delle cellule gliali. In base ai diversi stimoli attivanti, è possibile avere diverse

## CAPITOLO 3 Neuroinfiammazione e dolore

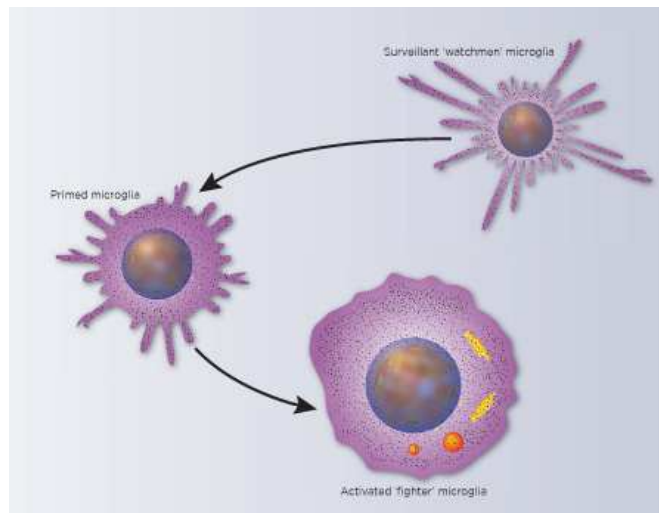
forme di attivazione: morfologica o secretoria. Entrambi influenzano la trasmissione sinaptica mediante il rilascio di prodotti attivi quali ATP, citokine. Il funzionale contributo delle cellule gliali alla nocicezione è supportato da osservazioni che inibitori dell'attivazione astrogliale e microgliale possono produrre considerevoli cambiamenti nel comportamento nocicettivo (Paulsen et al., 1987; Hassel et al., 1992; Meller et al., 1994; Milligan et al., 2000, 2001, 2003).



**Figura 9.** Cellule gliali presenti nel tessuto cerebrale ed i loro rapporti con i neuroni ed i vasi sanguigni. Questa interazione è di fondamentale importanza per le funzioni metaboliche e protettive del tessuto cerebrale.

### ***Microglia***

Si tratta di macrofagi circolanti che costituiscono il 10% della glia nel sistema nervoso centrale. La microglia, che in condizioni fisiologiche non è mai a riposo ma si trova in uno stato di motilità e sorveglianza del microambiente (Wake et al., 2009), sembra rispondere velocemente a danni al midollo spinale e a tessuti periferici con cambiamenti della morfologia, attività fagocitica, espressione di recettori e sintesi e rilascio di citochine inclusi  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-}\beta$  (Fig. 10).



**Figura 10.** Stadi di attivazione delle cellule microgliali: microglia a riposo che, grazie ai lunghi prolungamenti sorveglia continuamente il microambiente, primed microglia in fase di attivazione, in cui i suoi visibili prolungamenti si accorciano, microglia attivata che ha quasi del tutto perso i prolungamenti ed ha acquisito una conformazione tale da poter attuare la funzione fagocitica e secretoria.

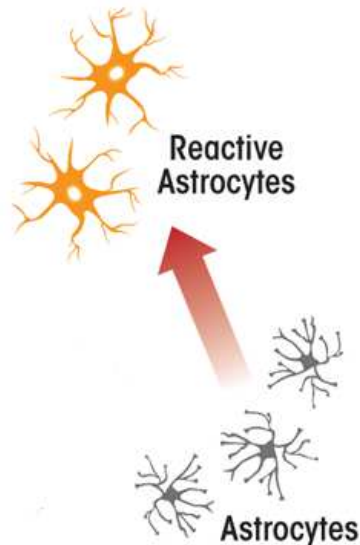
L'attivazione microgliale e le conseguenze relative a questa attivazione sono state ampiamente studiate in diversi modelli animali di dolore: modelli di dolore neuropatico, di danno traumatico, infiammatorio (Gehrmann et al., 1991; Colburn et al., 1997; Molander et al., 1997; Popovich et al., 1997; Coyle, 1998; Fu et al., 1999; Sweitzer et al., 1999; Hashizume et al., 2000, Raghavendra et al., 2004). Precedenti studi hanno dimostrato un ruolo microgliale nello sviluppo del dolore mediante l'utilizzo di inibitori selettivi di queste cellule. Un esempio è rappresentato dalla minociclina che, inibendo selettivamente il rilascio di diverse sostanze neuroeccitatorie dalle cellule microgliali, blocca lo sviluppo di dolore (Tikka et al., 2001; Tikka and Koistinaho, 2001).

Inoltre singole iniezioni di microglia attivata, all'interno del midollo spinale, inducono iperalgesia termica in topi, uno dei sintomi del dolore neuropatico (Narita M et al., 2006).

È noto anche che, in modelli di dolore neuropatico, il pattern temporale di attivazione coincide con l'aumento del dolore percepito dall'animale. Precedenti esperimenti di time course hanno mostrato l'attivazione microgliale nelle corna dorsali superficiali, ipsilaterali al danno periferico, già 24h dopo induzione del danno fino a 14 giorni dopo (Colburn et al., 1997; Coyle, 1998; Hashizume et al., 2000). Rimane tuttavia da chiarire il coinvolgimento della microglia nel dolore acuto-infiammatorio.

### *Astroglia*

Gli astrociti sono le cellule più numerose del sistema nervoso centrale. Essi costituiscono il 50% delle cellule gliali e mostrano eterogeneità nella loro morfologia e fisiologia (Matyash and Kettenmann 2010). L'attivazione astrocitaria in risposta a danni (es: danni spinali o periferici) si verifica con un lungo ritardo, rispetto a quanto accade per la microglia, ma persiste a lungo. Come per le cellule microgliali, gli astrociti, una volta attivati, cambiano la loro morfologia ed acquisiscono capacità secretorie (Fig.11).



**Figura 11.** Gli astrociti, una volta attivati, passano da una conformazione sottile ad una conformazione decisamente più robusta sia dal punto di vista dei prolungamenti che per il corpo cellulare.

Gli astrociti proteggono gli assoni dal danno e promuovono la plasticità neuronale producendo fattori trofici, quali FGF-2 e GDNF (Toyomoto et al., 2004). Grazie al loro intimo contatto con i vasi sanguigni, controllano il flusso sanguigno rilasciando vasocostrittori e vasodilatatori e possono rispondere a stimoli con elevati livelli di  $Ca^{2+}$ . Astrociti formano gap junction con astrociti adiacenti ed insieme formano una rete attraverso cui essi comunicano per lunghe distanze mediante flusso di calcio.

L'aumento di calcio può portare a sintesi e rilascio di sostanze proinfiammatorie e pronocicettive che possono ulteriormente attivare gli astrociti (Scemes and Giaume 2006) o altre cellule antinfiammatorie (Bèlanger e Magistretti, 2009; Milligan e Watkins, 2009).

Nella prima fase di attivazione dopo danno periferico, gli astrociti rimuovono l'eccesso di glutammato, grazie alla presenza di specifici trasportatori sulla loro superficie (GLT1: glutamate transporter 1 e GLAST: glutamate-aspartate transporter) riducendo pertanto la trasmissione eccitatoria sinaptica (Sung et al., 2003; Tawfik et al., 2006). In questa fase

## CAPITOLO 3 Neuroinfiammazione e dolore

---

precoce di attivazione, gli astrociti sono in grado di rilasciare citochine anti-infiammatorie, quali IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ , ed esprimere i recettori per gli endocannabinoidi (CB) sulla loro superficie (Benveniste et al., 2007). Durante una condizione cronica, in cui si ha una persistente stimolazione nocicettiva, come il dolore di tipo neuropatico, le cellule gliali persistono nella loro forma attivata. E' stato suggerito che un'attivazione cronica di cellule astrocitarie, in seguito a danno periferico, comporta una downregolazione dei trasportatori per il glutammato, quindi una ridotta rimozione di glutammato dallo spazio extracellulare ed un aumento della trasmissione eccitatoria sinaptica (Tawfik et al., 2006; McMahon et al., 2005), accompagnato dal rilascio di citochine proinfiammatorie quali, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Benveniste et al., 2007). Tuttavia l'esatto ruolo astrogliale, come anche quello microgliale, nel dolore acuto-infiammatorio, e' tutt'oggi fonte di dibattito.

### **3.2 Neuroinfiammazione e sistema endocannabinoide**

Gli endocannabinoidi possono essere considerati neurotrasmettitori, ma hanno diverse caratteristiche di sintesi, storage, trasmissione e rimozione dallo spazio extracellulare. Possono essere rilasciati da neuroni ma anche dalle cellule gliali ed essi stessi possono regolarne le funzioni del sistema nervoso ed immunitario. Nelle cellule immunitarie, l'attivazione dei recettori cannabinoidi altera l'attività metabolica e le risposte durante i processi infiammatori. In seguito verrà discussa l'espressione dei recettori per i cannabinoidi nelle cellule gliali, microglia ed astroglia.

#### **3.2.1 Espressione dei recettori cannabinoidi in cellule microgliali**

L'espressione dei due recettori per i cannabinoidi più conosciuti e studiati, CB1 e CB2, cambia in base al fenotipo ed al profilo di attivazione microgliale. Recettori CB1 sono espressi da cellule microgliali in coltura, provenienti da molluschi, topi e ratti, ma non dall'uomo (Stefano et al., 1996; Waksman et al., 1999; Facchinetti et al., 2003). Tuttavia come questo recettore regoli la funzione cellulare della microglia rimane ancora controversa. Al contrario risulta più comprensibile il ruolo del recettore CB2 sulla funzione microgliale. Nel tessuto cerebrale i recettori CB2 sono espressi da cellule microgliali attivate, ma il loro fenotipo e la quantità di recettori espressi può variare in base al tipo di neuropatologia che li

## CAPITOLO 3 Neuroinfiammazione e dolore

---

attiva. Un importante esempio è dato dal midollo spinale di ratto dove l'induzione di dolore neuropatico upregola i CB2 microgliali, ma non accade lo stesso con induzione di dolore infiammatorio cronico (Zhang et al., 2003), anche se quest'ultimo punto risulta controverso.

Infatti un altro studio dimostra un upregolazione del recettore CB2 microgliale in risposta a cambiamenti infiammatori (Maresz et al., 2005). Un'aumentata espressione di CB2 microgliale è stata trovata in tessuto cerebrale di pazienti con patologie neurodegenerative, malattia di Alzheimer e sclerosi multipla, soprattutto quando queste cellule sono associate a placche che si accumulano in queste patologie (Benito et al., 2003). Un importante punto da non sottovalutare è che l'attivazione di CB2 sulla superficie delle cellule microgliali ne può regolare la funzione immunitaria. Per esempio, l'attivazione di CB2 da un lato aumenta la proliferazione e la migrazione delle cellule microgliali, dall'altro riduce il rilascio di fattori proinfiammatori come il TNF- $\alpha$  e radicali liberi (Walter et al., 2003; Carrier et al., 2004; Ramirez et al., 2005; Dirikoc et al., 2007). Questo potrebbe significare che stimolando l'espressione di CB2 sulle cellule microgliali, un numero maggiore di microglia "meno nociva" dovrebbe accumularsi nei siti di danno.

### **3.2.2 Espressione dei recettori cannabinoidi in cellule astrogliali**

Diversi studi riportano il ruolo dei recettori CB2 nella regolazione della funzione astrogliale in diversi modelli di dolore e malattie neurodegenerative, come è stato descritto precedentemente per la microglia (Cabral and Staab 2005).

Ulteriori studi rinforzano il ruolo dell'attivazione dei CB1 astrocitari nel controllo del funzioni metaboliche: per esempio l'attivazione di CB1 su astrociti di ratto aumenta il tasso di ossidazione del glucosio e ketogenesi, due meccanismi coinvolti nella fornitura di energia a livello cerebrale (Blázquez et al., 1999), dal livello vascolare, dove sono localizzati, ai neuroni. Tale ipotesi è convalidata dall'aumento del metabolismo energetico del tessuto cerebrale di ratto dopo esposizione a AEA e THC (Costa e Colleoni 2000). Tuttavia sono ancora da chiarire i meccanismi alla base di tali processi.

# **SCOPO DELLA TESI**

## SCOPO DELLA TESI

---

Lo scopo del progetto è stato quello di approfondire la relazione tra sistema endocannabinoide e dolore emicranico mediante modulazione del tono cannabinoide endogeno, secondario al blocco del catabolismo di AEA e 2-AG, in un modello animale di emicrania basato sulla somministrazione di NTG.

A tal proposito sono stati utilizzati tre inibitori idrolasici degli enzimi Fatty acid amide hydrolase (FAAH) e Monoacylglycerol lipase (MAGL) che, inibendo la degradazione di AEA e 2-AG, ne aumentano i livelli endogeni: URB602 (inibitore di MAGL), URB597 (inibitore aspecifico di FAAH) e URB937 (inibitore di FAAH periferica). La particolarità di quest'ultimo composto, gentilmente messo a disposizione dal Prof. Daniele Piomelli, Direttore del Dipartimento D3 (Drug Discovery and Development) dell'Istituto Italiano di Tecnologia (IIT) di Genova, è di non attraversare la barriera ematoencefalica, pertanto, essendo la sua azione periferica, eviterebbe l'insorgenza di effetti collaterali di tipo psichiatrico e la tossicità per il sistema nervoso centrale tipico dei cannabinoidi (Clapper et al., 2010).

In particolare è stato valutato:

- 1) l'effetto analgesico di tali inibitori in modelli animali di dolore fisiologico e infiammatorio, sia in condizioni basali che in condizioni iperalgesiche indotte dalla NTG,
- 2) variazione dell'attivazione neuronale in specifiche aree cerebrali attivate dalla somministrazione di NTG.

Inoltre, è stata investigata l'eventuale attivazione gliale, attraverso l'analisi morfologica atrogliale e microgliale, dopo somministrazione di NTG, nelle stesse aree cerebrali attivate dal farmaco. Tale valutazione, è stata effettuata anche in seguito al trattamento con gli inibitori idrolasici per identificare una possibile interazione con il sistema endocannabinoide.



**CAPITOLO 4**  
**MATERIALI E METODI**

## CAPITOLO 4 Materiali e Metodi

---

In questo progetto di ricerca sono stati utilizzati ratti maschi Sprague Dawley (200-250 g), trattati con tre noti inibitori idrolasici: URB602 (2mg/kg, i.p., Cayman chemical) inibitore di MAGL, URB597 (2mg/kg, i.p., Cayman chemical) inibitore di FAAH e URB937 (1mg/kg, i.p.) inibitore periferico di FAAH, al fine di testare tali farmaci in un modello animale di emicrania basato sulla somministrazione di NTG (10mg/kg i.p.).

Per una migliore comprensione, il piano sperimentale è stato suddiviso in 3 parti:

**FASE 1:** valutazione del comportamento nocicettivo, mediante Tail Flick test (modello di dolore fisiologico) e Formalin test (modello di dolore infiammatorio);

**FASE 2:** valutazione dell'attivazione neuronale nelle stesse aree cerebrali attivate da NTG;

**FASE 3:** valutazione dell'attivazione astrogliale e microgliale.

La scarsa solubilità in salina di questi composti ha rappresentato inizialmente un fattore limitante e, dopo diverse prove, sono stati solubilizzati in 100% di Dimetilsolfossido (DMSO), un noto solvente organico. Per evidenziare l'eventuale effetto del DMSO sulla soglia algica sono stati inclusi animali di controllo, trattati con il solo DMSO.

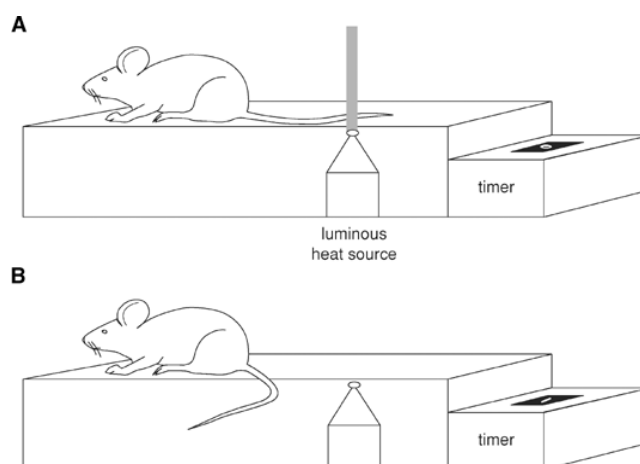
### **4.1 FASE 1: valutazione del comportamento nocicettivo mediante Tail Flick e Formalin test**

#### **Tail Flick test (modello di dolore fisiologico)**

Un animale per volta è stato posto sulla piattaforma di registrazione dello strumento Tail Flick (modello 7360, Ugo Basile) con la coda in prossimità di una luce laser. In questo modo è stato possibile registrare la latenza (misura del dolore fisiologico), ossia il tempo che l'animale impiega a spostare la coda dal fascio di luce ad alta intensità. La retrazione della coda dell'animale comporta l'interruzione del passaggio della luce ad infrarossi e il timer, collegato allo strumento, si ferma automaticamente. Un cut-off limite di esposizione pari a 20 secondi è stato impostato per evitare danni ai tessuti.

La misurazione (in secondi) è stata effettuata in tre punti diversi della coda e la media delle tre misurazioni è stata usata come soglia basale del dolore fisiologico (Fig. 12).

## CAPITOLO 4 Materiali e Metodi



**Figura 12.** Misurazione della soglia fisiologica al Tail flick test dopo esposizione al calore. La retrazione della coda dell'animale dopo l'esposizione comporta l'interruzione del passaggio della luce ad infrarossi e il timer collegato dello strumento si ferma automaticamente.

Gli animali sono stati divisi in 8 gruppi sperimentali e i vari trattamenti, con la relativa tempistica, sono descritti in Tabella 2 e 3. Per una migliore comprensione del piano sperimentale, nella Figura 13 sono riassunti i tempi di somministrazione dei diversi composti, sia in condizioni basali (in assenza di NTG) che in condizioni iperalgesiche indotte dalla somministrazione di NTG. In condizioni basali la soglia algica è stata misurata prima dei trattamenti (T0h, baseline) e un'ora dopo la somministrazione degli inibitori (T1h), tempo in cui si esplica il massimo effetto analgesico (Fig.13A). In condizioni iperlagesiche da NTG, la soglia del dolore è stata misurata prima della somministrazione di NTG (T0h, baseline), prima della somministrazione degli inibitori (T3h) e a T4h che corrisponde al massimo picco d'azione di NTG e degli inibitori (Fig.13B).

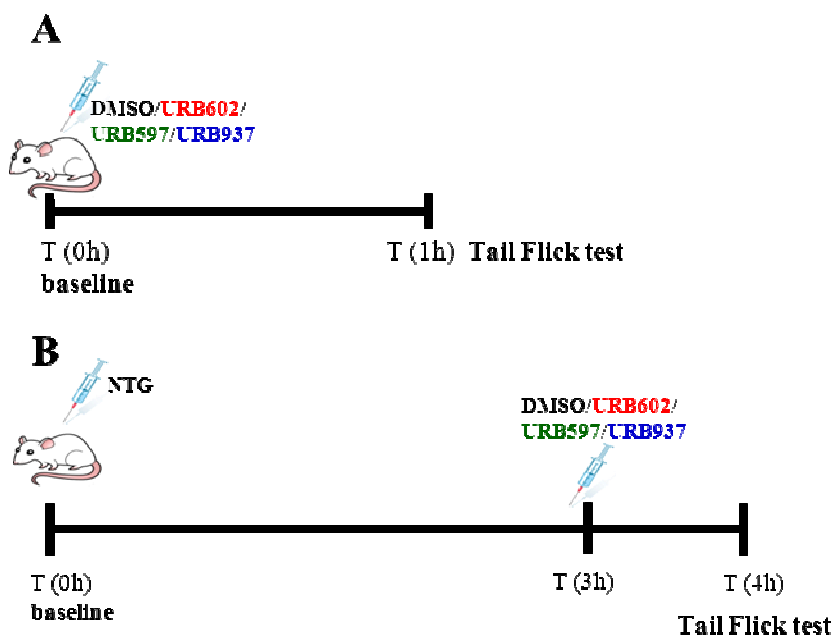
**Tabella 2.** Gruppi sperimentali sottoposti al Tail Flick test, in condizioni basali (in assenza di NTG).

GRUPPI	TRATTAMENTO (Fig. 13A)
DMSO	Somministrazione i.p. di DMSO (veicolo degli inibitori idrolasici). Dopo 1h dalla somministrazione di DMSO, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
URB602	Somministrazione i.p. di URB602 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
URB597	Somministrazione i.p. di URB597 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
URB937	Somministrazione i.p. di URB937 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)

## CAPITOLO 4 Materiali e Metodi

**Tabella 3.** Gruppi sperimentali sottoposti al Tail Flick test, in condizioni iperalgesiche indotte dalla somministrazione di NTG

GRUPPI	TRATTAMENTO (Fig. 13B)
NTG+DMSO	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di DMSO. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di DMSO, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
NTG+URB602	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB602. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB602, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
NTG+URB597	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB597. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB597, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
NTG+URB937	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB937. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB937, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)



**Figura 13.** Rappresentazione grafica dei tempi di somministrazione degli inibitori idrolasici e del DMSO (veicolo dei farmaci), (A) in condizioni basali (in assenza di NTG) e (B) in condizioni iperalgesiche indotte dalla somministrazione di NTG.

### Formalin test (modello di dolore infiammatorio)

Un animale per volta, dopo iniezione sottocutanea di 100µl di formalina al 1% sulla superficie plantare della zampa destra, è stato posto in una gabbia di plexiglas (10 × 20 × 24 cm) con uno specchio disposto a 45° per meglio consentire l'osservazione dei flinches/shakes, movimenti rapidi di flessione o scuotimento ripetuto della zampa, correlati al dolore di tipo infiammatorio nell'animale indotto dalla formalina. La risposta dolorifica è stata quantificata come numero totale di finches e di shakes per un minuto nell'intervallo da 1 a 5 min (Fase I) e, successivamente per periodi di 1 minuto ad intervalli di 5 minuti nel periodo compreso fra 10 e 60 min (Fase II) (Tjolsen Aberge et al., 1992, Hao et al., 2000, Tassorelli et al. 2003a e Tassorelli et al. 2003b).

## CAPITOLO 4 Materiali e Metodi

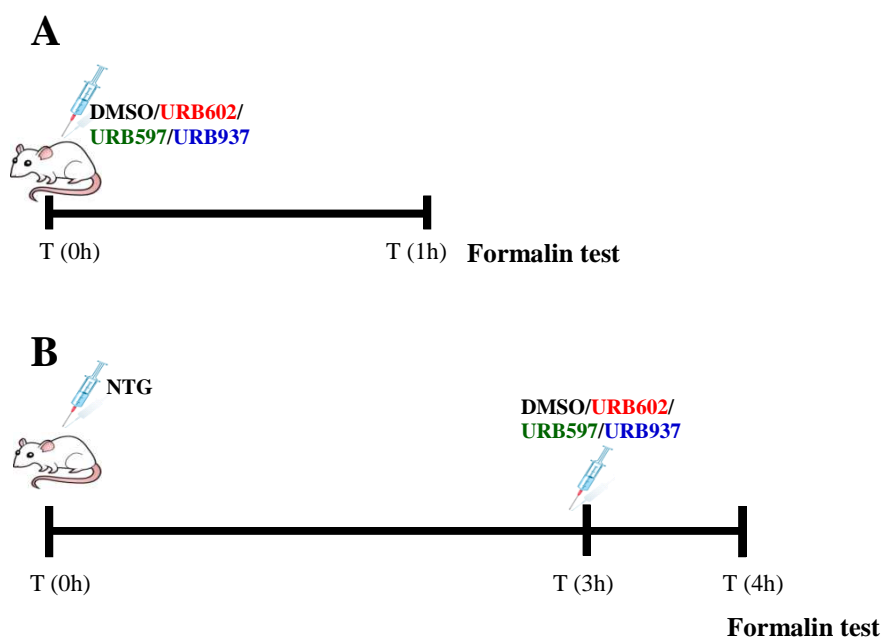
Gli animali sono stati divisi in 8 gruppi sperimentali e i vari trattamenti con la relativa tempistica sono riassunti nella Tabella 4 e 5. Una rappresentazione grafica dei tempi di somministrazione dei diversi composti, sia in condizioni basali (in assenza di NTG) che in condizioni iperalgesiche da NTG, è descritta nella Figura 14.

**Tabella 4.** Gruppi sperimentali sottoposti al Formalin test, in condizioni basali (in assenza di NTG).

GRUPPI	TRATTAMENTO (Fig. 14A)
DMSO	Somministrazione i.p. di DMSO (veicolo degli inibitori idrolasici). Dopo 1h dalla somministrazione di DMSO, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
URB602	Somministrazione i.p. di URB602 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
URB597	Somministrazione i.p. di URB597 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
URB937	Somministrazione i.p. di URB937 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)

**Tabella 5.** Gruppi sperimentali sottoposti al Formalin test, in condizioni iperalgesiche indotte dalla somministrazione di NTG

GRUPPI	TRATTAMENTO (Fig.14B)
NTG+DMSO	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di DMSO. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di DMSO, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
NTG+URB602	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB602. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB602, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
NTG+URB597	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB597. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB597, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)
NTG+URB937	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB937. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB937, gli animali sono stati sottoposti al test. (n= 7)



**Figura 14.** Rappresentazione grafica dei tempi di somministrazione degli inibitori idrolasici e del DMSO (veicolo dei farmaci), (A) in condizioni basali (in assenza di NTG) e (B) in condizioni iperalgesiche indotte dalla somministrazione di NTG.

### Valutazione Statistica

La soglia del dolore al Tail Flick test è stata espressa come media  $\pm$  SD e le differenze fra le misurazioni (latenza in secondi) sono state analizzate mediante test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn per confronti multipli (per misure non parametriche).

La risposta nocicettiva al Formalin test è stata espressa come numero di flinches and shakes, ripartiti nelle due fasi. Le differenze tra i gruppi sono state analizzate mediante l'analisi della varianza (ANOVA), il Tukey test per confronti multipli o il test "t" di Student nel caso di confronto tra due gruppi di trattamento.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante GraphPad Prism 5 e un livello minimo di significatività è stato fissato a  $p < 0.05$ .

### 4.2 FASE 2: valutazione dell'attivazione neuronale dei nuclei cerebrali attivati da NTG

L'attivazione neuronale è stata valutata in condizioni basali e 4 ore dopo la somministrazione di NTG, tempo in cui si ha la massima espressione della proteina c-Fos (Tassorelli et al., 1995). In condizioni basali (in assenza di NTG) URB602, URB597 e URB937 sono stati somministrati 60 minuti prima del sacrificio (mediante perfusione transcardiaca), tempo in cui il loro effetto analgesico è massimo (Fig. 15A). In presenza di NTG, la valutazione dell'attivazione neuronale è stata effettuata 4 ore dopo la somministrazione di NTG e 60 minuti dopo la somministrazione degli inibitori, che corrisponde al massimo picco d'azione di entrambi i trattamenti (Fig. 15B). Gli animali sono stati divisi in 8 gruppi sperimentali e i vari trattamenti con le tempistiche sono mostrati in Tabella 6 e 7. Una rappresentazione grafica dei tempi di somministrazione dei diversi composti è mostrata in Figura 15.

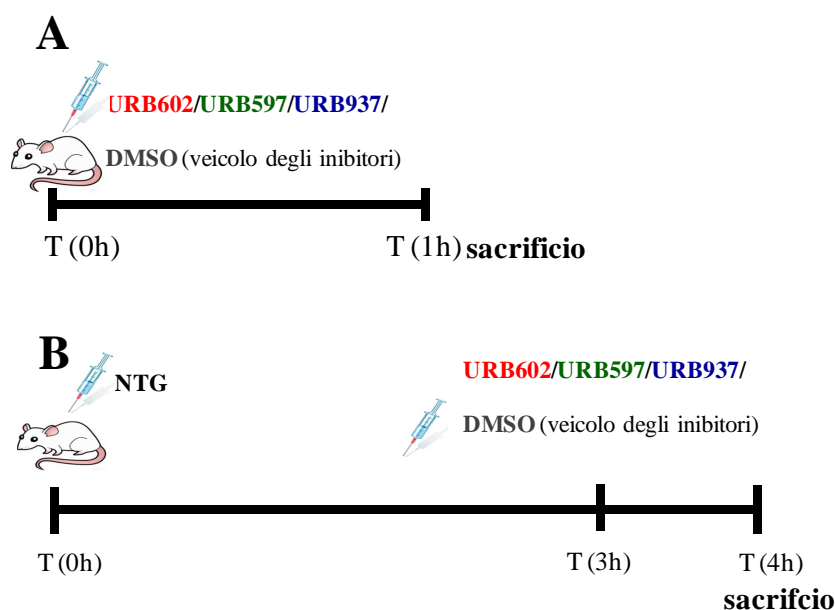
**Tabella 6.** Gruppi sperimentali sottoposti a valutazione dell'attivazione neuronale, in condizioni basali (in assenza di NTG).

GRUPPI	TRATTAMENTO (Fig. 15A)
<b>DMSO</b>	Somministrazione i.p. di DMSO (veicolo degli inibitori idrolasici) e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)
<b>URB602</b>	Somministrazione i.p. di URB602 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)
<b>URB597</b>	Somministrazione i.p. di URB597 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)
<b>URB937</b>	Somministrazione i.p. di URB937 e dopo 1h dalla somministrazione, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)

## CAPITOLO 4 Materiali e Metodi

**Tabella 7.** Gruppi sperimentali sottoposti valutazione dell'attivazione neuronale, in presenza di NTG

GRUPPI	TRATTAMENTO (Fig. 15B)
NTG+DMSO	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di DMSO. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di DMSO, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)
NTG+URB602	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB602. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB602, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)
NTG+URB597	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB597. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB597, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)
NTG+URB937	Somministrazione i.p. di NTG seguita, dopo 3h, dalla somministrazione di URB937. Dopo 60 minuti dalla somministrazione di URB937, gli animali sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca. (n= 5)



**Figura 15.** Rappresentazione grafica dei tempi di somministrazione degli inibitori idrolasici e del DMSO (veicolo dei farmaci), (A) in condizioni basali (in assenza di NTG) e (B) in presenza di NTG.

### Perfusione transcardiaca

Gli animali sono stati sacrificati, mediante iniezione i.p. di idrato di cloralio (400mg/kg). In ciascun animale, è stato eseguito un taglio sagittale sul piano cutaneo della regione toracica per permettere l'incannulazione dell'aorta attraverso il ventricolo sinistro. Successivamente, attraverso una pompa peristaltica, è stata fatta fluire prima una soluzione fredda di lavaggio (NaCl 0,9%) poi la soluzione fredda di fissaggio (paraformaldeide 4% in PBS). Il passaggio di entrambe le soluzioni di perfusione è stato mantenuto ad una velocità costante per ciascun animale. Dopo la procedura di perfusione i cervelli sono stati rimossi dal cranio, post fissati nella soluzione di fissaggio (paraformaldeide 4%) ed, in seguito, trasferiti in soluzioni crescenti di sucrosio (10%, 20% e 30%). I campioni sono stati sezionati, tramite un

## CAPITOLO 4 Materiali e Metodi

---

microtomo congelatore a slitta, in fettine di spessore di 50 $\mu$ m e conservate in una soluzione antifreeze a -20°C fino al processamento mediante immunostochimica.

### **Immunofluorescenza**

Le sezioni sono state idratate utilizzando un tampone fosfato salino (PB), permeabilizzate in PB/Triton-X100 e contemporaneamente i siti specifici bloccati mediante l'incubazione con siero di capra al 3% per 1h a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo primario overnight a temperatura ambiente (c-Fos 1:20000; Calbiochem). In seguito è stato utilizzato un appropriato anticorpo secondario biotinilato alla concentrazione di 1:400 e lasciato per 90 minuti. Le sezioni sono state quindi incubate con un complesso avidina-biotina (ABC Elite; 1:250 Vectastain A plus 1:250 Vectastain B; Vector Laboratories, Burlingame, CA) per 30 min seguiti da uno passaggio di amplificazione del segnale con una soluzione di tiramide (1:75 per 7 min; PerkinElmer, Wellesley, MA). Infine, le sezioni sono state incubate con una soluzione di FITC Avidina per 2 ore (1:600). Tutte le sezioni sono state coperte con vetrino copri-oggetto utilizzando un gel di montaggio acquoso (Sigma) per proteggere la fluorescenza e conservate in scatole al buio a 4°C.

Le sezioni sono state visualizzate mediante un microscopio a fluorescenza (Zeiss) e le immagini scattate mediante il programma AxioVision Rel.

### **Valutazione Statistica**

Per l'analisi dei dati sono stati conteggiati i neuroni contenenti nuclei c-Fos positivi nelle varie aree cerebrali che rispondono, attivandosi, alla somministrazione di NTG mediante un sistema computerizzato di analisi di immagine (AxioVision Rel 4.8). I conteggi sono stati effettuati su tre sezioni in cui ciascun nucleo è rappresentato secondo una progressione rostro-caudale.

L'influenza del tipo di trattamento fra gruppi è stata valutata mediante il confronto fra i valori medi nei diversi gruppi utilizzando il test "t" di Student per dati non appaiati nel caso del confronto tra due gruppi. L'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal Tukey test per confronti multipli è stata usata nel caso di confronto tra più di due gruppi sperimentali. L'analisi statistica è stata effettuata mediante GraphPad Prism 5 e un livello minimo di significatività è stato fissato a  $p < 0.05$ .



### **4.3 FASE 3: valutazione dell'attivazione astrogliale e microgliale**

Le sezioni cerebrali utilizzate in questa fase sono state trattate come descritto precedentemente per la valutazione dell'attivazione neuronale (Tabella 6 e 7, Fig.15A e B).

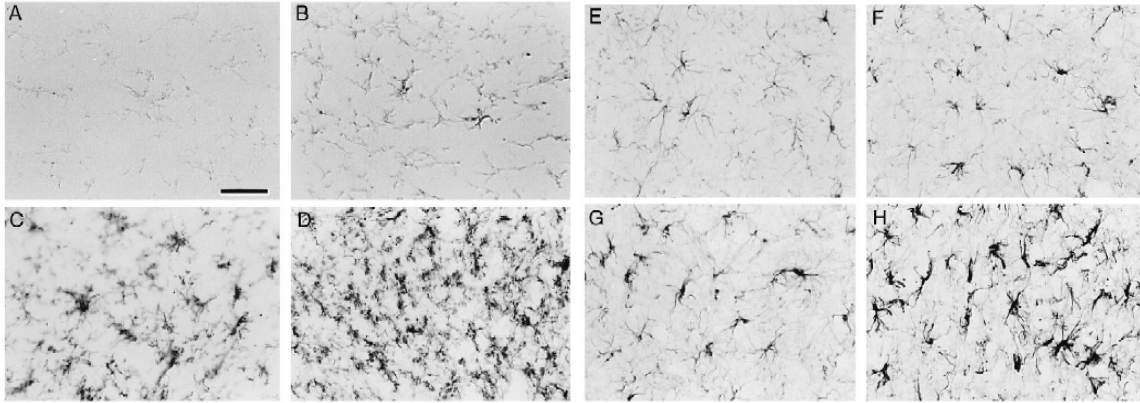
#### **Immunofluorescenza**

Le sezioni sono state idratate utilizzando un tampone fosfato salino (PB), permeabilizzate in PB/Triton-X100 e contemporaneamente i siti aspecifici bloccati mediante l'incubazione con siero di capra al 3% per 1h a temperatura ambiente. Le sezioni sono state poi incubate con l'anticorpo primario overnight a temperatura ambiente GFAP (marcatore astro gliale, 1:4000; Santa-Cruz) e Iba1 (marcatore microgliale, 1:1000). In seguito è stato utilizzato un appropriato anticorpo secondario biotinilato alla concentrazione di 1:400 e lasciato per 90 minuti. Le sezioni sono state quindi incubate con un complesso avidina-biotina (ABC Elite; 1:250 Vectastain A plus 1:250 Vectastain B; Vector Laboratories, Burlingame, CA) per 30 min seguiti da uno passaggio di amplificazione del segnale con una soluzione di tiramide (1:75 per 7 min; PerkinElmer, Wellesley, MA). Infine, le sezioni sono state incubate con una soluzione di Avidina legata al fluorocromo verde (FITC) per 2 ore (1:600). Tutte le sezioni sono state coperte con vetrino copri-oggetto utilizzando un gel di montaggio acquoso (Sigma) per proteggere la fluorescenza e conservate in scatole al buio a 4°C.

Tutte le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio confocale laser a scansione (Leica).

#### **Valutazione statistica**

Per l'analisi morfologica delle cellule astrogliali e microgliali è usata la scala di attivazione proposta dal gruppo di Colburn (1997) (Fig.16), secondo cui ad ogni stadio di attivazione è assegnato un grado che va da “•” (microglia ed astroglia a riposo) a “+++” (grado massimo di attivazione).



**Figura 16.** A–D. Microfotografie rappresentative degli stadi di attivazione microgliale mediante Iba1 ir (Colburn et al., 1997). (A) “•” microglia a riposo (non perturbata) molto ramificata ed apparenza sottile; (B) “+” microglia ancora ramificata, area ridotta attorno alle cellule. (C) “++” microglia poco ramificata, area tra le cellule è sempre più ridotta; (D) “+++” microglia con brevi proiezioni. E–H. Microfotografie rappresentative degli stadi di attivazione astrogliale mediante GFAP ir (Colburn et al., 1997). (E) “•” astroglia a riposo (non perturbata) con sottili proiezioni e distanziate tra loro; (F) “+” astroglia ancora ramificata, area ridotta attorno alle cellule; (G) “++” astroglia poco ramificata, area tra le cellule è sempre più ridotta per l’aumento della densità; (H) “+++” astroglia con proiezioni corte e spesse.

# **CAPITOLO 5**

## **RISULTATI**

Per una migliore comprensione del piano sperimentale, i risultati ottenuti nel presente studio sono stati suddivisi in 3 parti:

**FASE 1:** Valutazione del comportamento nocicettivo mediante Tail Flick test e Formalin test;

**FASE 2:** Valutazione dell'attivazione neuronale in specifiche aree cerebrali;

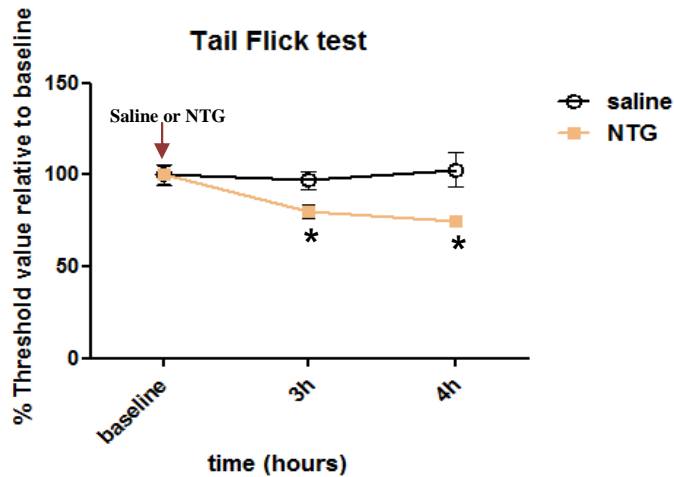
**FASE 3:** Valutazione dell'attivazione astrogliale e microgliale.

### **5.1 FASE 1: valutazione del comportamento nocicettivo mediante Tail Flick e Formalin test**

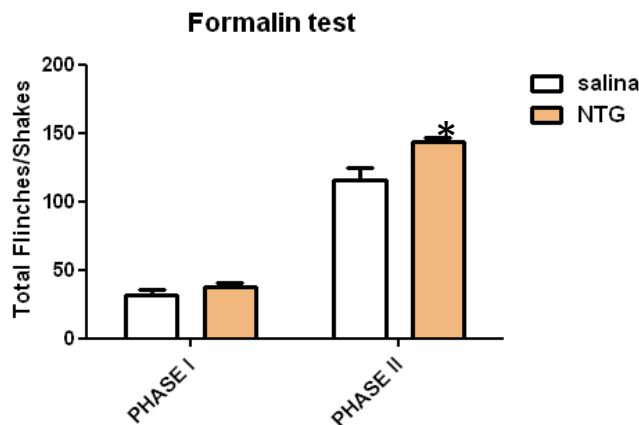
In questa parte sperimentale è stata valutata la variazione della soglia basale del dolore fisiologico, mediante Tail Flick test (modello di dolore fisiologico) e la variazione del comportamento nocicettivo nelle due fasi del Formalin test (modello di dolore infiammatorio), dopo trattamento con i tre inibitori idrolasici: URB602 (inibitore di MAGL), URB597 (inibitore di FAAH) e URB937 (inibitore periferico di FAAH), sia in condizioni basali che in condizioni iperalgesiche da NTG.

#### **5.1.1 Effetto iperalgesico di NTG al Tail Flick e Formalin test**

La somministrazione di NTG ha indotto una significativa riduzione della soglia algica al Tail Flick test, 3 e 4 ore dopo la sua somministrazione rispetto al valore di latenza basale (baseline) confermando dati precedenti (Tassorelli et al., 2003). Nessuna variazione significativa della soglia basale è stata osservata dopo somministrazione di salina (veicolo NTG) (Fig. 17). Al Formalin test, la somministrazione di NTG ha indotto un aumento significativo del numero di flinches e shakes nella seconda fase del test, fase detta "iperalgesica", rispetto al gruppo controllo (Fig.18).



**Figura 17.** Effetto iperalgesico indotto dalla somministrazione di NTG rispetto al gruppo trattato con soluzione salina (veicolo di NTG) al Tail Flick test. I dati sono espressi come variazione % della latenza media verso il basale (100%)  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  NTG vs baseline, Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test, per misure non parametriche.



**Figura 18.** Effetto iperalgesico indotto dalla somministrazione di NTG rispetto al gruppo trattato con soluzione salina (veicolo di NTG) al Formalin test. Gli istogrammi mostrano il numero totale di flinches/shakes nella Fase I e Fase II del Formalin test. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs salina, "t" test di Student.

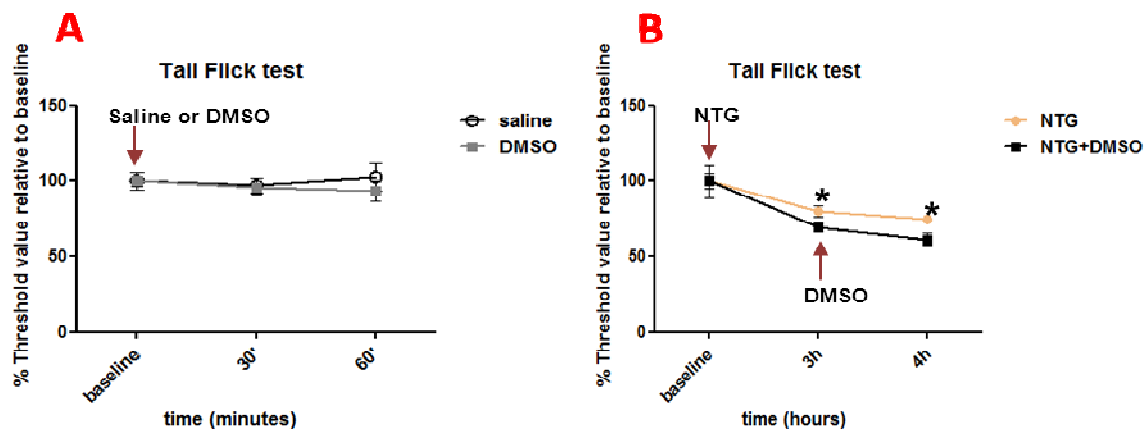
### 5.1.2 Effetto del DMSO sul comportamento nocicettivo al Tail Flick e al Formalin test

Per valutare l'influenza del DMSO (utilizzato per solubilizzare gli inibitori idrolasici) sulla soglia algica, alcuni animali sono stati trattati con DMSO e sottoposti al Tail Flick test e al Formalin test. Al Tail Flick test, la soglia nocicettiva è stata misurata prima della somministrazione di DMSO (baseline), 30 e 60 minuti dopo. I dati ottenuti non hanno mostrato nessuna variazione significativa della soglia algica verso il basale (baseline) (Fig.19A). La somministrazione di NTG in associazione al DMSO ha ridotto in maniera

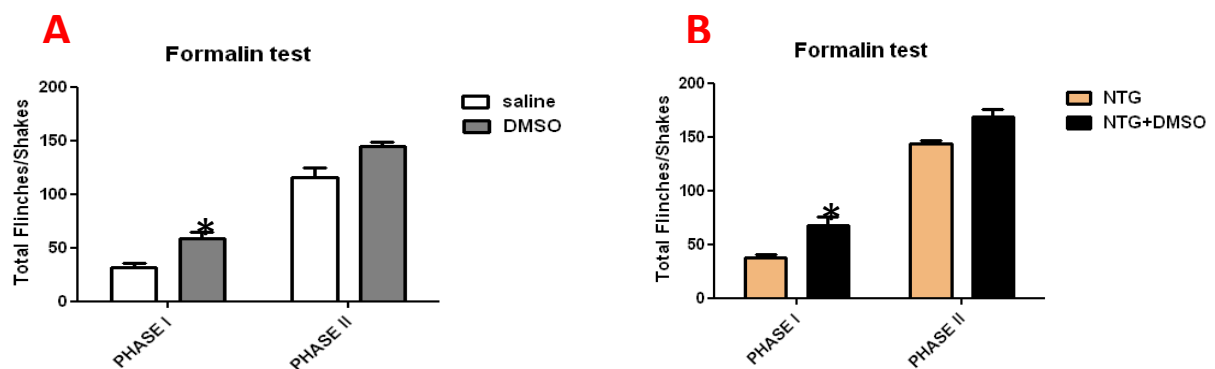
## CAPITOLO 5 RISULTATI

significativa la latenza al Tail Flick test, 3 e 4 ore dopo la sua somministrazione, come osservato per il gruppo NTG. Tale risultato dimostra che l'effetto sulla soglia è dato solo dalla somministrazione di NTG (Fig.19B).

Al Formalin test, la somministrazione di DMSO ha indotto un aumento significativo del comportamento nocicettivo solo nella prima Fase del test, rispetto al gruppo salina. Nessun aumento significativo è stato evidenziato nella Fase II del test, detta iperalgesica, rispetto al gruppo salina (Fig.20A). L'effetto del DMSO è stato valutato anche in presenza di NTG e confrontato con il gruppo NTG (Fig.20B). I dati ottenuti hanno confermato un aumento significativo del numero di flinches e shakes solo nella Fase I nel gruppo NTG+DMSO rispetto al gruppo NTG, dimostrando che l'effetto del DMSO è limitato alla prima fase.



**Figura 19.** Effetto della somministrazione di salina e DMSO (A), NTG e NTG+DMSO (B) al Tail Flick test. I dati sono espressi come variazione % della latenza media verso il basale (100%)  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  vs baseline, Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test, per misure non parametriche.

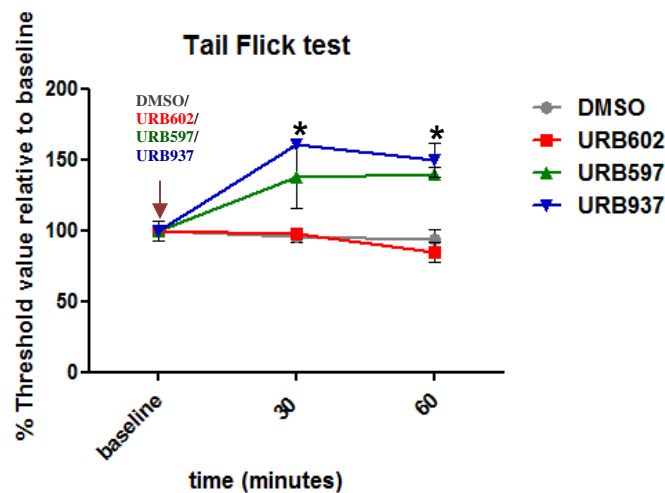


**Figura 20.** Effetto della somministrazione di salina e DMSO (A), NTG e NTG+DMSO (B) al Formalin test. Gli istogrammi mostrano il numero totale di flinches/shakes nella Fase I e Fase II del Formalin test. I dati sono espressi come media  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  vs DMSO (A), \* $p < 0.05$  vs NTG+DMSO (B), "t" test student.

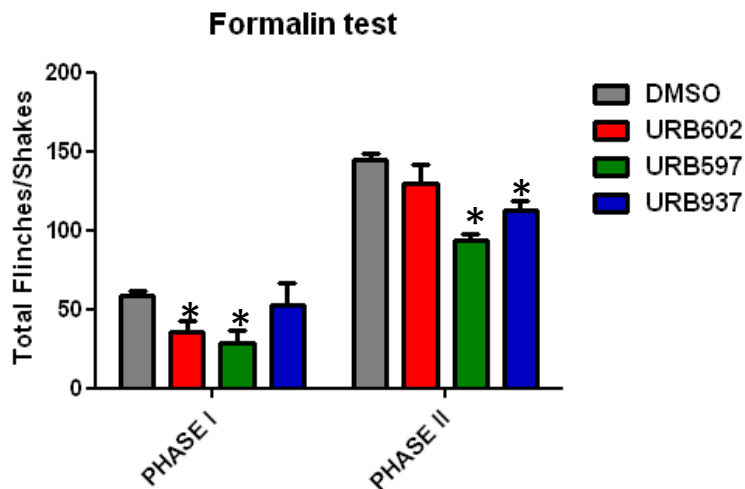
### 5.1.3 Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasici in condizioni basali (in assenza di NTG) al Tail Flick e Formalin test

In condizioni basali (in assenza di NTG), la soglia algica al Tail Flick test è stata misurata prima della somministrazione degli inibitori (baseline), 30 e 60 minuti dopo. Un aumento significativo della soglia del dolore è stato osservato 60 min dopo la somministrazione solo per URB597 e URB937, rispetto al valore baseline. La somministrazione di URB602 non ha modificato il comportamento nocicettivo rispetto al baseline (Fig.21).

Al Formalin test, la somministrazione di URB602 ha ridotto il comportamento nocicettivo solo nella prima fase del test. La somministrazione di URB597 ha ridotto invece il numero di finches/shakes in entrambe le fasi rispetto al controllo (DMSO). Infine, URB937 ha ridotto in maniera significativa il comportamento nocicettivo solo nella seconda fase del test, rispetto al gruppo controllo (Fig.22).



**Figura 21.** Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasici al Tail Flick test. I dati sono espressi come variazione % della latenza media verso il basale (100%)  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  URB597 e URB937 vs baseline. Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test, per misure non parametriche.



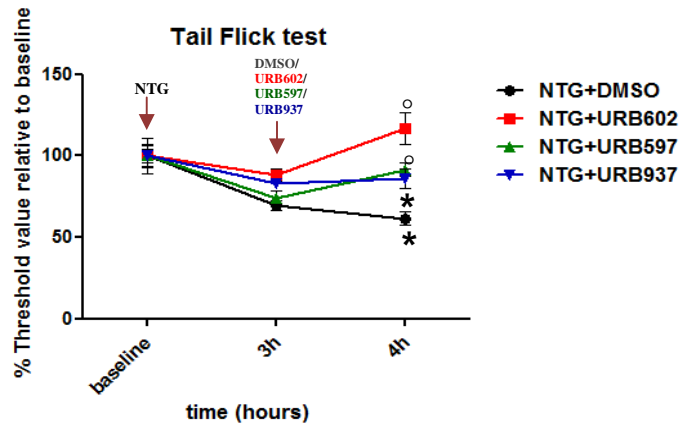
**Figura 22.** Effetto della somministrazione di DMSO (veicolo dei farmaci), URB602, URB597 e URB937 (in condizioni basali) al Formalin test. Gli istogrammi mostrano il numero totale di flinches/shakes nella Fase I e Fase II del Formalin test. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs DMSO, one-way ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test.

#### 5.1.4 Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasici in condizioni iperalgesiche indotte da NTG al Tail Flick e Formalin test

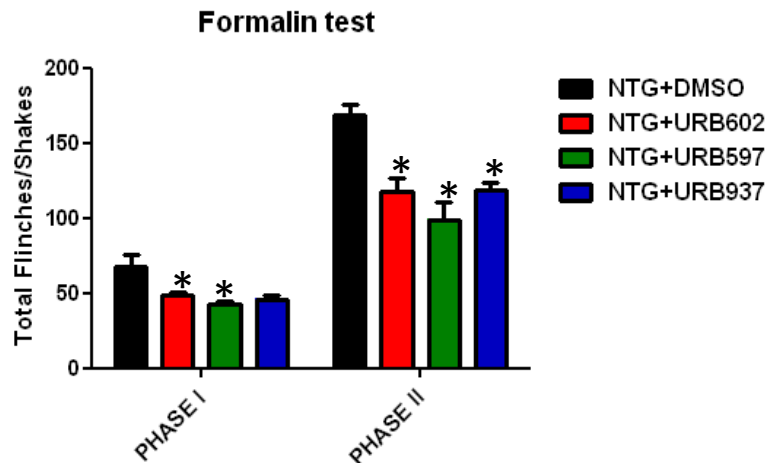
Al Tail Flick test, URB602 ha indotto un aumento significativo della soglia nocicettiva rispetto al valore di latenza basale (baseline) e quello misurato 3 ore dopo la somministrazione di NTG (T3h). Allo stesso modo la somministrazione di URB597 ha ridotto in maniera significativa l'iperalgia indotta da NTG e una variazione significativa infatti è stata riportata rispetto al tempo 3h. Al contrario la somministrazione di URB937 non ha ridotto l'iperalgia indotta da NTG, mostrando nessuna differenza significativa verso il tempo 3h (T3h). I dati sono riassunti nella Figura 23.

Al Formalin test, la somministrazione di URB602 e URB597 hanno ridotto in maniera significativa il comportamento nocicettivo in entrambe le fasi del test, rispetto al gruppo NTG+DMSO. La somministrazione di URB937 ha diminuito il numero di finche/shakes solo nella seconda fase del test (Fig. 24).





**Figura 23.** Effetto della somministrazione di URB602, di URB597 e di URB937 sull'iperalgia indotta dalla somministrazione di NTG al Tail Flick test. I dati sono espressi come variazione % di latenza media verso il basale (100%)  $\pm$ SEM. \* $p < 0.05$  NTG+DMSO e NTG+URB937 vs 3h e baseline,  $^{\circ}p < 0.05$  URB602 e URB597 vs 3h. ANOVA, Kruskal-Wallis test e Dunn's Multiple Comparison Test, per misure non parametriche.

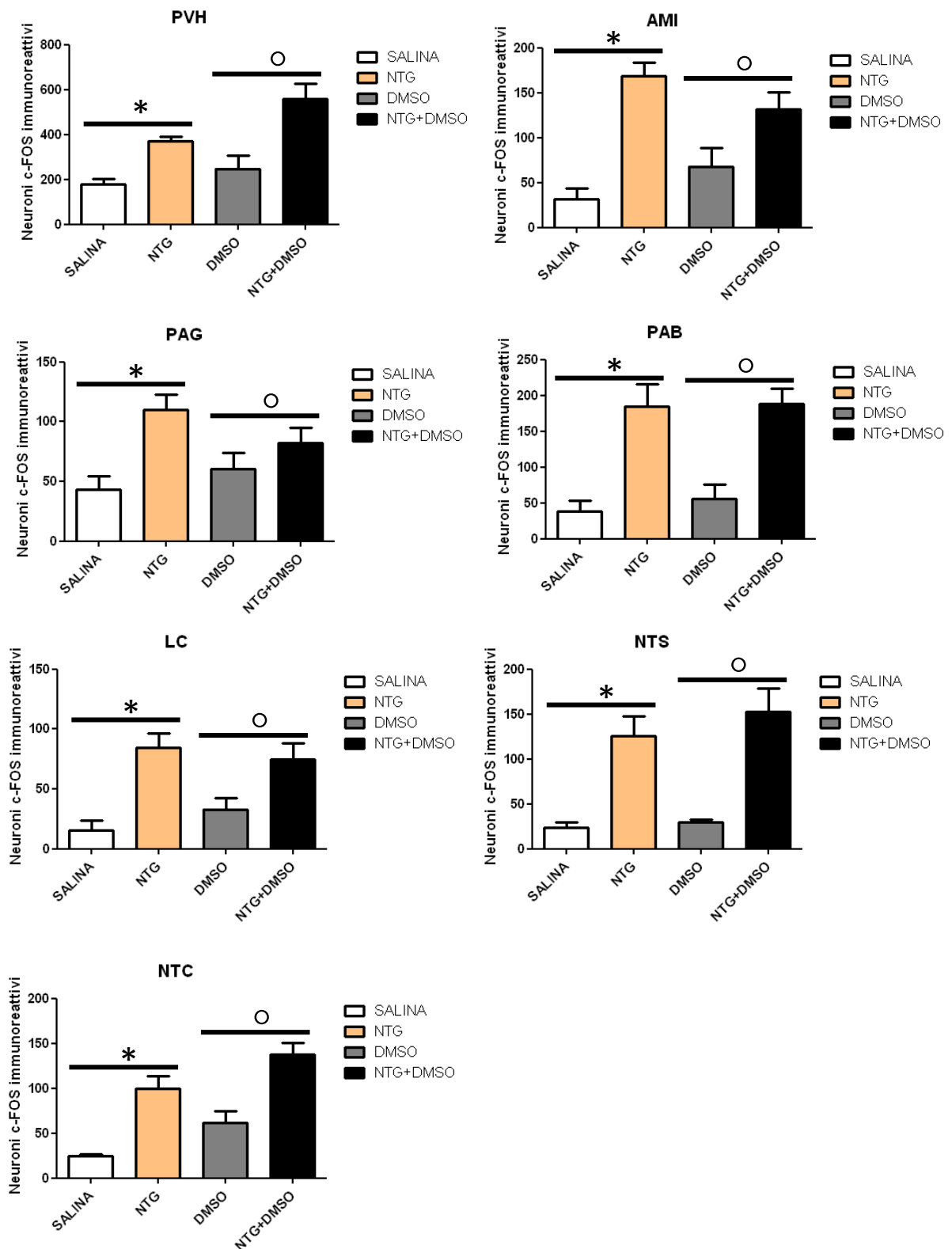


**Figura 24.** Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasici sull'iperalgia indotta da NTG al Formalin test. Gli istogrammi mostrano il numero totale di flinches/shakes nella Fase I e Fase II del Formalin test. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs NTG+DMSO, one-way ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test.

## 5.2 FASE 2: valutazione dell'attivazione neuronale

In accordo ai dati precedenti (Tassorelli C et al., 1995; Greco et al 2011), la somministrazione di NTG ha attivato i nuclei cerebrali situati nel prosencefalo (PVH e AMI) e nel tronco encefalico (PAG, PAB, LC, NTS, AP e NTC) rispetto al suo gruppo salina (veicolo di NTG) Tale attivazione era presente anche nel NTG+DMSO rispetto al solo gruppo DMSO. Nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra il gruppo DMSO e il gruppo salina (veicolo della NTG) (Fig.25).

## CAPITOLO 5 RISULTATI

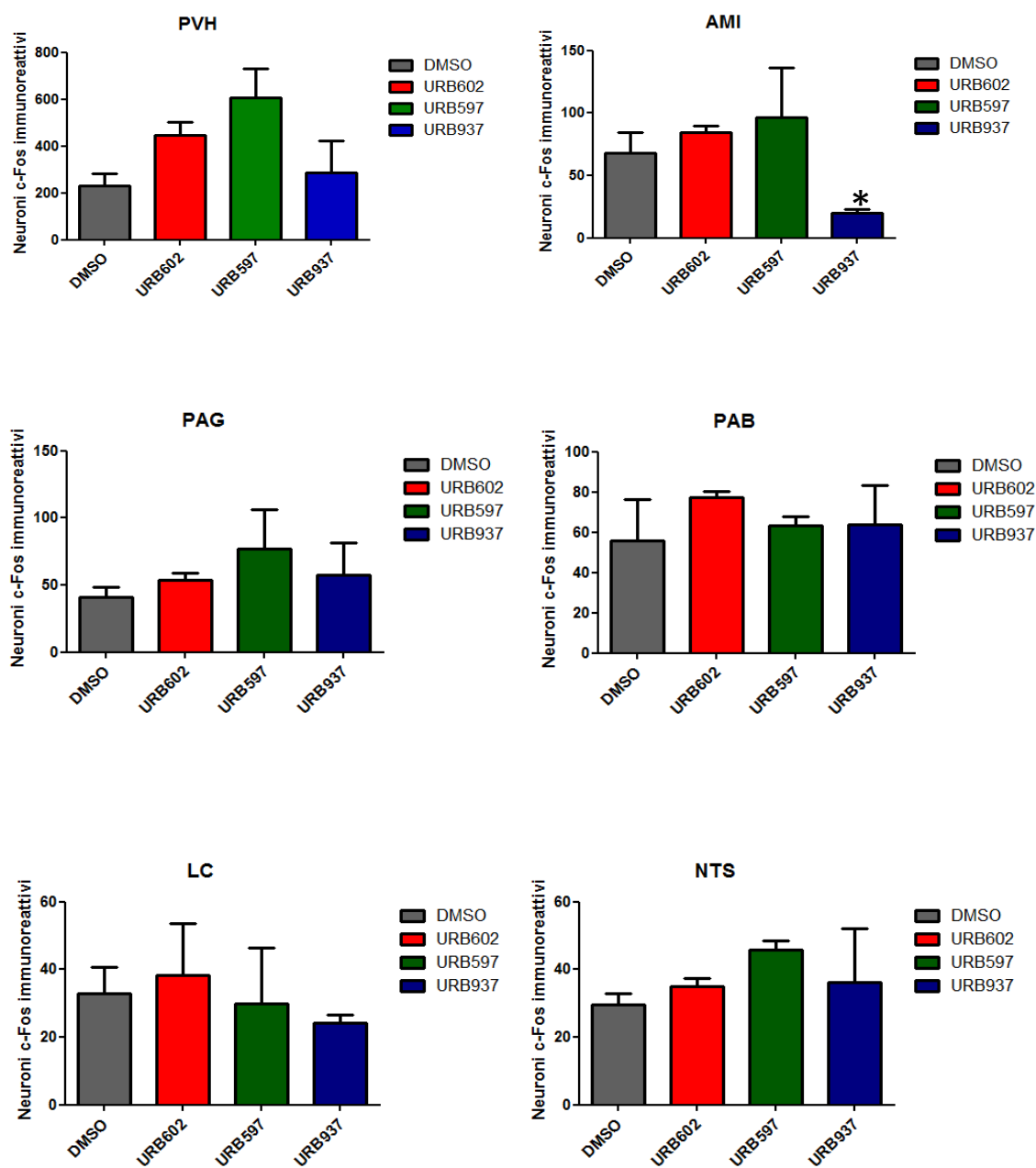


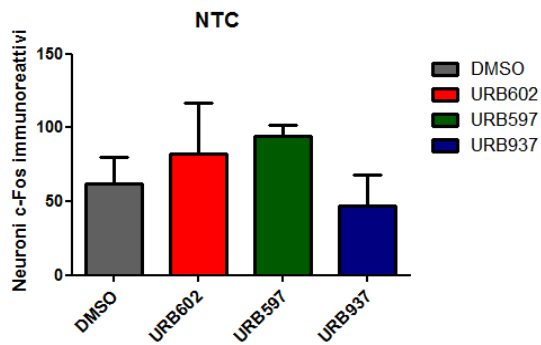
**Figura 25.** Attivazione neuronale indotta dalla somministrazione di NTG rispetto al gruppo trattato con soluzione salina (veicolo di NTG) o DMSO (veicolo degli inibitori idrolasici), a livello dei nuclei cerebrali analizzati (PVH, nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; AMI, nucleo centrale dell'amigdala; PAG, grigio periaqueduttale; PAB, nucleo parabrachiale; NTS, nucleo del tratto solitario; NTC, nucleo trigeminale caudale). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs salina, ° $p < 0.05$  vs DMSO, ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test.

## CAPITOLO 5 RISULTATI

### 5.2.1 Effetto degli inibitori idrolasici sull'attivazione neuronale in condizioni basali (in assenza di NTG)

In condizioni basali (in assenza di NTG), la somministrazione dei tre inibitori idrolasici non ha mostrato nessun effetto significativo sull'espressione della proteina c-Fos a livello dei nuclei analizzati, rispetto al gruppo trattato con DMSO. Solo URB937 ha ridotto l'espressione neuronale a livello del nucleo AMI (Fig.26).

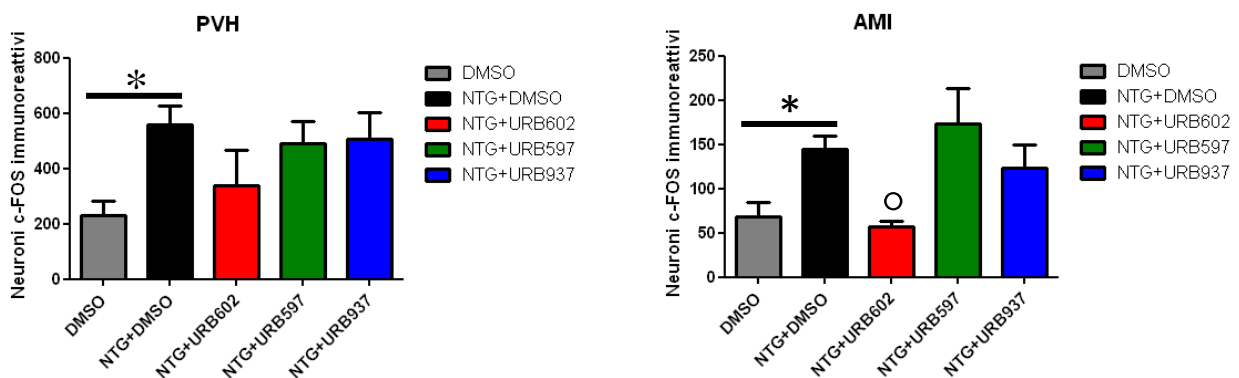




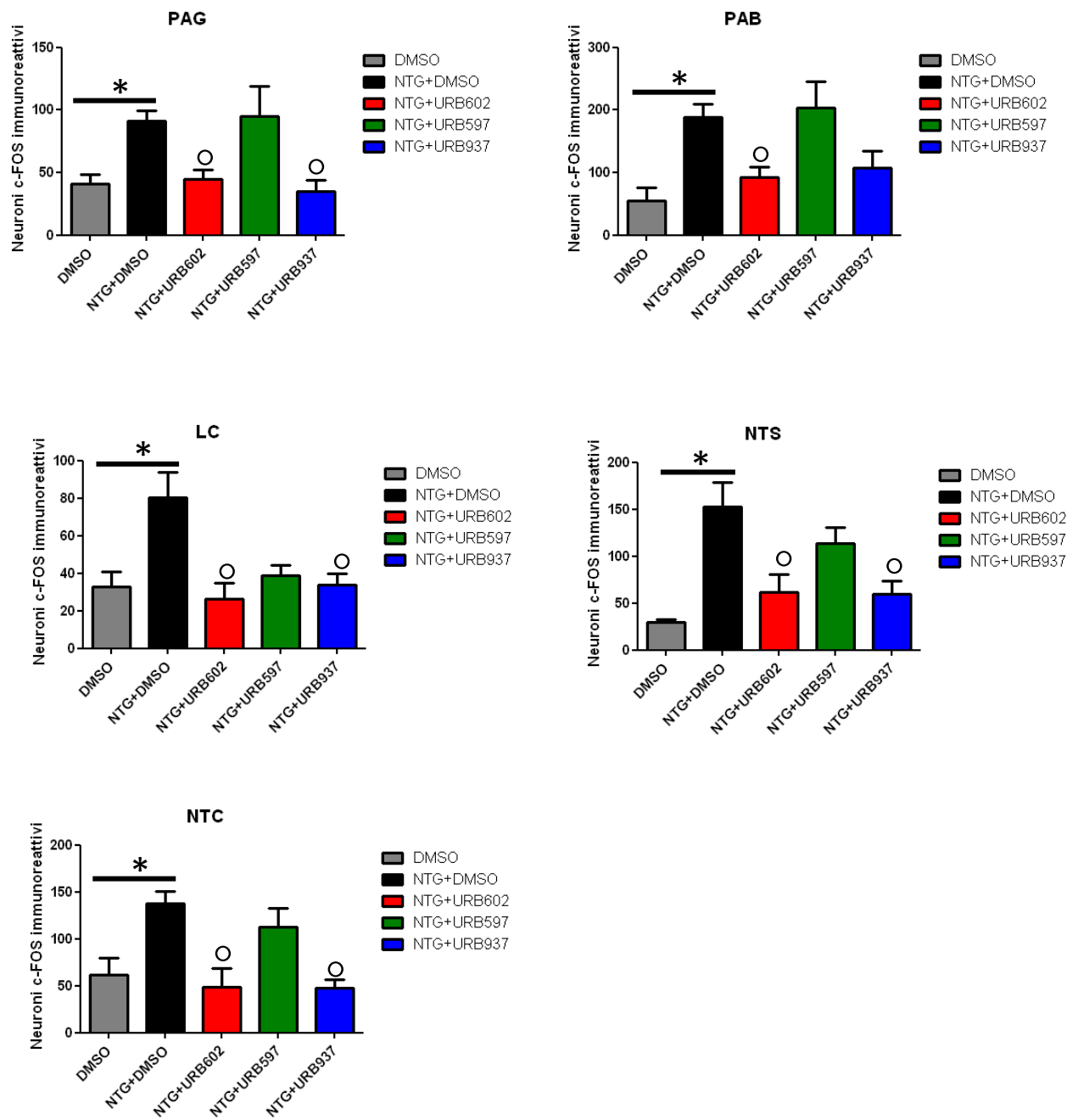
**Figura 26.** Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasi (URB602, URB597 e URB937) in condizioni basali (in assenza di NTG), a livello dei nuclei cerebrali analizzati (PVH, nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; AMI, nucleo centrale dell'amigdala; PAG, grigio periaqueduttale; PAB, nucleo parabrachiale; NTS, nucleo del tratto solitario; NTC, nucleo trigeminale caudale). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs DMSO (veicolo degli inibitori), one-way ANOVA, Tukey Multiple Comparison Test.

### 5.2.2 Effetto degli inibitori idrolasici sull'attivazione neuronale indotta da NTG

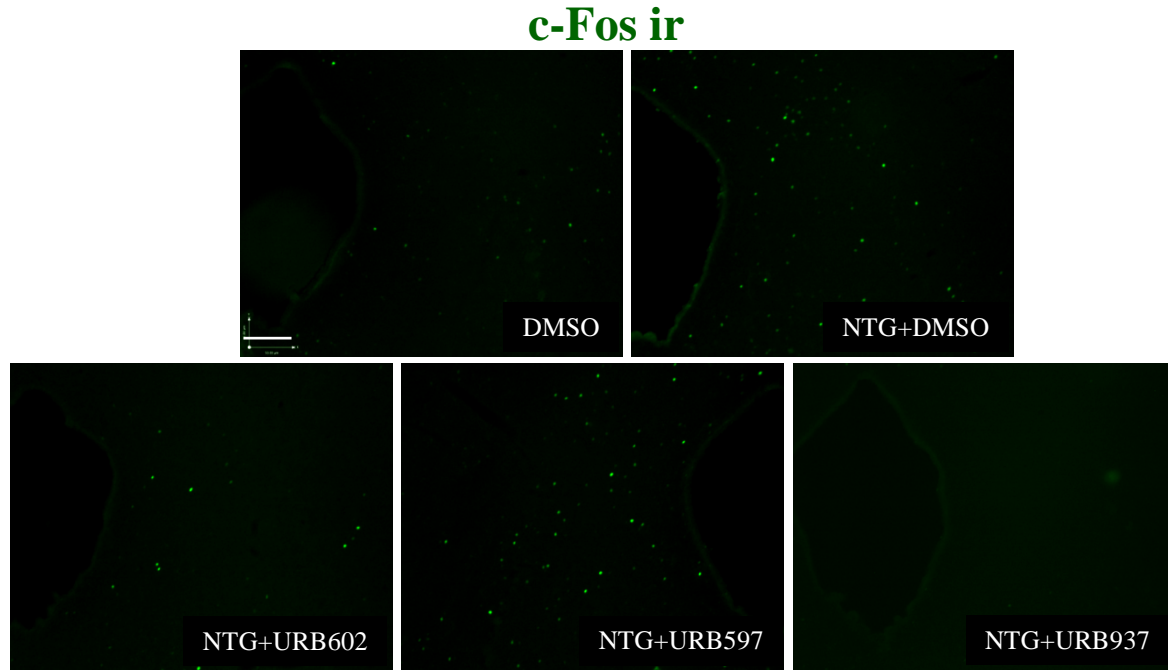
Il trattamento con URB602 ha ridotto significativamente l'attivazione neuronale, indotta da NTG, in quasi tutti i nuclei valutati, raggiungendo un livello statisticamente significativo a livello di AMI, PAG, PAB, LC, NTS e NTC, rispetto al gruppo NTG+DMSO. URB937 ha, invece, ridotto l'espressione della proteina c-Fos a livello del PAG, LC, NTS e NTC rispetto al gruppo NTG+DMSO. Nessuno effetto significativo sull'espressione di c-Fos è stato osservato dopo somministrazione di URB597 (Fig. 27). Nelle Figure 28 e 29 sono mostrate alcune sezioni rappresentative di PAG e NTC nei vari gruppi di trattamento.



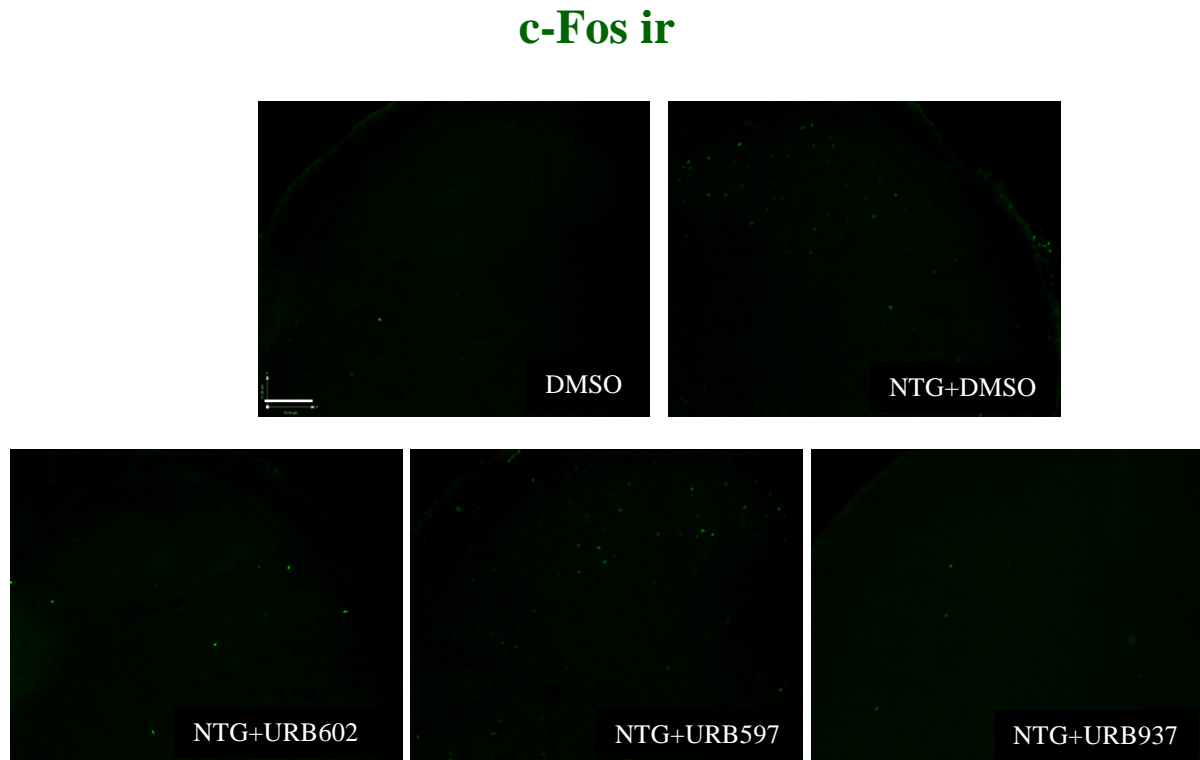
## CAPITOLO 5 RISULTATI



**Figura 27.** Effetto della somministrazione degli inibitori idrolasi (URB602, URB597 e URB937) sull'attivazione neuronale indotta da NTG, nei nuclei cerebrali analizzati (PVH, nucleo paraventricolare dell'ipotalamo; AMI, nucleo centrale dell'amigdala; PAG, grigio periaqueduttale; PAB, nucleo parabrachiale; NTS, nucleo del tratto solitario; NTC, nucleo trigeminale caudale). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs DMSO (veicolo degli inibitori),  $^{\circ}p < 0.05$  vs NTG+DMSO. ANOVA one-way e Tukey Multiple



**Figura 28.** Espressione della proteina c-Fos in sezioni rappresentative di PAG nei diversi gruppi di trattamento: DMSO (veicolo), NTG+DMSO, NTG+URB602, NTG+URB597, NTG+URB937. Scale bar: 100  $\mu$ m.



**Figura 29.** Espressione della proteina c-Fos in sezioni rappresentative di NTC nei diversi gruppi di trattamento: DMSO (veicolo), NTG+DMSO, NTG+URB602, NTG+URB597, NTG+URB937. Scale bar: 100  $\mu$ m.

## CAPITOLO 5 RISULTATI

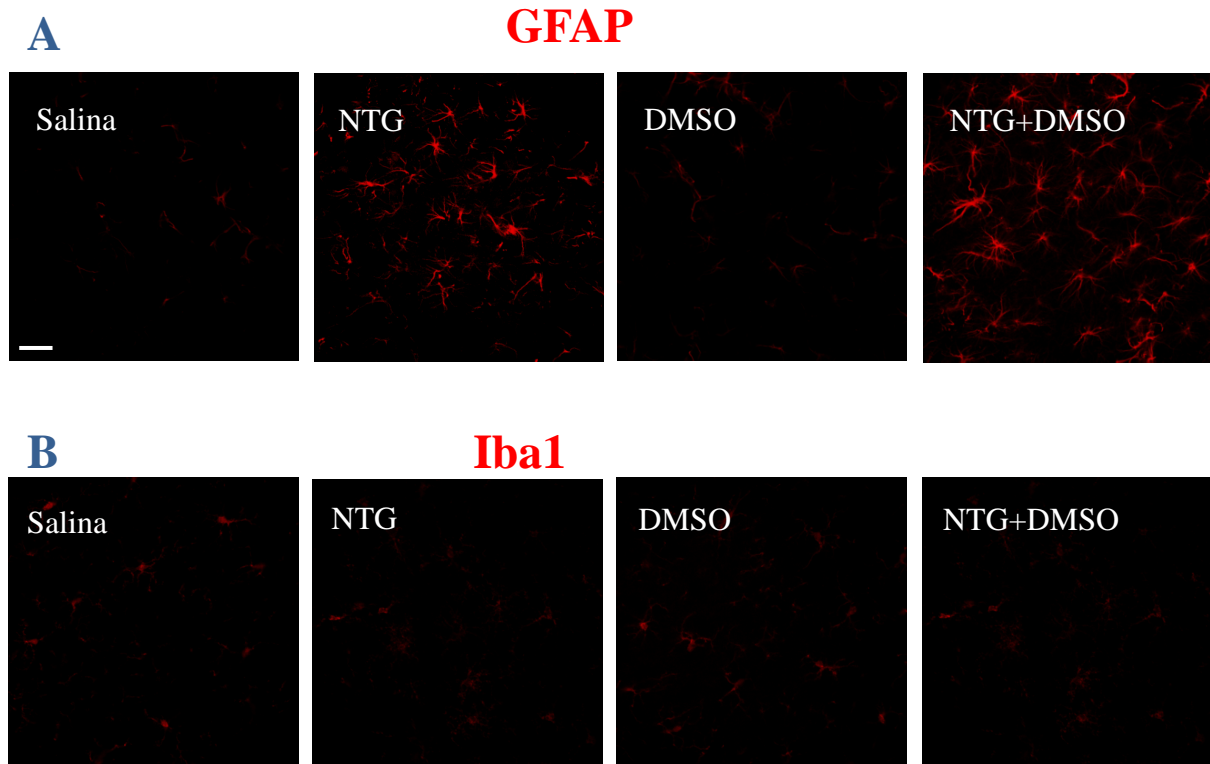
### 5.3 FASE 3: valutazione dell'attivazione astrogliale e microgliale

La caratterizzazione dell'attivazione astrogliale e microgliale, è stata effettuata attraverso la valutazione dell'analisi morfologica (secondo la scala di Colburn, 1997) delle cellule GFAP e di Iba1 positive, negli stessi nuclei cerebrali attivati da NTG, sia in condizioni basali che in condizioni iperalgesiche. Nessuna differenza è stata evidenziata nell'attivazione astrogliale e microgliale nei vari nuclei valutati tra il gruppo trattato con salina ed il gruppo DMSO. Al contrario, una lieve attivazione astrogliale (++) è stata evidenziata dopo somministrazione di NTG rispetto al gruppo salina. Tale condizione si è ripetuta in tutte le aree cerebrali quando la NTG è stata somministrata in presenza di DMSO (NTG+DMSO vs DMSO). Nessuna differenza significativa nel grado di attivazione della microglia è stata riportata nei nuclei cerebrali dei diversi trattamenti (Tabella 8). Nella figura 30 è rappresentata l'attivazione astrogliale e microgliale in sezioni rappresentative di PAG nel gruppo NTG e veicolo.

**Tabella 8.** Risposta gliale di animali trattati con salina o NTG, nei nuclei attivati da NTG.

	(A) ATTIVAZIONE ASTROGLIALE (GFAP-ir)				(B) ATTIVAZIONE MICROGLIALE (Iba1-ir)			
	salina	NTG	DMSO	NTG+DMSO	salina	NTG	DMSO	NTG+DMSO
<b>PVH</b>	•/+	++	+	++	+	+	+	+
<b>AMI</b>	•	+	•	+	+	+	+	+
<b>PAG</b>	•/+	++	•/+	++	+	+	+	+
<b>PAB</b>	+	++	+	++	+	+	+	+
<b>LC</b>	+	++	+	++	+	+	+	+
<b>NTS</b>	+	++	+	++	+	+	+	+
<b>NTC</b>	•	+	•	+	+	+	+	+

**A)** Tabella rappresentativa degli stadi di attivazione astrogliale mediante GFAP ir (Colburn et al., 1997) nei diversi gruppi di trattamento. “•” astroglia a riposo (non perturbata) con sottili proiezioni e distanziate tra loro; “+” astroglia ancora ramificata, area ridotta attorno alle cellule; “++” astroglia poco ramificata, area tra le cellule è sempre più ridotta per l'aumento della densità; (H) “+++” astroglia con proiezioni corte e spesse. **B)** Tabella rappresentativa degli stadi di attivazione microgliale mediante Iba1 ir (Colburn et al., 1997) nei diversi gruppi di trattamento. “•” microglia a riposo (non perturbata) molto ramificata ed apparenza sottile; “+” microglia ancora ramificata, area ridotta attorno alle cellule. “++” microglia poco ramificata, area tra le cellule è sempre più ridotta; “+++” microglia con brevi proiezioni.



**Figura 30.** Microfotografie rappresentative dell'attivazione astrogliale (A) e microgliale (B) nei diversi gruppi di trattamento a livello del PAG. Scale bar: 40  $\mu$ m.

### 5.3.1 Effetto degli inibitori idrolasici sull'attivazione microgliale e astrogliale in specifiche aree cerebrali

La somministrazione degli inibitori idrolasici in condizioni basali (in assenza di NTG) non ha mostrato nessuna evidente attivazione nelle varie aree analizzate, rispetto al gruppo trattato con DMSO. La somministrazione di URB602 e di URB937 dopo somministrazione di NTG, ha incrementato ulteriormente lo stato di attivazione astrogliale nel PAG, PAB e NTC rispetto al gruppo NTG+DMSO. Al contrario dopo somministrazione di URB597 in presenza di NTG, l'analisi morfologica dell'astroglia nelle varie aree non ha mostrato differenze rispetto al gruppo NTG+DMSO. Nessuna modificazione significativa dello stato di attivazione microgliale è stata evidenziata in tutti i gruppi di trattamento.

L'analisi morfologica dell'astroglia e della microglia, secondo la scala di Colburn, è riportata in tabella 9. Nelle Figure 31 e 32 sono mostrate sezioni rappresentative di PAG e NTC nei vari gruppi di trattamento.



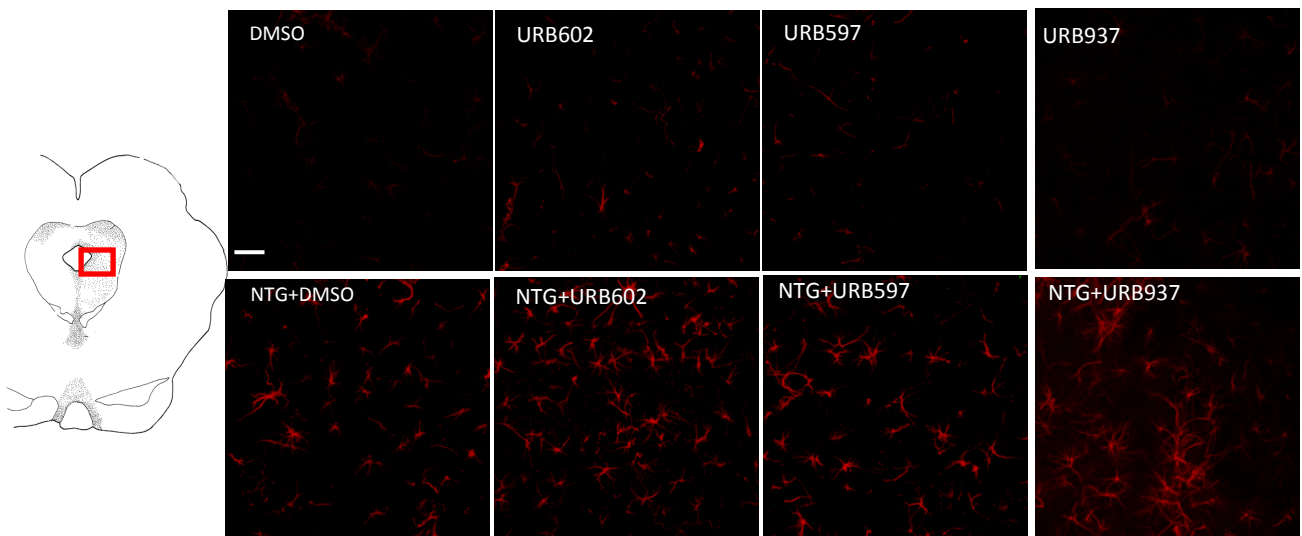
## CAPITOLO 5 RISULTATI

**Tabella 9.** Risposta astrogliale di animali trattati con salina o NTG, nei nuclei attivati da NTG.

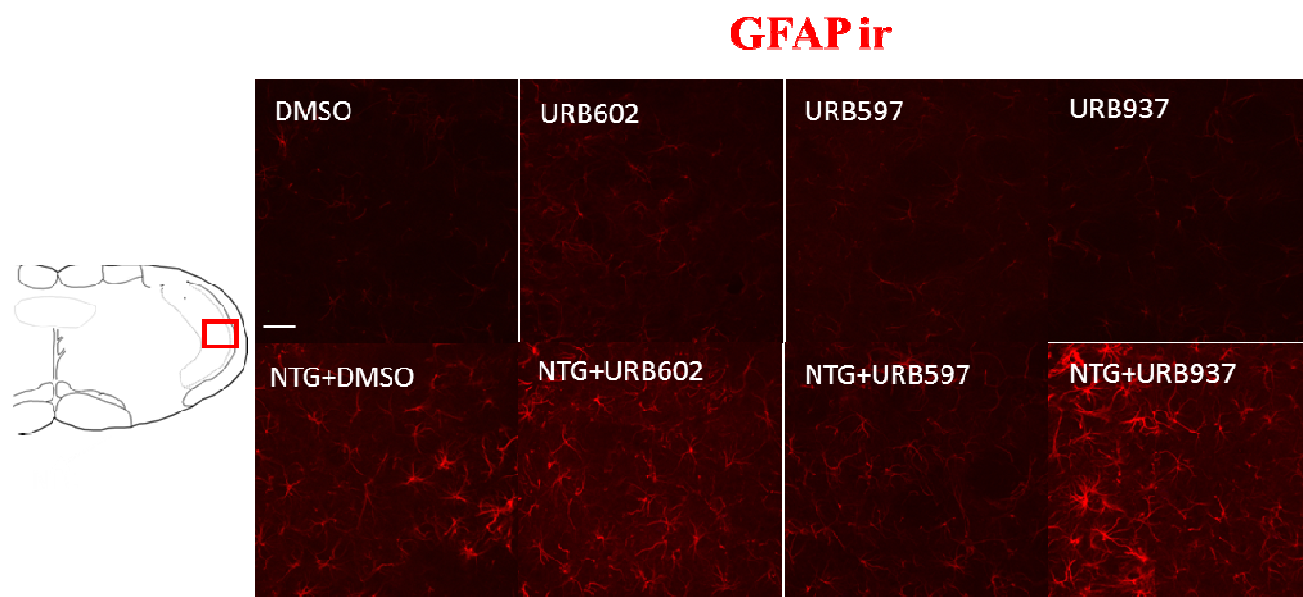
ATTIVAZIONE ASTROGLIALE (GFAP-ir)								
	In assenza di NTG				In presenza di NTG			
	DMSO	URB602	URB597	URB937	NTG+DMSO	NTG+URB602	NTG+URB597	NTG+URB937
<b>PVH</b>	+	+	+	+	++	++	++	++
<b>AMI</b>	•	+	+	+	+	+	+	+
<b>PAG</b>	+	+	•	+	++	+++	++	+++
<b>PAB</b>	+	+	+	+	++	+++	++	+++
<b>LC</b>	+	+	+	+	++	++	++	++
<b>NTS</b>	+	+	+	+	++	++	++	++
<b>NTC</b>	•	•	•	•	+	++	+	++

Tabella rappresentativa degli stadi di attivazione astrogliale mediante GFAP ir (Colburn et al., 1997) nei diversi gruppi di trattamento. “•” astrogliosi a riposo (non perturbata) con sottili proiezioni e distanziate tra loro; “+” astrogliosi ancora ramificata, area ridotta attorno alle cellule; “++” astrogliosi poco ramificata, area tra le cellule è sempre più ridotta per l’aumento della densità; (H) “+++” astrogliosi con proiezioni corte e spesse.

### GFAP ir



**Figura 31.** Microfotografie rappresentative dell’attivazione astrogliale nei diversi gruppi di trattamento a livello del PAG. Scale bar: 40 µm.



**Figura 32.** Microfotografie rappresentative dell'attivazione astrogliale nei diversi gruppi di trattamento a livello del NTC. Scale bar: 40  $\mu$ m.

# **CAPITOLO 6**

## **Discussione e Conclusioni**

### **6.1 Modello animale di emicrania: utilità e valenza del modello sperimentale utilizzato**

L'emicrania è un disordine neuro-vascolare complesso, caratterizzato da complicate relazioni fra meccanismi neuronali e vascolari, alcuni conosciuti altri da chiarire. Uno dei principali attori responsabili dell'attivazione del sistema trigemino vascolare è l'ossido nitrico (NO), che agisce attivando le fibre nervose sensoriali afferenti alle meningi, causando così il rilascio di neuropeptidi vasoattivi (Lassen et al., 1998, Olesen et al., 1993 Messlinger et al., 2000 Strecker et al. 2002) e ulteriore vasodilatazione, seguita da infiammazione neurogenica.

E' noto che la somministrazione sistemica di NTG, donatore di NO, evoca nei soggetti emicranici una crisi dolorosa con tutte le caratteristiche degli attacchi spontanei, che si manifesta abitualmente con un intervallo di alcune ore (Sicuteri et al., 1987; Iversen et al., 1989, 1994; Olesen et al., 1993, 1995; Buzzi et al, 2003; Sances et al., 2004; Tassorelli et al, 2006). Nell'animale induce attivazione neuronale di specifiche aree cerebrali, associata ad uno stato di iperalgesia, percepibile come ridotta soglia algica al Tail Flick test, o aumentato comportamento nocifensivo al Formalin test (Tassorelli e Joseph, 1995; Tassorelli et al., 1996, 1997, 1999, 2000, 2001, 2003, 2006; Buzzi e Tassorelli, 2003).

Diversi studi sperimentali e clinici hanno dimostrato importanti relazioni tra il sistema endocannabinoide ed emicrania (Russo et al. 2004; Sarchielli et al.,2007; Cupini et al., 2008; Greco et al, 2010; 2011). In soggetti con cefalea da abuso di farmaci è stata riportata una ridotta attività della FAAH piastrinica, associata ad un aumento del processamento spinale, in seguito a somministrazione di NTG. Gli autori hanno interpretato tale dato come effetto compensatorio alla possibile diminuzione dei livelli endogeni di AEA in questi pazienti (Perrotta et al., 2012). Tali risultati sono supportati dall'aumento della densità dei recettori CB1, in particolare nelle aree cerebrali che influenzano il dolore, avvalorando pertanto l'idea di una disfunzione del sistema endocannabinoide nei pazienti emicranici (Van der Schueren et al., 2011). Inoltre, sono noti gli effetti dei cannabinoidi sui recettori cerebrali della serotonina, che rappresentano il razionale per il loro impiego nel trattamento della crisi acuta e nella terapia profilattica dell'emicrania. I cannabinoidi, infatti, riducono la liberazione di serotonina dalle piastrine (Volfe et al., 1985) e ne modulano l'attività a livello cerebrale (Boger et al.,1998) riducendo la nausea, sintomo frequente durante l'attacco emicranico.

Studi effettuati dal gruppo di ricerca con cui collaboro, hanno riportato un'alterazione del sistema endocannabinoide in specifiche aree cerebrali di ratto dopo somministrazione di NTG

## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

(Greco et al., 2010). In particolare, i risultati ottenuti hanno mostrato che l'iperalgia indotta da NTG è associata ad una maggiore attività delle idrolasi FAAH e MAGL e densità dei recettori CB in specifiche aree cerebrali di ratto. Inoltre, Greco e collaboratori hanno dimostrato che la somministrazione sistemica di AEA (ad alto dosaggio, 20mg/Kg) riduce il comportamento nocifensivo al Formalin test, accompagnato da una riduzione dell'espressione della proteina c-Fos nel NTC, nucleo centrale nella modulazione del dolore cefalico (Greco et al., 2011).

Dalla scoperta di potenziali effetti analgesici degli endocannabinoidi, diversi studi hanno indirizzato il loro interesse sull'inibizione del catabolismo di AEA e 2-AG. In modelli di dolore acuto-infiammatorio, l'inibizione della FAAH e della MAGL, che aumenta i livelli endogeni rispettivamente di AEA e 2-AG, è in grado di indurre analgesia e ridurre l'infiammazione (Jhaveri et al., 2008; Guindon et al., 2011; Clapper et al., 2010).

Sebbene gli endocannabinoidi siano secreti dai neuroni, diversi dati confermano una loro produzione anche da parte di cellule gliali in condizioni di neuroinfiammazione (Walter et al., 2002; Skaper et al., 2013). La neuroinfiammazione causata dallo stravasamento proteico di neuropeptidi, come la sostanza P e il CGRP, rilasciati dalle terminazioni periferiche del sistema del trigemino vascolare, è considerata un fattore chiave nella generazione del dolore associato all'emicrania. La glia è il principale tipo cellulare che può rispondere a questo tipo di infiammazione, infatti un'attivazione gliale è stata dimostrata in un modello sperimentale di emicrania, indotta dalla spreading depression (Cui et al., 2009). L'attivazione gliale e gli eventi neuroinfiammatori che ne conseguono sono indirizzati alla neuroprotezione e all'eliminazione della causa scatenante, anche se una persistente attivazione può avere effetti neurotossici (Milligan e Watkins, 2009).

In questo studio è stato valutato l'effetto analgesico dell'inibizione della degradazione di AEA e di 2-AG, combinando il modello animale di emicrania, basato sulla somministrazione di NTG con due diversi modelli animali di dolore (Tail Flick test e Formalin test). Inoltre, sono state investigate le componenti centrali dell'effetto analgesico dell'inibizione idrolasica di FAAH e MAGL, attraverso la valutazione della proteina c-Fos in specifiche aree cerebrali. In particolare i potenziali effetti analgesici di URB937, un inibitore della FAAH periferica, potrebbero essere di grande rilevanza poiché l'uso di questo composto, nell'uomo, eviterebbe l'insorgenza di effetti collaterali legati all'attivazione dei recettori CB1 (Clapper et al., 2010). Infine, nelle stesse aree cerebrali è stato valutato il coinvolgimento della modulazione gliale nel dolore emicranico e l'influenza, su essa, del trattamento con gli inibitori idrolasici della FAAH e MAGL.

### 6.2 Effetti dell'inibizione del catabolismo dei principali endocannabinoidi nel modello animale di emicrania

#### URB602, inibitore di MAGL

A differenza di AEA, i cui potenziali effetti analgesici sono stati ampiamente studiati, il ruolo funzionale della 2-AG nel dolore è poco conosciuto. L'uso degli inibitori della MAGL ha, pertanto, offerto l'opportunità di studiare il potenziale ruolo anti-infiammatorio e anti-nocicettivo di questo endocannabinoide. URB602, un inibitore specifico della MAGL, aumenta solo i livelli di 2-AG senza modificare i livelli di AEA, sia in vitro che in vivo (Hohmann et al., 2005), mostrando pertanto una forte selettività. Guindon e collaboratori hanno dimostrato che la somministrazione di 2-AG può indurre effetti anti-nocicettivi periferici al Formalin test e che la somministrazione di URB602, localmente nella zampa dell'animale, aumenta l'effetto anti-nocicettivo di 2-AG esogeno (Guindon et al., 2007). In accordo, Comelli e collaboratori hanno dimostrato che la somministrazione sistemica di URB602 nel ratto riduce l'edema e l'infiammazione, indotti dalla somministrazione di carragenina a livello plantare (Comelli et al., 2007).

In questo studio è stato dimostrato per la prima volta che la somministrazione sistemica di URB602 può prevenire lo sviluppo dell'iperalgia causata dalla somministrazione di NTG al Formalin test e al Tail Flick test, senza indurre analgesia in condizioni basali. I meccanismi alla base di questa modulazione potrebbero essere spiegati con l'aumento dei livelli di 2-AG, secondario al blocco della sua degradazione, a livello spinale e sovraspinale. Elevati livelli endogeni di 2-AG potrebbero compensare la riduzione dell'endocannabinoide, indotta dalla somministrazione di NTG. Infatti Bisogno e collaboratori hanno dimostrato che NO, rilasciato/prodotto dalla NTG, aumenta l'uptake della 2-AG, riducendone la disponibilità a livello extracellulare (Bisogno et al., 2001). In accordo con tale ipotesi, una maggiore attività della MAGL e densità dei recettori CB<sub>1</sub>, è stata evidenziata dopo somministrazione di NTG nell'area mesencefalica di ratto (Greco et al., 2010). Inoltre, in uno studio clinico è stato dimostrato che pazienti emicranici e pazienti con cefalea da overuse di farmaci sintomatici, presentano ridotti livelli piastrinici di AEA e di 2-AG, e che i ridotti livelli di 2-AG sono strettamente correlati con ridotti livelli di serotonina (Rossi et al., 2008).

I possibili siti su cui questo inibitore sembra agire nel nostro modello di emicrania sono suggeriti dai risultati ottenuti dalla valutazione dell'attivazione neuronale. Infatti l'inibizione della MAGL ha ridotto in maniera significativa l'espressione della proteina c-Fos nel PAG,

## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

PAB, AMI, LC, NTS e NTC. Tuttavia, il dato più significativo è rappresentato dall'inibizione dell'attivazione neuronale nel PAG e NTC, che giocano un ruolo cardine nella modulazione/trasmissione del dolore. La ricca innervazione serotoninergica di queste aree sembra pertanto suggerire un'interazione da parte della 2-AG con questo sistema, mentre l'idea che il sistema endocannabinoide possa essere coinvolto nella regolazione delle risposte allo stress spiegherebbe la riduzione della c-Fos in aree cerebrali come AMI e NTS, implicate nello stato emozionale (Williamson and Evans 2000).

I presenti dati suggeriscono che 2-AG ha potenziali effetti anti-iperalgescici ed è in grado di ridurre l'espressione della c-Fos in un modello animale di emicrania, anche se i meccanismi alla base di questo fenomeno sono al momento elusivi. Tuttavia in uno studio precedente è stato suggerito che l'azione anti-nocicettiva di URB602 può essere espletata da 2-AG direttamente sui recettori CB2, inibendo il rilascio di sostanze pro-infiammatorie dai macrofagi (Comelli et al., 2007). Inoltre, è ipotizzabile che la riduzione dell'attivazione neuronale sia legata all'inibizione di NF-kB e/o alla riduzione della ciclossigenasi-2 (COX2), indotti dalla somministrazione di NTG a livello meningiale e cerebrale (Reuter et al., 2001; Greco et al, 2005). A supporto di tale ipotesi, è stato dimostrato che la somministrazione di URB602 inibisce l'attivazione di NF-kB (Panikashvili et al., 2005, 2006) e l'espressione di COX2 dopo insulti infiammatori ed eccitotossici (Du H et al., 2011).

### **URB937, inibitore di FAAH periferica**

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'inibitore della FAAH periferica, URB937, contrasta l'iperalgescia causata da NTG nella fase II del Formalin test ma non nel Tail Flick test. I siti d'azione dell'inibitore sono, almeno in parte, le terminazioni nervose periferiche a livello del danno tessutale in cui avverrebbe l'aumento di AEA. E' stato infatti ipotizzato che AEA possa agire come un segnale paracrino per modulare l'intensità degli stimoli dolorosi originati a livello dei tessuti danneggiati. I segnali generati dall'infiammazione e dal danno neuronale possono pertanto innescare la produzione locale di AEA e la sua interazione con i recettori CB1 posti sulle terminazioni nervose periferiche, riducendo la trasmissione del dolore a livello spinale (Clapper et al. 2010; Lovinger, 2010).

L'inibizione della FAAH periferica ha ridotto l'espressione della c-Fos in maniera significativa nel PAG, LC, NTS e NTC, in accordo con la riduzione del numero di flinches/shakes nel Formalin test, dove l'attivazione del PAG e LC ha un ruolo chiave (Finn et al, 2003). Studi precedenti hanno suggerito che NTG induce uno stato iperalgescico

## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

attraverso meccanismi complessi che coinvolgono anche la sensitizzazione del sistema del trigeminovascolare a livello meningiale, attraverso l'attivazione della iNOS (Reuter et al., 2001; Bhandare et al., 2011). Pertanto, è ipotizzabile che URB937 eserciti la sua azione nel sistema del trigeminovascolare, probabilmente a livello delle meningi ma il meccanismo attraverso cui si verificherebbe è ancora sconosciuto.

Costa e collaboratori hanno osservato che l'inibizione dell'uptake dell'anandamide, attraverso il blocco del carrier, può ridurre l'espressione di NO e di TNF- $\alpha$  in un modello di dolore neuropatico (Costa et al., 2006). L'aumento del tono cannabinoide periferico, determinato da URB937, potrebbe quindi causare una riduzione della sintesi di NO a livello delle meningi, che si rifletterebbe in una ridotta espressione neuronale di Fos.

Altrettanto incerta, sulla base dei dati ad oggi disponibili, appare la definizione degli effettori coinvolti nei fenomeni indotti da URB937. In base ai dati presenti in letteratura, è possibile ipotizzare un'azione dell'anandamide a livello dei recettori CB localizzati sui vasi extracerebrali della dura madre (Matsuda et al., 1990; Hoehe et al., 1991), ma anche su altri recettori funzionalmente correlati, come il recettore *transient receptor potential vanilloid type 1* (TRPV1) (Shimizu et al., 2007) o recettori cannabinoide atipici attualmente denominati CBx (non ancora clonati), localizzati sull'endotelio vasale (Begg et al., 2005). Tuttavia, al momento non siamo in grado di stabilire quali siano i segnali che contribuiscono all'aumento dell'endocannabinoide a livello della dura e studi futuri saranno necessari per chiarire questo aspetto.

### **URB597, inibitore non selettivo di FAAH**

La somministrazione di URB597, inibitore aspecifico della FAAH che idrolizza AEA, PEA e 2-AG (Cravatt et al., 1996; Goparaju *et al.*, 1999; Beltramo e Piomelli, 2000; Saario et al., 2004), ha mostrato un effetto anti-iperalgiesico in entrambi i test comportamentali. Tale effetto analgesico, dimostrato anche in altri studi (Holt et al., 2005; Starowicz et al., 2013), è probabilmente il risultato di una azione combinata di AEA, PEA e 2-AG a livello lombare che possono agire sinergicamente per espletare i loro effetti (Lambert and Fowler, 2005; Calignano et al., 1998; Russo et al., 2007). Il meccanismo con cui URB597 esplica tale azione analgesica non è stato identificato nel presente studio, anche se sembra verosimile che una "down regulation" della COX2 e della iNOS, possano contribuire a tale effetto, con conseguente riduzione dei livelli di PGE2 (prostaglandine E2) e di NO (Tham et al., 2007; Bisogno and Di Marzo, 2010).



## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

Nel presente studio, nessuna riduzione significativa dell'espressione della c-Fos, indotta dalla somministrazione di NTG, è stata osservata a livello cerebrale, confermando un'azione di URB597 prevalentemente a livello spinale. Tale idea sembra essere supportata da uno studio dove è stato dimostrato che l'analgisia indotta dalla somministrazione di URB597 (1mg/kg, i.p.) in un modello di dolore infiammatorio (test della carragenina), è associata ad un aumento dei livelli di AEA solo a livello spinale ma non a livello del mesencefalo (Okine et al., 2012). Al contrario però in un studio precedente è stato riportato che URB597, può aumentare i livelli di AEA anche nel PAG, localizzato nel mesencefalo, influenzando la via discendente nocicettiva attraverso un meccanismo che, dipendente dai tempi e dalle dosi usate, può essere mediato sia dai recettori CB1 che dal recettore TRPV1 dei vanilloidi (Maione et al., 2005; Akerman 2004). La maggior parte dei neuroni che esprimono i recettori TRPV1 presenta anche i recettori CB1. AEA è infatti un'agonista di entrambi i recettori, mediante i quali esercita sia effetti antinocicettivi, attraverso i recettori CB, sia iperalgesici attraverso quelli per i vanilloidi. E' interessante notare che il sito di legame di AEA è intracellulare per il TRPV1 ed extra-cellulare per il CB1, e che quindi è presumibile ipotizzare che l'effetto dell'AEA risulti fortemente influenzato anche dall'attività del carrier di membrana (Di Marzo et al., 2001). Inoltre, recentemente è stato ipotizzato che la somministrazione di URB597 possa indurre analgesia in un modello di dolore neuropatico probabilmente attraverso la desensibilizzazione dei recettori TRPV1, poiché dopo forte inibizione della FAAH, l'AEA verrebbe trasformata in 15(S)-hydroxy-AEA, producendo analgesia (Starowicz et al., 2013).

### **6.3 Valutazione gliale nel modello animale di emicrania**

È ormai ampiamente dimostrato che l'instaurarsi del dolore, soprattutto di tipo cronico, è accompagnato da processi neuroinfiammatori, tra cui l'attivazione delle cellule gliali (Paulsen et al., 1987; Hassel et al., 1992; Meller et al., 1994; Milligan et al., 2003). Microglia ed astroglia giocano un ruolo cruciale nello sviluppo e nel mantenimento del dolore cronico in diversi modelli animali (Milligan e Watkins, 2009). Tuttavia, i dati sul ruolo gliale nel dolore acuto, riportati in letteratura, sono pochi. La glia è il principale tipo cellulare che può rispondere ad uno stimolo infiammatorio ed una sua attivazione è stata dimostrata in un modello sperimentale di emicrania, indotto dalla spreading depression (Cui et al., 2009). Le cellule gliali, grazie al loro intimo contatto con i neuroni, sono in grado di controllare il

## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

microambiente neuronale e rispondere a qualsiasi cambiamento, con il rilascio di neurotrasmettitori e neuropetidi. L'attivazione gliale e gli eventi neuroinfiammatori che ne conseguono possono essere indirizzati alla neuroprotezione e all'eliminazione della causa scatenante, anche se una attivazione persistente può avere anche effetti neurotossici (Bèlanger e Magistretti, 2009; Milligan e Watkins, 2009). Per esempio, gli astrociti, una volta attivi, rimuovono l'eccesso di glutammato, grazie alla presenza di specifici trasportatori sulla loro superficie (GLT1: glutamate transporter 1 e GLAST: glutamate-aspartate transporter) riducendo pertanto la trasmissione eccitatoria sinaptica (Sung et al., 2003; Tawfik et al., 2006). In questa fase iniziale di attivazione, gli astrociti sono in grado di rilasciare citochine anti-infiammatorie, quali IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ , ed esprimere i recettori per gli endocannabinoidi (CB) sulla loro superficie (Benveniste et al., 2007). Durante una condizione cronica, in cui si ha una persistente stimolazione nocicettiva, come il dolore di tipo neuropatico, le cellule gliali persistono nella loro forma attivata. E' stato suggerito che un'attivazione cronica di cellule astrocitarie, in seguito a danno periferico, comporta una downregolazione dei trasportatori per il glutammato, quindi una ridotta rimozione di glutammato dallo spazio extracellulare ed un aumento della trasmissione eccitatoria sinaptica (Tawfik et al., 2006; McMahon et al., 2005), accompagnato dal rilascio di citochine proinfiammatorie quali, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Benveniste et al., 2007).

Nel presente studio è stata effettuata l'analisi morfologica della glia in un modello animale di emicrania basato sulla somministrazione di NTG, per valutare il possibile coinvolgimento dell'attivazione gliale in specifiche aree cerebrali. I dati ottenuti hanno dimostrato che la somministrazione di NTG induce una lieve attivazione astrogliale, valutata secondo la scala di Colburn, a livello dei principali nuclei coinvolti nella trasmissione del dolore emicranico, PAG e NTC, rispetto al gruppo controllo. Tale attivazione sembra essere legata, almeno in parte, dall'azione di NO (Griffiths and Gasque 2007), rilasciato dalla somministrazione di NTG, nella maggior parte dei nuclei come dimostrato in studi precedenti (Pardutz et al., 2000; Reuter et al., 2001). Tale risultato suggerisce che le cellule astrogliali sono attivate dall'ambiente neuronale circostante probabilmente per rispondere all'iperalgia indotta dalla NTG. Tuttavia, un altro importante contributo all'attivazione gliale NTG-indotta ed osservata in particolare a livello di NTC, potrebbe essere legata al rilascio di CGRP e SP dopo somministrazione del nitrovasodilatatore (Greco et al., 2008). Questa ipotesi è confermata dall'osservazione che la SP causa attivazione degli astrociti a livello di NTC, dove è visibile un'*over espressione* di GFAP, mediante il legame di SP a specifici recettori sulla superficie astrogliale (Carrier et al., 2004). Questo effetto è bloccato dall'inibizione della NOS (Carrier

## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

et al., 2004), suggerendo che NO può regolare l'espressione di GFAP negli astrociti (Brahmachari et al., 2006) e che l'effetto attivante della SP coinvolge NO (Vruwink et al., 2001).

Nel presente studio nessuna differenza evidente è stata riportata nel grado di attivazione della microglia negli stessi nuclei cerebrali valutati (Tabella 8). Colburn e collaboratori per primi hanno caratterizzato il grado di attivazione astrogliale e microgliale in modelli di dolore neuropatico per diversi giorni dopo l'induzione del danno periferico (Colburn et al., 1995), dimostrando che il profilo temporale dell'attivazione microgliale non correla con la comparsa e la durata del dolore. Al contrario, il grado di attivazione astrogliale è correlato con lo sviluppo ed il mantenimento del dolore stesso (Colburn et al., 1995). Sulla base dei dati ottenuti, sembra verosimile che dopo la somministrazione acuta di NTG, il pattern di attivazione microgliale ed astrogliale abbia tempi di attivazione differenti.

### ***Modulazione dell'attivazione gliale indotta dagli endocannabinoidi, nel modello animale di emicrania***

I cannabinoidi sono noti per modulare alcuni aspetti della funzione microgliale in vitro, ad esempio, il  $\Delta^9$ -THC e metanandamide, analogo di AEA, causano un ridotto rilascio di citochine in cellule gliali corticali di ratto trattate con LPS (Roche et al., 2006). AEA e 2-AG, così come diversi cannabinoidi sintetici, inibiscono il rilascio di TNF- $\alpha$  dopo esposizione ad LPS (Facchinetti et al., 2003) e la generazione di nitriti (Martin-Moreno et al., 2011) in cellule gliali in coltura. Inoltre, recentemente è stato dimostrato che URB597, inibitore del catabolismo di AEA, può modulare l'attivazione microgliale associata alla long-term potentiation (LTP) a livello ippocampale (Murphy et al., 2012); tale azione inibitoria è stata suggerita anche in colture microgliali di ratto dopo esposizione ad LPS (Tham et al., 2007).

Nel presente studio è stato dimostrato che l'inibizione del catabolismo dei principali EC, AEA e 2-AG, attraverso specifici inibitori della FAAH e MAGL, induce analgesia nel nostro modello animale di emicrania, e che tale effetto è legato ad una modulazione astrogliale. I dati ottenuti hanno mostrato infatti che dopo somministrazione di URB602 (inibitore MAGL) e URB937 (inibitore della FAAH periferica), l'espressione dell'astroglia indotta dalla somministrazione di NTG, risulta incrementata di un grado, nel PAG e nell'NTC, importanti

## CAPITOLO 6 Discussione e Conclusioni

---

per la trasmissione del dolore cefalico. Mentre il trattamento con URB597 non ha indotto nessuna modificazione significativa negli stessi nuclei analizzati.

In relazione ad altri risultati ottenuti, è probabile che l'astroglia possa avere un duplice ruolo a livello di queste aree cerebrali. In particolare, è ipotizzabile che l'aumento teorico dei livelli di AEA e 2-AG induca il rilascio di fattori anti-infiammatori da parte delle cellule astrogliali per bilanciare l'effetto pro-infiammatorio legato a NO (Romero-Sandoval et al., 2008). Tale modulazione, avverrebbe attraverso l'azione degli EC, sui recettori CB1 e CB2, espressi a livello gliale (Eljaschewitsch et al., 2006; Cabral et al., 2008). In particolare, è possibile che la somministrazione di URB602, aumentando i livelli di 2-AG cerebrali, riduca il rilascio di citochine pro-infiammatorie, quali il TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, come già dimostrato in uno studio passato (Panikashvili et al., 2006). I meccanismi alla base di quanto osservato sono elusivi, ma è noto che gli astrociti possono rilasciare fattori sia neuroprotettivi che neurotossici, a seconda delle condizioni (Farina et al., 2007). Questo infatti, ha portato ad un considerevole dibattito se la loro attivazione sia utile o dannosa per i neuroni vicini e se il risultato sia dato da una complessa interazione tra fattori pro- e anti-infiammatori.

Per quanto riguarda l'effetto osservato dopo somministrazione di URB937, è ipotizzabile che l'azione di AEA endogena periferica si espliciti, come per la riduzione dell'attivazione neuronale, a livello durale probabilmente attraverso i vasi che irrorano le meningi. Tale ipotesi sembra essere rafforzata dal fatto che esistono forti relazioni tra vasi cerebrali ed astrociti (McCaslin et al., 2011), ma il meccanismo reale è al momento sconosciuto.

### CONCLUSIONI

I presenti dati confermano il ruolo degli endocannabinoidi nel controllo della trasmissione del dolore. In particolare, confermano l'importanza di AEA e 2-AG nei processi analgesici e, dimostrano per la prima volta come un aumento di AEA periferica – determinato dal blocco del suo catabolismo – possa modificare l'attivazione neuronale causata dalla NTG in specifiche aree cerebrali, coinvolte nel dolore emicranico. Tale effetto potrebbe essere legato all'aumento dei livelli di AEA endogena a livello meningeo, attraverso un'interazione con i vasi extracerebrali anche se gli effettori specifici non sono ancora noti.

Infine, per la prima volta è stato dimostrato il ruolo astrogliale in un modello animale di emicrania e l'esistenza di una modulazione da parte degli endocannabinoidi.

Al momento tuttavia non siamo in grado di stabilire quali siano i fattori coinvolti in tale fenomeno e ulteriori studi saranno necessari per chiarire tale aspetto.

## BIBLIOGRAFIA

---

### BIBLIOGRAFIA

Akerman S, Kaube H, Goadsby PJ. Anandamide acts as a vasodilator of dural blood vessels in vivo by activating TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2004 Aug;142(8):1354-60.

Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Diencephalic and brainstem mechanisms in migraine. *Nat Rev Neurosci*. 2011 Sep 20;12(10):570-84.

Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*. 2006 Jan;27(1):1-4.

Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther*. 2005 May;106(2):133-45.

Bélanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci*. (2009);11(3):281-95. Review.

Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport*. 2000 Apr 27;11(6):1231-5.

Bhandare A, Kshirsagar A, Vyawahare N, Sharma P, Mohite R. Evaluation of anti-migraine potential of Areca catechu to prevent nitroglycerin-induced delayed inflammation in rat meninges: possible involvement of NOS inhibition. *J Ethnopharmacol*. 2011 Jun 14;136(1):267-70.

Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J*. 2000 Nov 1;351 Pt 3:817-24.

Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò A, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem*. 2001 Apr;268(7):1982-9.

Bisogno T, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2010, 9:564-573.

Boger DL, Henriksen SJ, Cravatt BF. Oleamide: an endogenous sleep-inducing lipid and prototypical member of a new class of biological signaling molecules. *Curr Pharm Des*. 1998 Aug;4(4):303-14.

Brahmachari S, Fung YK, Pahan K. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci* 26, 4930–4939 26 (2006).

Bridges D, Rice AS, Egertová M, Elphick MR, Winter J, Michael GJ. Localisation of cannabinoid receptor 1 in rat dorsal root ganglion using in situ hybridisation and immunohistochemistry. *Neuroscience*. 2003;119(3):803-12.

## BIBLIOGRAFIA

---

Burkey TH, Quock RM, Consroe P, Ehlert FJ, Hosohata Y, Roeske WR, Yamamura HI. Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 1997 Oct 8;336(2-3):295-8.

Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z, Hargreaves R, Becerra L, Borsook D. Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann Neurol.* 2010 Jul;68(1):81-91.

Buzzi MG, Tassorelli C, Nappi G. Peripheral and central activation of trigeminal pain pathways in migraine: data from experimental animal models. *Cephalalgia.* 2003;23 Suppl 1:1-4. Review. Erratum in: *Cephalalgia.* 2003 Jul;23(6):483.

Buzzi MG, Moskowitz MA. The pathophysiology of migraine: year 2005. *J Headache Pain.* 2005 Jun;6(3):105-11.

Buzzi MG, Tassorelli C. Experimental models of migraine. *Handb Clin Neurol.* 2010;97:109-23.

Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.* 2008 Jan;153(2):240-51. Review.

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

Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol.* 2004 Apr;65(4):999-1007.

Clapper J.R., Guillermo Moreno-Sanz, Roberto Russo, Ana Guijarro, Federica Vacondio, Andrea Duranti, Andrea Tontini, Silvano Sanchini, Natale R Sciolino, Jessica M Spradley, Andrea G Hohmann, Antonio Calignano, Marco Mor, Giorgio Tarzia and Daniele Piomelli. Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci.* 2010 Oct;13(10):1265-70.

Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon P, Hickey WF. Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroimmunol.* 1997 Nov;79(2):163-75.

Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. The inhibition of monoacylglycerol lipase by URB602 showed an anti-inflammatory and anti-nociceptive effect in a murine model of acute inflammation. *Br J Pharmacol.* 2007 Nov;152(5):787-94.

Costa B, Siniscalco D, Trovato AE, Comelli F, Sotgiu ML, Colleoni M, Maione S, Rossi F, Giagnoni G. AM404, an inhibitor of anandamide uptake, prevents pain behaviour and modulates cytokine and apoptotic pathways in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol.* 2006 Aug;148(7):1022-32.

## BIBLIOGRAFIA

---

Cupini L.M., Costa C., Sarchielli P., Bari M., Battista N., Eusebi P., Calabresi P., Maccarrone M. Degradation of endocannabinoids in chronic migraine and medication overuse headache. *Neurobiol Dis.* 2008 30(2):186-189

Cui Y, Takashima T, Takashima-Hirano M, Wada Y, Shukuri M, Tamura Y, Doi H, Onoe H, Kataoka Y, Watanabe Y. 11C-PK11195 PET for the in vivo evaluation of neuroinflammation in the rat brain after cortical spreading depression. *J Nucl Med.* (2009 Nov);50(11):1904-11.

Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science.* 1995 Jun 9;268(5216):1506-9.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature.* 1996 Nov 7;384(6604):83-7.

Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 1988 Nov;34(5):605-13.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 1994 Dec 15;372(6507):686-91.

Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T, Melck D. Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids.* 1999;34 Suppl:S319-25. Review.

Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J.* 2001 Aug 15;358(Pt 1):249-55.

Drew LJ, Harris J, Millns PJ, Kendall DA, Chapman V. Activation of spinal cannabinoid 1 receptors inhibits C-fibre driven hyperexcitable neuronal responses and increases [35S]GTPgammaS binding in the dorsal horn of the spinal cord of noninflamed and inflamed rats. *Eur J Neurosci.* 2000 Jun;12(6):2079-86.

Du H, Chen X, Zhang J, Chen C. Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR- $\gamma$ . *Br J Pharmacol.* 2011 Aug;163(7):1533-49.

Edelmayer RM, Vanderah TW, Majuta L, Zhang ET, Fioravanti B, De Felice M, Chichorro JG, Ossipov MH, King T, Lai J, Kori SH, Nelsen AC, Cannon KE, Heinricher MM, Porreca F. Medullary pain facilitating neurons mediate allodynia in headache-related pain. *Ann Neurol.* 2009 Feb;65(2):184-93.

Edvinsson L. Tracing neural connections to pain pathways with relevance to primary headaches. *Cephalalgia.* 2011 Apr;31(6):737-47.

## BIBLIOGRAFIA

---

Egertová M, Elphick MR. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol*. 2000 Jun 26;422(2):159-71.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron*. 2006 Jan 5;49(1):67-79.

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A: Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lypopolysaccharide. *Glia* 2003, 41:161-168

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Apr 11;92(8):3376-80.

Farina C., Aloisi F., Meinel E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28:138–145.

Farquhar-Smith WP, Egertová M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*. 2000 Jun;15(6):510-21.

Finn DP, Jhaveri MD, Beckett SR, Roe CH, Kendall DA, Marsden CA, Chapman V. Effects of direct periaqueductal grey administration of a cannabinoid receptor agonist on nociceptive and aversive responses in rats. *Neuropharmacology*. 2003 Oct;45(5):594-604.

Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem*. 1995 Aug 15;232(1):54-61.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG. Anandamide transport: a critical review. *Life Sci*. 2005 Aug 19;77(14):1584-604. Review.

Glass M, Northup JK. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol*. 1999 Dec;56(6):1362-9.

Goadsby PJ. Neurovascular headache and a midbrain vascular malformation: evidence for a role of the brainstem in chronic migraine. *Cephalalgia*. 2002 Mar;22(2):107-11.

Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1999 Feb 15;57(4):417-23.

Greco R, Tassorelli C, Cappelletti D, Sandrini G, Nappi G. Activation of the transcription factor NF-kappaB in the nucleus trigeminalis caudalis in an animal model of migraine. *Neurotoxicology*. 2005 Oct;26(5):795-800. Epub 2005 Jun 3.



## BIBLIOGRAFIA

---

Greco R, Tassorelli C, Sandrini G, Di Bella P, Buscone S, Nappi G. Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in different models of pain. *Cephalalgia*. 2008 Feb;28(2):114-26.

Greco R., Gasperi V., Sandrini G., Bagetta G., Nappi G., Maccarrone M., Tassorelli C., Alterations of the endocannabinoid system in an animal model of migraine: evaluation in cerebral areas of rat. . *Cephalalgia*. 2010 Mar;30(3):296-302. Epub 2010 Feb 1

Greco R., Mangione A.S., Sandrini G., Maccarrone M., Nappi G., Tassorelli C.. Effects of anandamide in migraine: data from an animal model. *J Headache Pain* (2011); 12: 177-183

Griffiths M, Neal JW, Gasque P. Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol*. 2007;82:29-55. Review.

Guindon J, Guijarro A, Piomelli D, Hohmann AG. Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. 2011 Aug;163(7):1464-78.

John GR., Lee SC., Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*. 2003;9:10-22.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 27;98(7):3662-5.

Hassel B., Paulsen R.E., Johnsen A., Fonnum F. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate. *Brain Res* (1992); 576, 120-124.

Ho TW, Ferrari MD, Dodick DW, Galet V, Kost J, Fan X, Leibensperger H, Froman S, Assaid C, Lines C, Koppen H, Winner PK. Efficacy and tolerability of MK-0974 (telcagepant), a new oral antagonist of calcitonin gene-related peptide receptor, compared with zolmitriptan for acute migraine: a randomised, placebo-controlled, parallel-treatment trial. *Lancet*. 2008 Dec 20;372(9656):2115-23.

Ho TW, Edvinsson L, Goadsby PJ. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. *Nat Rev Neurol*. 2010 Oct;6(10):573-82.

Hoehe MR, Caenazzo L, Martinez MM, Hsieh WT, Modi WS, Gershon ES, Bonner TI. Genetic and physical mapping of the human cannabinoid receptor gene to chromosome 6q14-q15. *New Biol*. 1991 Sep;3(9):880-5.

Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, Neely MH, Fegley D, Mangieri R, Krey JF, Walker JM, Holmes PV, Crystal JD, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*. 2005 Jun 23;435(7045):1108-12.

Hohmann AG, Herkenham M. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience*. 1999;92(4):1171-5.

## BIBLIOGRAFIA

---

Hohmann AG. Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids*. 2002 Dec 31;121(1-2):173-90.

Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*. 2005;146(3):467-76.

Howlett AC. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002 Aug;68-69:619-31. Review.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11;99(12):8400-5.

Iversen IK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. *Pain* 1989; 38: 17–24.

Iversen HK, Olesen J. Nitroglycerin-induced headache is not dependent on histamine release: support for a direct nociceptive action of nitric oxide. *Cephalalgia* 1994; 14: 437–42

Jhaveri MD, Richardson D, Robinson I, Garle MJ, Patel A, Sun Y, Sagar DR, Bennett AJ, Alexander SP, Kendall DA, Barrett DA, Chapman V. Inhibition of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase-2 increases levels of endocannabinoid related molecules and produces analgesia via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in a model of inflammatory pain. *Neuropharmacology*. 2008 Jul;55(1):85-93.

Katona I, Sperl agh B, Magl oczky Z, S antha E, K ofalvi A, Czirj ak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF. GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience*. 2000;100(4):797-804.

Katona I, Urb an GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci*. 2006 May 24;26(21):5628-37.

Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med*. 2008 Sep;14(9):923-30. Review

Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol*. 2003 Oct;74(4):486-96.

Knight YE, Classey JD, Lasalandra MP, Akerman S, Kowacs F, Hoskin KL, Goadsby PJ. Patterns of fos expression in the rostral medulla and caudal pons evoked by noxious craniovascular stimulation and periaqueductal gray stimulation in the cat. *Brain Res*. 2005 May 31;1045(1-2):1-11.

Kreitzer AC, Regehr WG. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*. 2001 Mar;29(3):717-27.

## BIBLIOGRAFIA

---

Lambert DM, Fowler CJ. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem.* 2005 Aug 11;48(16):5059-87. Review.

Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grover R, Donaldson J, Olesen J. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia.* 1998 Jan;18(1):27-32.

Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia.* 2002 Feb;22(1):54-61.

Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 19;105(7):2699-704.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science.* 1999 Jan 15;283(5400):401-4.

Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2004 Jan;141(2):253-62.

Lovinger David M. Endocannabinoids rein in pain outside the brain. *Nature Neuroscience* (2010) 13: 1155-1156

Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, Petrosino S, Guglielmotti V, Rossi F, Di Marzo V. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Mar;316(3):969-82.

Manning BH, Martin WJ, Meng ID. The rodent amygdala contributes to the production of cannabinoid-induced antinociception. *Neuroscience.* 2003;120(4):1157-70.

Martin WJ, Tsou K, Walker JM. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neurosci Lett.* 1998 Feb 6;242(1):33-6.

Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI. Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain.* 1999 Aug;82(2):199-205.

Martin-Moreno AM, Reigada D, Ramirez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, de Ceballos ML: Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 2011, 79:964-973.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990 Aug 9;346(6284):561-4.

## BIBLIOGRAFIA

---

- McCaslin AF, Chen BR, Radosevich AJ, Cauli B, Hillman EM. In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Mar;31(3):795-806.
- McMahon SB, Cafferty WB, Marchand F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol.* 2005 Apr;192(2):444-62. Review.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995 Jun 29;50(1):83-90.
- Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF. The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology.* (1994 Nov);33(11):1471-8.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL. An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 1998 Sep 24;395(6700):381-3.
- Messlinger K, Suzuki A, Pawlak M, Zehnter A, Schmidt RF. Involvement of nitric oxide in the modulation of dural arterial blood flow in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000 Apr;129(7):1397-404.
- Millhorn DE, Eldridge FL. Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. *J Appl Physiol* (1985). 1986 Oct;61(4):1249-63. Review.
- Millns PJ, Chapman V, Kendall DA. Cannabinoid inhibition of the capsaicin-induced calcium response in rat dorsal root ganglion neurones. *Br J Pharmacol.* 2001 Mar;132(5):969-71.
- Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci.* (2003 Feb);23(3):1026-40
- Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci.* (2009 Jan);10(1):23-36. Review.
- Myers DE. Potential neurogenic and vascular roles of nitric oxide in migraine headache and aura. *Headache.* 1999 Feb;39(2):118-24. Review.
- Moskowitz MA. The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol.* 1984 Aug;16(2):157-68.
- Moskowitz MA, Buzzi MG, Sakas DE, Linnik MD. Pain mechanisms underlying vascular headaches. *Progress Report 1989 Rev Neurol (Paris).* 1989;145(3):181-93
- Moskowitz MA. Trigemino-vascular system. *Cephalalgia.* 1992 Jun;12(3):127.
- Moskowitz MA. Neurogenic inflammation in the pathophysiology and treatment of migraine. *Neurology.* 1993 Jun;43(6 Suppl 3):S16-20

## BIBLIOGRAFIA

---

Murphy N, Cowley TR, Blau CW, Dempsey CN, Noonan J, Gowran A, Tanveer R, Olango WM, Finn DP, Campbell VA, Lynch MA. The fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 exerts anti-inflammatory effects in hippocampus of aged rats and restores an age-related deficit in long-term potentiation. *J Neuroinflammation*. 2012 Apr 26;9:79. doi: 10.1186/1742-2094-9-79.

Nosedá R, Constandil L, Bourgeois L, Chalus M, Villanueva L. Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain. *J Neurosci*. 2010 Oct 27;30(43):14420-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3025-10.2010.

Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Gooley JJ, Saper CB, Digre K, Burstein R. A neural mechanism for exacerbation of headache by light. *Nat Neurosci*. 2010 Feb;13(2):239-45.

Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J Neurosci*. 2011 Oct 5;31(40):14204-17.

Okine BN, Norris LM, Woodhams S, Burston J, Patel A, Alexander SP, Barrett DA, Kendall DA, Bennett AJ, Chapman V. Lack of effect of chronic pre-treatment with the FAAH inhibitor URB597 on inflammatory pain behaviour: evidence for plastic changes in the endocannabinoid system. *Br J Pharmacol*. 2012 Oct;167(3):627-40.

Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*. 2001 Mar;29(3):729-38.

Olesen J, Iversen HK, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport*. 1993 Aug;4(8):1027-30.

Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen JJ. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 1995; 5: 94–100.

Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM; Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med*. 2004 Mar 11;350(11):1104-10.

Olesen J, Burstein R, Ashina M, Tfelt-Hansen P. Origin of pain in migraine: evidence for peripheral sensitisation. *Lancet Neurol*. 2009 Jul;8(7):679-90.

Onaivi ES. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*. 2006;54(4):231-46.

Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E. The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis*. 2006 May;22(2):257-64. Epub 2005 Dec 20.

Pardutz A, Krizbai I, Multon S, Vecsei L, Schoenen J. Systemic nitroglycerin increases nNOS levels in rat trigeminal nucleus caudalis. *Neuroreport*. 2000 Sep 28;11(14):3071-5.

## BIBLIOGRAFIA

---

Parolaro D. Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Sci.* 1999;65(6-7):637-44. Review.

Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F. An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem.* (1987 May);48(5):1377-85.

Perrotta A, Arce-Leal N, Tassorelli C, Gasperi V, Sances G, Blandini F, Serrao M, Bolla M, Pierelli F, Nappi G, Maccarrone M, Sandrini G. Acute reduction of anandamide-hydrolase (FAAH) activity is coupled with a reduction of nociceptive pathways facilitation in medication-overuse headache subjects after withdrawal treatment. *Headache.* 2012 Oct;52(9):1350-61

Pertwee RG. Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use. *Forsch Komplementarmed.* 1999 Oct;6 Suppl 3:12-5. Review.

Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:365-91.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jun;301(3):1020-4.

Recober A, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide: an update on the biology. *Curr Opin Neurol.* 2009 Jun;22(3):241-6. Review.

Reuter U, Bolay H, Jansen-Olesen I, Chiarugi A, Sanchez del Rio M, Letourneau R, Theoharides TC, Waeber C, Moskowitz MA. Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain.* 2001 Dec;124(Pt 12):2490-502.

Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy. *Ann Neurol.* 2002 Apr;51(4):507-16.

Roche M, Diamond M, Kelly JP, Finn DP. In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *J Neuroimmunol* 2006, 181:57-67

Romero-Sandoval EA, Horvath RJ, DeLeo JA. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets. *Curr Opin Investig Drugs.* 2008 Jul;9(7):726-34.

Rossi C, Pini LA, Cupini ML, Calabresi P, Sarchielli P. Endocannabinoids in platelets of chronic migraine patients and medication-overuse headache patients: relation with serotonin levels. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Jan;64(1):1-8.

Russo EB. Clinical endocannabinoid deficiency (CECD): can this concept explain therapeutic benefits of cannabis in migraine, fibromyalgia, irritable bowel syndrome and other treatment-resistant conditions? *Neuro Endocrinol Lett.* 2004 Feb-Apr;25(1-2):31-9

Russo R, LoVerme J, La Rana G, D'Agostino G, Sasso O, Calignano A, Piomelli D. Synergistic antinociception by the cannabinoid receptor agonist anandamide and the PPAR-

## BIBLIOGRAFIA

---

alpha receptor agonist GW7647. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jul 2;566(1-3):117-9. Epub 2007 Mar 19.

Saario SM, Savinainen JR, Laitinen JT, Järvinen T, Niemi R. Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2 arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochem Pharmacol.* 2004 Apr 1;67(7):1381-7.

Sances G, Tassorelli C, Pucci E, Ghiotto N, Sandrini G, Nappi G. Reliability of the nitroglycerin provocative test in the diagnosis of neurovascular headaches. *Cephalalgia.* 2004 Feb;24(2):110-9.

Sarchielli P., Pini L.A., Coppola F., Rossi C., Baldi A., Mancini M.L., Calabresi P., Endocannabinoid in chronic migraine: CSF findings suggest a system failure. *Neuropsychopharmacology* 2007 32 (1384- 1390)

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylyl cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997 Feb;142(2):278-87.

Shimizu T, Toriumi H, Sato H, Shibata M, Nagata E, Gotoh K, Suzuki N. Distribution and origin of TRPV1 receptor-containing nerve fibers in the dura mater of rat. *Brain Res.* 2007 Oct 10;1173:84-91. Epub 2007 Aug 10.

Skaper SD, Facci L, Giusti P. Glia and mast cells as targets for palmitoylethanolamide, an anti-inflammatory and neuroprotective lipid mediator. *Mol Neurobiol.* 2013 Oct;48(2):340-52.

Sicuteri F, del Bene ED, Poggioni M, Bonnazzi A. Unmasking latent dysnociception in healthy subjects. *Headache* 1987; 27: 180–5.

Starowicz K, Makuch W, Korostynski M, Malek N, Slezak M, Zychowska M, Petrosino S, De Petrocellis L, Cristino L, Przewlocka B, Di Marzo V. Full inhibition of spinal FAAH leads to TRPV1-mediated analgesic effects in neuropathic rats and possible lipoxygenase-mediated remodeling of anandamide metabolism. *PLoS One.* 2013;8(4):e60040

Staton PC, Hatcher JP, Walker DJ, Morrison AD, Shapland EM, Hughes JP, Chong E, Mander PK, Green PJ, Billinton A, Fulleylove M, Lancaster HC, Smith JC, Bailey LT, Wise A, Brown AJ, Richardson JC, Chessell IP. The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain.* 2008 Sep 30;139(1):225-36.

Strecker T, Dux M, Messlinger K. Nitric oxide releases calcitonin-gene-related peptide from rat dura mater encephali promoting increases in meningeal blood flow. *J Vasc Res.* 2002 Nov-Dec;39(6):489-96.

Summ O, Charbit AR, Andreou AP, Goadsby PJ. Modulation of nociceptive transmission with calcitonin gene-related peptide receptor antagonists in the thalamus. *Brain.* 2010 Sep;133(9):2540-8.

Taylor BK. Spinal inhibitory neurotransmission in neuropathic pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2009 Jun;13(3):208-14. Review.

## BIBLIOGRAFIA

---

Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res.* 1995 Jun 5;682(1-2):167-81.

Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. Central effects of nitroglycerin in the rat: new perspectives in migraine research. *Funct Neurol.* 1996 Sep-Oct;11(5):219-23, 227-35. Review.

Tassorelli C, Joseph SA, Nappi G. Neurochemical mechanisms of nitroglycerin-induced neuronal activation in rat brain: a pharmacological investigation. *Neuropharmacology.* 1997 Oct;36(10):1417-24.

Tassorelli C, Costa A, Blandini F, Joseph SA, Nappi G. Effect of nitric oxide donors on the central nervous system--nitroglycerin studies in the rat. *Funct Neurol.* 2000;15 Suppl 3:19-27. Review.

Tassorelli C, Greco R, Morocutti A, Costa A, Nappi G. Nitric oxide-induced neuronal activation in the central nervous system as an animal model of migraine: mechanisms and mediators. *Funct Neurol.* 2001;16(4 Suppl):69-76. Review.

Tassorelli C., Joseph S.A., Buzzi M.G. and Nappi G.. The effects on the central nervous system of nitroglycerin- putative mechanisms and mediators. *Progress in Neurobiology* 1999; 57: 607-624

Tassorelli C., R. Greco, D. Wang, M. Sandrini, G. Sandrini, G. Nappi, Nitroglycerin induces Hyperalgesia in rats-a time course study, *European Journal of Pharmacology*, January 2003.

Tassorelli C, Greco R, Wang D, Sandrini G, Nappi G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 18;534(1-3):103-7. Epub 2006 Feb 28.

Tawfik VL, Lacroix-Fralish ML, Bercury KK, Natile-McMenemy N, Harris BT, Deleo JA. Induction of astrocyte differentiation by propentofylline increases glutamate transporter expression in vitro: heterogeneity of the quiescent phenotype. *Glia.* 2006 Aug 15;54(3):193-203.

Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 1992 Oct;51(1):5-17.

Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M. Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett.* 2007 Jun 26;581(16):2899-904.

Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1998 Mar;83(2):393-411.

Van der Schueren BJ, Van Laere K., Gerard N., Bormans G., De Hoon JN. Interictal Type 1 Cannabinoid Receptor Binding is Increased in Female Migraine Patients. *Headache.* 11 November 2011



## BIBLIOGRAFIA

---

Vaughan CW, Connor M, Bagley EE, Christie MJ. Actions of cannabinoids on membrane properties and synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons in vitro. *Mol Pharmacol*. 2000 Feb;57(2):288-95.

Villalón CM, Olesen J. The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs. *Pharmacol Ther*. 2009 Dec;124(3):309-23.

Volfe Z, Dvilansky A, Nathan I. Cannabinoids block release of serotonin from platelets induced by plasma from migraine patients. *Int J Clin Pharmacol Res*. 1985;5(4):243-6.

Vruwink M, Schmidt HH, Weinberg RJ, Burette A. Substance p and nitric oxide signaling in cerebral cortex: Anatomical evidence for reciprocal signaling between two classes of interneurons. *J Comp Neurol* 441, 288–301 441 (2001).

Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N. Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem*. 2002 Jun 7;277(23):20869-76.

Welch KM. Contemporary concepts of migraine pathogenesis. *Neurology*. 2003 Oct 28;61(8 Suppl 4):S2-8. Review.

Williamson EM, Evans FJ. Cannabinoids in clinical practice. *Drugs*. 2000 Dec;60(6):1303-14.

Wilson RI, Nicoll RA. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*. 2001 Mar 29;410(6828):588-92. Erratum in: *Nature* 2001 Jun 21;411(6840):974.

Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002 Apr 26;296(5568):678-82. Review.

## **LISTA DELLE ABBREVIAZIONI**

ABC = complesso avidina-biotina

AEA = anandamide

2-AG = 2-arachidonoilglicerolo

2-AGE = noladin

AMI = nucleo centrale dell'amigdala

AP = area postrema

Au = corteccia auditiva

$\alpha$ 2R = recettori adrenergici

CBR1 = recettore per gli encocannabinoidi di tipo 1

CBR2 = recettore per gli encocannabinoidi di tipo 2

CFA = Complete Freud's adjuvant

c-Fos = marcatore neuronale

CGRP = calcitonin gene-related peptide

COX2 = ciclossigenasi-2

DAGs = diacilgliceroli

DMSO = Dimetilsolfossido

$\Delta$ 9-THC = delta-9-tetraidroacannabinolo

EC = Endocannabinoidi

FAAH = Fatty Acid Amide Hydrolase, enzima responsabile dell'idrolisi di AEA

FAK = Focal Adesion kinase

GFAP = marcatore astrogliale

GPR55 = recettore endocannabinoide di recente scoperta

5HT2B = recettori serotoninergici

JNK = c-Jun N-terminal kinase

Iba 1 = marcatore microgliale

Ins = corteccia insulare

LC = locus coeruleus

MAGL = monoacilglicerol lipasi, enzima responsabile dell'idrolisi di 2-AG

MAP = miogeno activated protein kinase

mGluR5 = recettori glutammatergici

MOH = Medication Overuse Headache

M1/M2 = corteccia motoria

## LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

---

NADA = N-arachidonoil dopamina  
NAPE = N-acilfosfatidiletanolamina  
NCF = nucleo cuneiforme  
NO = ossido nitrico  
NTC = nucleo trigeminale caudale  
NTG = nitroglicerina  
NTS = nucleo del tratto solitario  
OEA = oleamide  
PAB = nucleo parabrachiale  
PAG = sostanza grigia periacqueduttale  
PEA = N-palmitoiletanolamide  
PGs = prostaglandine  
PGE2 = prostaglandine 2  
PH = ipotalamo posteriore  
PKB = protein kinase B  
PI3K = phosphatidylinositol-3-kinase  
Po = gruppo nucleare talamico posteriore  
PSNL = partial sciatic nerve ligature  
PtA = corteccia parietale  
PVH = nucleo paraventricolare dell'ipotalamo  
RVM = medulla ventrolaterale rostrale  
SNC = sistema nervoso centrale  
SP = sostanza P  
SSN = nucleo salivatorio superiore  
S1/S2 = corteccia somatosensoriale primaria e secondaria  
RSA = corteccia retroplenale  
TG = ganglio trigeminale  
TCC = complesso trigemino cervicale  
TRPV1 = recettore dei vanilloidi di tipo 1  
URB602 = inibitore di MAGL  
URB597 = inibitore non selettivo di FAAH  
URB937 = inibitore periferico di FAAH  
VPM = nucleo talamico ventroposteromediale  
V1/V2 = corteccia visiva

## RINGRAZIAMENTI

*“ Nessuno che ti abbia preso del tempo si sente debitore, eppure il tempo è l’unica cosa che nemmeno l’uomo più generoso del mondo sarà mai in grado di restituirti”*

Con questa frase molto famosa, vorrei ringraziare tutti coloro che hanno regalato il loro tempo prezioso alla stesura di questa tesi, aiutando e consigliando senza misura le mie scelte.

In particolare, i miei più sinceri ringraziamenti vanno:

**ai miei tutors:** Dott. Fabio Blandini e Dott.ssa Cristina Tassorelli, Prof. Steve Hunt. *Tanto ho imparato in questi anni, ma altrettanto rimane ancora da imparare sia nel lavoro che nella vita;*

**alla mia famiglia:** *pilastro della mia vita;*

**ai colleghi ed amici (italiani e non):** *grazie per aver sopportato e supportato lacrime e gioie di questi anni.*