

# INDICE

1	INTRODUZIONE	4
1.1	MECCANISMO D'AZIONE DELLA METH	8
1.2	EFFETTI DELLA METH: DATI CLINICI	19
1.3	METH: MODELLI ANIMALI	23
1.4	RECUPERO DEL DANNO INDOTTO DALLA METH	26
1.5	COABUSO DI METH CON ALTRE DROGHE	28
1.6	CANNABINOIDI	30
1.7	CANNABINOIDI: NEUROINFIAMMAZIONE E PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE	36
1.8	SCOPO DEL LAVORO	39
2	MATERIALI E METODI	41
2.1	ANIMALI	41
2.2	FARMACI E DISEGNO SPERIMENTALE	41
2.3	PESI E TEMPERATURE	45
2.4	IMMUNOISTOCHEMICA	46

	<u>PREPARAZIONE DEL TESSUTO</u>	46
	<u>IMMUNOFLUORESCENZA</u>	46
	<u>ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI E ANALISI QUANTITATIVA</u>	48
2.5	WESTERN BLOT	51
	<u>PREPARAZIONE DEL TESSUTO</u>	51
	<u>IMMUNOBLOTTING</u>	51
2.6	ANALISI STATISTICA	53
3	RISULTATI	55
3.1	EFFETTO DELLA METH E DEL $\Delta$ 9-THC SULLA TEMPERATURA CORPOREA, SUL PESO E SULLA MORTALITA'	55
3.2	EFFETTO DELLA METH SULLA IMMUNOREATTIVITA' DELLA GFAP E DEL nNOS	62
3.3	IL $\Delta$ 9-THC RIDUCE L'INCREMENTO DELL'ESPRESSIONE DELLA GFAP E DEL nNOS INDOTTO DALLA METH	64
3.4	EFFETTO DEL SR SULL'IR DELLA GFAP E SULL'ESPRESSIONE DEL nNOS	70

3.5	EFFETTO DEL POST-TRATTAMENTO CON $\Delta$ 9-THC SULL'ESPRESSIONE DELLA TH INDOTTA DALLA METH	77
3.6	IL $\Delta$ 9-THC RIDUCE L'AUMENTATA ESPRESSIONE DI IBA-1 INDOTTA DALLA METH	81
3.7	ESPRESSIONE DELLA NEUROTROFINA BDNF NEI RATTI TRATTATI CON METH E POST-TRATTATI CON $\Delta$ 9-THC	85
3.8	ESPRESSIONE DEL RECETTORE CB2 NEI RATTI TRATTATI CON METH E POST-TRATTATI CON $\Delta$ 9-THC	87
4	DISCUSSIONE	89
	BIBLIOGRAFIA	100

## 1 INTRODUZIONE

La N-metil-O-fenil-isopropilamina o Metanfetamina (METH) (Fig.1) è una molecola cationica lipofila con una potente azione psicostimolante e con effetti neurotossici [Maxwell JC and Brecht ML, 2011]. Fu sintetizzata per la prima volta nel 1893 e venne immessa in commercio per il trattamento di numerosi disordini, come il deficit dell'attenzione, l'iperattività, la narcolessia, l'asma e l'obesità [Marshall JF and O'Dell SJ, 2012]. Tuttavia negli anni '50, a causa degli effetti avversi e neurotossici che induce, il suo utilizzo nel trattamento di questi deficit è stato soppiantato da altri farmaci più sicuri. Da quel momento il commercio illegale di METH è cresciuto notevolmente, e a causa delle sue proprietà euforiche, della sua larga diffusione e del basso costo, la METH è diventata la droga più popolare tra le *amphetamine-type stimulant* (ATS) [UNODC 2013].

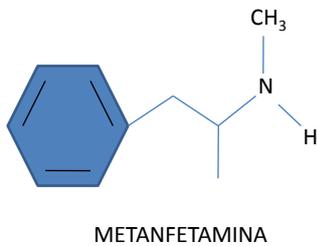
Questa enorme diffusione della METH è dovuta soprattutto alla semplicità della sua sintesi chimica. Infatti essa viene sintetizzata illegalmente a partire dal fenilacetone, o fenil-2-propanone chiamato anche P2P, e N-metil-formammide, due sostanze organiche facilmente reperibili, che quando reagiscono tra loro portano alla formazione della miscela racemica della METH (Fig.2A) [Maxwell JC and Brecht ML, 2011]. La METH presenta un centro chirale a livello del Carbonio 1 e sebbene entrambi gli isomeri *d* e *l*, siano attivi, la forma isomerica *d* viene associata a effetti

fisiologici e comportamentali più potenti ed effetti stimolatori più intensi. La *l*-METH invece, produce effetti psicomotori di più breve durata, ma una dose massiccia di questo isomero è comunque capace di produrre un'intossicazione paragonabile a quella della *d*-METH [Mendelson J, et al. 2006]. Infine, anche la miscela racemica dei due isomeri è capace di indurre effetti di euforia e gratificazione simili a quelli dell'isomero più attivo.

Nel corso degli anni '80 negli Stati Uniti ci fu un aggiornamento degli elenchi delle sostanze la cui sintesi illegale era maggiormente diffusa, e pertanto la P2P venne "schedata" come sostanza per il commercio illegale di droghe d'abuso. Questo non intimorì le *gangs* del commercio illegale che aggirarono il problema imparando a sintetizzare la METH a partire dalla Pseudoefedrina, un'altra sostanza facilmente reperibile e venduta nelle farmacie come decongestionante nasale. A differenza della vecchia sintesi col P2P, questa non porta alla formazione di una miscela racemica, ma solo all'isomero più attivo della METH, l'isomero *d* (Fig.2B).

Ancora oggi il mercato illegale di METH utilizza entrambi i metodi di sintesi della droga, e nonostante intorno al 2005 ci sia stato un calo della richiesta di questa potente droga stimolante, oggi il suo utilizzo è nuovamente in aumento in tutto il mondo [Maxwell JC and Brecht ML, 2011].

**Fig.1**

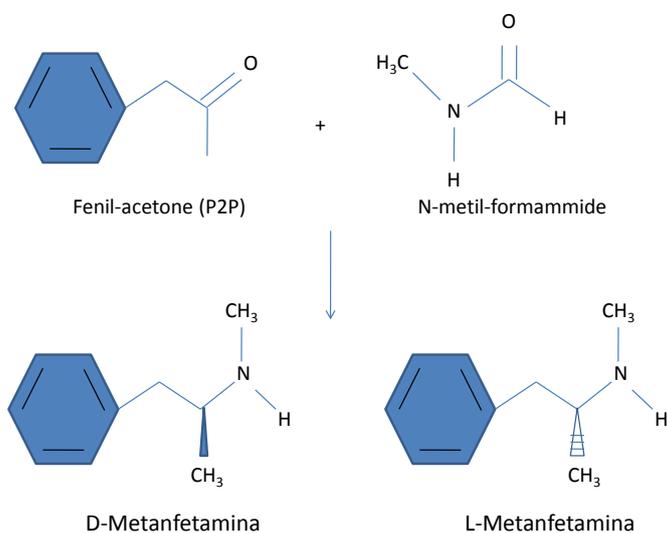


**Figura 1. Struttura e forme nelle quali viene commercializzata la METH**

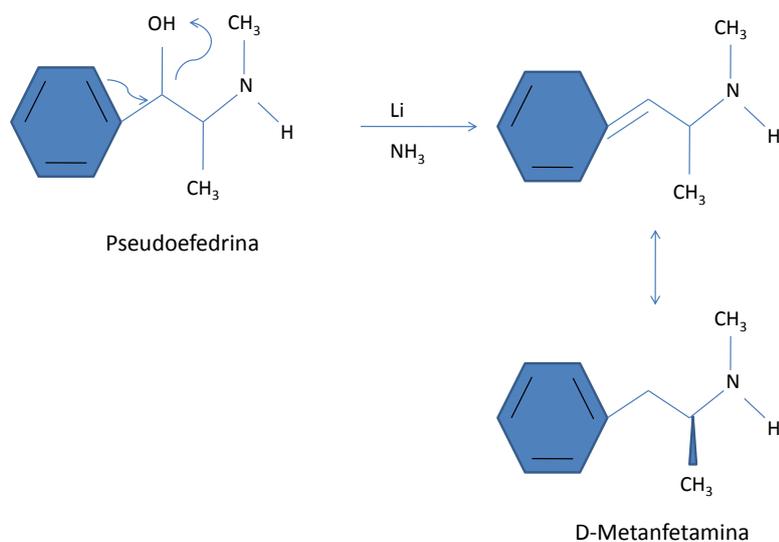
La METH è una N-metil isopropil-amina, con un gruppo fenilico sul Carbonio 2. La droga viene spesso commercializzata in cristalli sotto il nome di *"ice"* *"crystal"* o *"tina"*; viene spesso venduta anche sotto forma di Sali di colore azzurro col nome di *"blue-meth"*; infine è anche molto diffusa sotto forma di pastiglie colorate.

**Fig.2**

**A.**



**B.**



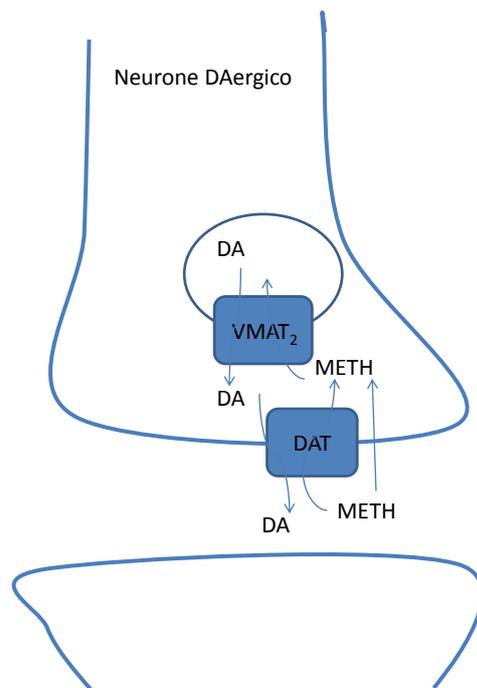
**Figura 2. Schema rappresentativo delle reazioni di sintesi della METH**

**A.** Reazione di amminazione riduttiva tra il P2P o fenil-acetone e la N-metil-formammide, con formazione di una miscela racemica contenente per il 50% *D*-METH e per il restante 50% *L*-METH. **B.** Riduzione di Birch della Pseudoefedrina che in presenza di Litio (Li) e Ammoniaca (NH<sub>3</sub>) porta alla formazione solo dell'isomero *D* della METH.

## 1.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLA METH

La METH agisce come un “falso neurotrasmettitore” che viene trasportato nel citoplasma del neurone dal trasportatore di membrana della Dopamina (DAT) e una volta fatto il suo ingresso nella cellula neuronale, viene captato dal trasportatore vescicolare delle monoammine VMAT<sub>2</sub>, causando una fuoriuscita di Dopamina (DA) dalla vescicola al citoplasma. Questo aumento della concentrazione di neurotrasmettitore, inverte la direzione del trasporto del DAT che, in condizioni fisiologiche si occupa del re-uptake della DA, ma in questo caso provoca la fuoriuscita di quest'ultima nello spazio extracellulare (Fig.3) [Itzhak Y and Achat-Mendes C, 2004].

**Fig.3**



**Figura 3. Ingresso della METH nel neurone Dopaminergico (DAergico)**

La METH grazie alla sua lipofilia e alla sua somiglianza strutturale con la DA, riesce a entrare nel neurone sia per diffusione sia attraverso il DAT. Una volta dentro la cellula neuronale, essa agisce sulla VMAT<sub>2</sub> aumentando la concentrazione intracellulare di DA. Questo permette di invertire il senso di trasporto del DAT, che induce una fuoriuscita di neurotrasmettitore. La DA nello spazio sinaptico può a questo punto, esplicare le sue azioni e attivare una serie di pathways a cascata.

Il meccanismo d'azione appena descritto è possibile solo grazie alla forte somiglianza strutturale della METH con la DA, caratteristica che fa della METH un substrato dei trasportatori delle monoamine, come il DAT il quale, permettendo l'ingresso del falso neurotrasmettitore, induce un aumento delle concentrazioni di monoamine, in particolare DA, nello spazio sinaptico.

Come conseguenza all'accumulo di monoamine nello spazio extracellulare, si attivano una serie di circuiti cerebrali i cui effetti sono cruciali nel danno dei terminali monoaminergici prodotto dalla METH. Tra questi, il circuito di maggior rilevanza nella tossicità da METH è quello che collega i gangli della base con talamo e corteccia, e che induce come effetto finale il rilascio di Glutammato (GLU) dalle fibre corticali e un conseguente effetto di eccitotossicità [Marshall JF and O'Dell SJ, 2012]. Una volta entrata nei neuroni monoaminergici, la METH scatena una varietà di effetti che nel loro insieme sono la causa della neurotossicità di questa droga d'abuso.

Questi effetti, schematizzati in Fig. 4, possono essere sintetizzati in 4 punti principali:

## 1) Aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS)

La METH è capace di indurre un aumento di DA nel citoplasma neuronale. Tale aumento è causato dalla sua azione sui trasportatori delle vescicole sinaptiche (VMAT) che sono attivate dalla METH permettendo la fuoriuscita di DA nel citoplasma neuronale. La DA in eccesso nel citoplasma neuronale può essere trasformata enzimaticamente producendo l'acido 3,4-diidrossifenil-acetico (DOPAC) e il perossido di idrogeno (Fig.4-a); oppure, la DA in eccesso, può anche auto-ossidarsi in semi-chinoni e chinoni della DA portando alla contemporanea formazione dell'anione superossido e quindi all'accumulo di ROS (Fig.4-b) [Berman SB, et al. 1996]. L'eccessiva produzione di ROS da parte della METH, può sovrastare la capacità dei sistemi antiossidanti endogeni, causando danno ai lipidi, alle proteine e agli acidi nucleici cellulari [Kuhn DM, et al. 2006].

E' stato dimostrato, infatti, che gli effetti neurotossici delle anfetamine, possono essere attenuati con la somministrazione di sostanze antiossidanti o attraverso una *over*-espressione degli enzimi antiossidanti capaci di neutralizzare l'accumulo di ROS e quindi di impedire il danno cellulare [Yamamoto BK, et al. 2010]. Per esempio, Fukami e collaboratori hanno dimostrato che nei ratti trattati con METH, il pre-trattamento con N-Acetil-L-Cisteina induce protezione contro la deplezione dei

terminali monoaminergici indotta dalle droghe psicostimolanti [Fukami G, et al. 2004].

Inoltre, è stato anche dimostrato che, il trattamento con METH nei topi transgenici che *over-esprimono* la Rame-Zinco Super Ossido Dismutasi (CuZnSOD), enzima citoplasmatico che catalizza la reazione di dismutazione dei radicali superossidi, sono protetti dalla neurotossicità indotta dalla METH [Cadet JL, et al. 1994; Hirata H, et al. 1996]

La METH inoltre, stimola il circuito neuronale gangli della base-talamo-corteccia, inducendo il rilascio di GLU il cui accumulo extracellulare causa il danno da eccitotossicità (Fig.4-c): il GLU attiva i recettori *N-methyl-D-aspartate* (NMDA) causando un flusso intracellulare di  $Ca^{2+}$ , il quale a sua volta attiva delle *pathways* enzimatiche che aumentano la produzione di ROS e di RNS. Ad esempio, l'aumento intracellulare di  $Ca^{2+}$  può attivare l'enzima neuronale Ossido Nitrico Sintasi (nNOS) aumentando i livelli di ossido nitrico (NO), il quale può direttamente danneggiare la cellula, oppure reagire con l'anione superossido, dando origine al perossinitrito e causando pertanto l'accumulo di RNS (Fig.4-d) [Radi R, et al.1991]. La generazione di RNS è altamente tossica in quanto attiva la via apoptotica che si conclude con il malfunzionamento dei mitocondri, del reticolo endoplasmatico (RE), e col danno al DNA [Uehara T 2007]. Il coinvolgimento di questo enzima neuronale nella neurotossicità indotta dalla METH, è stato rivelato dal gruppo di ricerca di Itzhak nel

1996. Questo gruppo ha dimostrato che il pretrattamento con il 7-NitroIndazolo (7-NI), un inibitore del nNOS, di topi sottoposti a un regime neurotossico di METH, fornisce una piena protezione contro la deplezione di DA e dei suoi metaboliti (DOPAC e acido omovanillico) riportando i livelli di questi ai valori basali [Itzhak Y and Ali SF 1996].

## 2) Danni metabolici al mitocondrio

La METH e la DA accumulati nel citosol cellulare sono in grado di inibire i complessi della catena di trasporto degli elettroni nel mitocondrio. In questo modo gli elettroni ad alta energia lasciano prematuramente la catena di trasporto causando la riduzione di ossigeno incompleta, inducendo quindi la formazione dell'anione superossido senza permettere la formazione dell'ATP necessario alla cellula stessa per il riparo dal danno da METH (Fig.4-e) [Brown JM, et al. 2005].

## 3) Induzione di risposte infiammatorie

Nel sistema nervoso centrale (SNC) la microglia svolge un ruolo simil-macrofagico, pertanto si occupa della risposta iniziale al danno cerebrale e svolge la funzione di *antigen presenting cell*. Allo stato fisiologico le cellule microgliali

presentano una morfologia altamente ramificata, per meglio monitorare l'ambiente neuronale; in risposta a un'inflammatione o in caso di danno cerebrale, le cellule microgliali si ingrossano, migrano nella sede del danno e fagocitano le cellule morte e/o morenti [Krasnova IN and Cadet JL, 2009]. L'aumento di GLU extracellulare e l'accumulo di chinoni e semi-chinoni della DA, indotti dalla METH, sono tra i fattori che possono attivare le cellule microgliali. Tuttavia, mentre l'attivazione della microglia è essenziale per la risposta immunitaria in loco, la loro *over*-attivazione può scatenare il rilascio di fattori di danno cellulare e quindi indurre a loro volta effetti neurotossici (Fig.4-f). Infatti è stato dimostrato che la microglia *over*-attivata rilascia: citochine, ROS, RNS e prostaglandine, tutti fattori che causando danno neuronale, possono essere coinvolti nella neurodegenerazione [Perry VH, et al. 2007; Block ML, et al. 2007]. Infatti la microglia sembra avere un ruolo importante in diversi disordini neurodegenerativi, come il Parkinson [Kim YS and Joh TH, 2006] l'Alzheimer [Xiang Z, et al. 2006] e l'Huntington [Sapp E, et al. 2001]. Pertanto l'*over*-attivazione della microglia sembra essere uno degli eventi precoci nella cascata della neurotossicità indotta dalla METH [Krasnova IN and Cadet JL, 2009]. È stato dimostrato che la METH induce nello striato di ratti Sprague Dowley (SD) una robusta attivazione della microglia evidente soprattutto due giorni dopo il trattamento [LaVoie MJ, et al. 2004].

Anche gli astrociti giocano un ruolo fondamentale nell'infiammazione indotta dalla METH. Essi regolano le concentrazioni extracellulari di GLU attraverso l'*uptake* del neurotrasmettitore e quando vengono attivati attraverso l'aumento di  $Ca^{2+}$  intracellulare, sono anche in grado di rilasciare GLU. In condizioni fisiologiche inoltre, gli astrociti sopprimono l'attivazione della microglia rilasciando citochine antinfiammatorie (*trophic growth factor-β* o TGF-β e interleuchina-10 o IL-10) e fattori neurotrofici. Gli astrociti però, in determinate condizioni di stress cellulare, possono rilasciare sostanze coinvolte nello sviluppo dell'infiammazione del SNC come *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) e interleuchina 1-β (IL-1 β) [Yamamoto BK, et al. 2010]. Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato il ruolo preminente dell'attivazione astrocitaria nella neurotossicità indotta dalla METH. Per esempio, è stato dimostrato da diversi gruppi di ricerca, che la METH nello striato di topo e di ratto induce un aumento dell'espressione del *marker* astrocitario *glial fibrillar acidic protein* (GFAP) indice di gliosi e associata a fenomeni infiammatori [Thomas DM, et al. 2004; Pu C and Vorhees CV, 1993]. Inoltre è stato dimostrato mediante un'analisi "temporale" dell'astrogliosi che il picco dell'attivazione astrocitaria, nei topi trattati con METH, si aveva due giorni dopo la somministrazione della droga e che l'astrogliosi si manteneva per almeno sette giorni dopo il trattamento [O'Callaghan JP and Miller DB, 1994]. Pertanto si può affermare che l'attivazione astrocitaria è un

evento che si scatena rapidamente in seguito alla somministrazione di METH e che perdura nel tempo [LaVoie MJ, et al. 2004].

#### 4) Collasso della Barriera Emato-encefalica (BEE)

Il collasso della BEE indotto dalla METH avviene in seguito alla produzione di ROS, all'ipertermia, e attraverso un meccanismo che coinvolge le metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9. Queste, una volta attivate dalla METH, alterano l'integrità delle giunzioni tra le cellule endoteliali vascolari della BEE e digeriscono i componenti della matrice extracellulare che compone la lamina basale della barriera. Il collasso di quest'ultima, permette quindi l'ingresso di ioni e proteine nel cervello, che richiamano osmoticamente H<sub>2</sub>O causando edema cerebrale (Fig.4-g) [Cadet JL and Krasnova IN, 2009].



## 5) Ipertermia

L'ipertermia è l'evento tossico a breve termine più evidente nei modelli animali trattati con METH. Nei ratti la temperatura corporea può superare i 40°C dopo ciascuna singola somministrazione, e ciò può scatenare la morte dell'animale. Per questo motivo i ricercatori, oggi, tentano di controllare le temperature corporee degli animali durante l'esperimento mediante bagni di ghiaccio o utilizzando camere fredde, con lo scopo di diminuire l'effetto ipertermico della droga e quindi diminuire la mortalità [Davidson C, et al. 2001].

## 1.2 EFFETTI DELLA METH: DATI CLINICI

L'uso di METH negli ultimi trent'anni è aumentato considerevolmente in tutto il mondo, e con esso sono aumentati anche i casi di emergenze dovuti all'intossicazione acuta di questa droga d'abuso. Infatti i casi di morte per l'uso di METH, tra gli anni '80 e '90 sono stati il doppio rispetto a quelli per l'utilizzo di cocaina [Cadet JL, et al. 2003].

La METH sia che sia ingerita, sniffata o somministrata per via intravenosa, riesce ad attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) e ad entrare nei terminali monoaminergici, inducendo il rilascio dei neurotrasmettitori (Dopamina, DA e Serotonina, 5HT). Quando la METH è assunta in maniera acuta induce un senso di euforia, aumento dello stato di vigilanza, iperattività, e modificazioni cardiovascolari; effetti comuni a tutte le droghe psicostimolanti [Marshall JF and O'Dell SJ, 2012]. Questi effetti possono persistere per numerose ore dopo l'assunzione, a causa della lunga emivita della METH, che ha un *range* di 10-12 ore [Schepers RJ, et al. 2003]. Tuttavia, quando la METH viene assunta ripetutamente (*binge* di METH) o a dosi elevate, nell'uomo è associata a numerosi effetti avversi come, agitazione, ansia, allucinazioni, delirio, psicosi, deficit cognitivi e psicomotori, assenze e anche morte. I pazienti che abusano di METH e che sono soccorsi negli ospedali, spesso si trovano in uno stato di incoscienza dovuto sia all'effetto diretto

della droga quando viene assunta per via intravenosa, sia alle assenze indotte da questa famiglia di droghe d'abuso ATS [Cadet JL, et al. 2003]. L'assunzione di dosi massicce di questa droga può causare effetti ancora più drammatici, come insufficienza epatica e renale, aritmie cardiache e attacchi di cuore, emorragie cerebrovascolari, infarti e ipertermia.

L'uso cronico di METH inoltre, contribuisce a indurre una personalità ansiosa, depressa e aggressiva, all'isolamento sociale e all'evidenziarsi di psicosi e disfunzioni psicomotorie. Diversi studi neuropsicologici hanno dimostrato l'instaurarsi di deficit dell'attenzione, disturbi della memoria e delle capacità decisionali, nei soggetti che abusano della droga [Krasnova IN and Cadet JL, 2009; Gonzalez R et al, 2004]. Infine l'astinenza da METH può produrre anedonia, irritabilità, fatica e l'irrefrenabile desiderio della droga stessa.

Numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che questi effetti negativi neuropsichici indotti dall'abuso di METH sono dovuti, almeno in parte, alle modificazioni neuropatologiche del SNC che la droga induce. Studi di immagine del SNC hanno dimostrato infatti che, nei soggetti che fanno uso di METH, vi sono delle modificazioni cerebrali che sono patognomoniche della neurodegenerazione [Chang L et al, 2007]. Per esempio, studi che utilizzano la *positron emission tomography* (PET) documentano gli effetti neurodegenerativi della droga, evidenziando una

diminuzione sostanziale del trasportatore della DA, il DAT, negli utilizzatori di METH anche dopo un periodo di astinenza di circa 1-3 anni [Cadet JL, et al. 2003].

Studi più recenti hanno dimostrato anche una forte attivazione della microglia in diverse aree cerebrali degli utilizzatori di METH. Nei soggetti in fase di astinenza prolungata questa prominente attivazione è però diminuita. [Sekine Y, et al. 2008]. Inoltre, analisi post-mortem hanno evidenziato una diminuzione della DA, della Tirosina idrossilasi (TH) e dei livelli del DAT nel caudato putamen e nel nucleo accumbens dei soggetti che hanno fatto un uso cronico di METH [Kitamura O, et al. 2007; Moszczynska A, et al. 2004; Wilson JM, et al. 1996]. Infine, nella stessa tipologia di soggetti, sono stati trovati aumentati i livelli dei marker di attivazione gliale e i livelli dei composti antiossidanti come la CuZn-Superossidodismutasi (CuZn-SOD), il glutathione e l'acido urico [Krasnova IN and Cadet JL, 2009].

L'utilizzo compulsivo di METH da parte dei soggetti che ne fanno uso, prevede numerose somministrazioni di dosi elevate (0.3-1.0 g) della droga ad intervalli di tempo molto ravvicinati (di circa 2 ore). Questo tipo di assunzione permette di avere sempre elevati livelli plasmatici della droga e di non arrivare mai al cosiddetto *steady-state* plasmatico. In questo modo però, il soggetto che fa uso di METH può sviluppare una tolleranza agli effetti letali della droga, la quale nei casi più estremi, può arrivare ad essere pari a 5 o 6 volte la LD<sub>50</sub> (*lethal dose*<sub>50</sub>) di un soggetto *naive*. Questo effetto di tolleranza è spesso la causa dell'*overdose* di METH con

conseguente morte del soggetto, che viene preceduta da una forte ipertermia, attacchi epilettici, ipossia e crisi ipertensive.

### 1.3 METH: MODELLI ANIMALI

Il modello animale che riflette le condizioni di accumulo e *overdose* di METH nell'uomo, è chiamato *acute toxic dosing (ATD) model* e prevede 4 somministrazioni sotto cute (s.c.) di METH alla dose di 10mg/Kg ogni 2 ore [Davidson C, et al. 2001] (*binge* di METH). Questo modello di somministrazione è il più utilizzato nei ratti ed è in grado di indurre la degenerazione dei terminali DAergici e 5HTergici, la perdita di TH, DAT e triptofano idrossilasi (5HT-H), tutti segni di neurodegenerazione. [Itzhak Y and Achat-Mendes C, 2004; Cadet JL, et al. 2003; Axt KJ and Molliver ME, 1991]. Gli effetti indotti da questo regime neurotossico sono effetti a lungo termine che persistono per circa 8 mesi, quando si evidenziano segni di recupero sui terminali monoaminergici [Davidson C, et al. 2001]. E' stato inoltre dimostrato che il *binge* di METH induce perdita dei neuroni DAergici che vanno incontro a morte cellulare apoptotica [Cadet JL, et al. 2003; Deng X and Cadet JL, 2000].

Esistono anche i modelli animali di abuso cronico di METH; questi modelli prevedono l'utilizzo, nel ratto, di piccole pompe osmotiche che somministrano infusioni continue di METH alla dose di 16-20 mg/Kg/day [Davidson C, et al. 2001]. Tuttavia, più di recente è stata introdotta la *self-administration* di METH, che mima la somministrazione cronica di dosi sempre più elevate da parte degli utilizzatori abituali della droga [Marshall JF and O'Dell SJ, 2012].

Come riportato precedentemente, i soggetti che abusano di METH mostrano numerosi deficit cognitivi, che includono la compromissione della memoria, disturbi dell'attenzione e incapacità decisionale. L'interpretazione dei test cognitivi sull'uomo però, è molto complessa in quanto può essere influenzata non solo dall'utilizzo della droga, ma anche dalla storia e dal tipo di educazione di ciascun soggetto. Pertanto i modelli animali rappresentano un approccio ideale per lo studio degli effetti cognitivi della METH, in quanto negli animali è possibile eliminare influenze o variabili di altro tipo.

L'esposizione dei ratti ad un *binge* di METH, che produce un danno ai sistemi DAergico e 5HTergico, induce anche un deficit della memoria che può essere valutato tramite diversi test incluso il *novel object recognition (NOR) memory*. Tale test valuta la capacità di riconoscere un nuovo oggetto, abilità che dipende dall'integrità della corteccia peririnale. Per testare questo tipo di memoria, gli animali sono sottoposti a un test che valuta la capacità dei ratti di ricordare l'identità degli oggetti posti in posizioni fisse in un'arena. Inizialmente vi è la fase di presentazione e familiarizzazione degli oggetti, seguita dalla fase di test, che prevede la sostituzione di uno degli oggetti con uno nuovo. Gli animali di controllo trattati con il veicolo, spendono la maggior parte del tempo a esplorare il nuovo oggetto, mentre gli animali trattati con METH esplorano in maniera indistinta sia l'oggetto familiare sia il nuovo oggetto [Belcher AM, et al. 2005].

La METH induce anche un deficit dell'apprendimento motorio, in particolare del *response learning*, che dipende dall'integrità delle terminazioni nervose DAergiche striatali, e del *place learning*, che viene controllata dall'ippocampo. Questi due tipi di memoria sono analizzati mediante il test del *radial arm maze* e il test del *Cincinnati water maze*, rispettivamente. Entrambi i test utilizzano dei labirinti e analizzano la memoria mediante l'uso di riferimenti; il primo test utilizza un punto di riferimento interno al labirinto per testare la *response learning*; mentre il secondo utilizza un punto di riferimento esterno al labirinto, che in questo caso si trova in acqua, per testare la *place learning*. In entrambi i casi i ratti esposti a un *binge* di METH, mostrano un basso apprendimento dei punti di riferimento a cui vengono esposti, rispetto ai ratti di controllo *naive* [Marshall JF and O'Dell SJ, 2012].

#### 1.4 RECUPERO DEL DANNO INDOTTO DALLA METH

E' stato dimostrato che un periodo di astinenza dalla METH che va dai 6 ai 12 mesi nel ratto, induce un ripristino dei terminali DAergici e 5HTergici [Cass WA and Manning MW, 1999; Cass WA, 2000a]. Inoltre, vi sono degli studi sull'uomo che dimostrano che i livelli striatali del DAT misurati tramite PET, sono aumentati di circa il 20% nei soggetti che non fanno uso di METH da 12-17 mesi, rispetto ai soggetti che ancora ne fanno uso [Volkow ND, et al. 2001].

Questo recupero del danno ai terminali monoaminergici può essere in parte spiegato dalla *up*-regolazione dei fattori neurotrofici indotta dalla METH. E' possibile infatti che i cambiamenti nell'espressione di questi fattori, indotti dalla METH, siano responsabili almeno in parte, del recupero spontaneo e tardivo di alcuni *markers* della DA, sia negli animali che nell'uomo [Cadet JL, et al. 2003; Volkow ND, et al. 2001]. Tuttavia, il recupero spontaneo del danno DAergico e 5HTergico indotto dalla METH, avviene in un periodo molto lungo che va da alcuni mesi, fino a anni; pertanto è interessante studiare nuovi approcci che possano accelerare questo recupero.

Ad esempio è stato dimostrato che i fattori neurotrofici quali BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NGF (*nerve growth factor*), GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), EGF (*epidermal growth factor*), e FGF (*fibroblast growth factor*)

esercitano effetti trofici e protettivi in diversi modelli di neurodegenerazione sia *in vitro* che *in vivo* [Cadet JL, et al 2003]. In particolare Cass e collaboratori [Cass WA, 1996; Cass WA, et al. 2000b] hanno dimostrato che la somministrazione di GDNF un giorno prima del trattamento con METH è capace di prevenire le diminuzioni di DA nello striato dei ratti; e inoltre la somministrazione di GDNF in ratti pretrattati con un *binge* di METH, ristabilisce il contenuto striatale di DA.

## 1.5 COABUSO DI METH CON ALTRE DROGHE

Come descritto in precedenza, numerosi studi preclinici e clinici dimostrano che la METH può avere effetti neurotossici e neurodegenerativi, e osservazioni cliniche associano l'abuso di METH con numerosi deficit neurocognitivi. L'interpretazione di questi dati clinici tuttavia, è alterata in quanto la METH raramente viene utilizzata da sola, ma spesso vi è l'abuso contemporaneo e sequenziale di altre sostanze psicoattive [Gonzalez R, et al. 2004]. Tossmann e collaboratori nel 2001 hanno condotto uno studio in sette capitali Europee su 3500 soggetti, abituali frequentatori dei "*techno parties*", che ha rivelato un uso sostanziale di più droghe d'abuso durante questo tipo di feste. Le diverse sostanze maggiormente co-abusate da questi soggetti, sono la METH e altri derivati anfetaminici (come la metilen-diossi-metanfetamina o MDMA), cocaina e cannabis [Tossmann P, et al. 2001]. Quest'ultima è la droga più comunemente coabusata dagli utilizzatori di METH. Uno studio condotto da Gonzalez e collaboratori nel 2004 sulla base di dati estrapolati dai *self-report*, evidenzia che i partecipanti del loro centro di ricerche sono abituali consumatori di METH e marijuana [Gonzalez R, et al. 2004].

Tuttavia, ancora non è noto quale sia il reale vantaggio dei soggetti che fanno uso contemporaneo delle due droghe d'abuso: i) potenziare gli effetti stimolatori ed euforici della METH, oppure ii) attenuare gli effetti avversi della METH.

## 1.6 CANNABINOIDI

I cannabinoidi sono i componenti attivi della *cannabis sativa* (*marijuana*); tra questi il composto con maggiore attività è il  $\Delta$ 9-tetraidrocannabinolo ( $\Delta$ 9-THC), un terpene fenolico che è stato isolato come sostanza pura solo nel 1964 [Gaoni Y and Mechoulam R, 1964]. Tuttavia il meccanismo d'azione di questa sostanza psicoattiva è stato scoperto solo alla fine degli anni '80 e inizio anni '90 grazie alla caratterizzazione di due recettori [Devane WA, et al. 1988; Munro S, et al. 1993], oggi chiamati CB1 e CB2, e dei due agonisti endogeni (endocannabinoidi): l'anandamide (AEA) [Devane WA, et al. 1992] e il 2-arachidonil glicerolo (2-AG) [Mechoulam R, et al. 1995] (Fig.5).



Con la scoperta dei due recettori, il termine cannabinoidi ha assunto una definizione più generale che racchiude tutte quelle sostanze capaci di interagire con i recettori CB1 e/o CB2; mentre tutti i ligandi endogeni di questi ultimi, raggruppati sotto il nome di endocannabinoidi, fanno parte del sistema endocannabinoide (EC). Il sistema EC, identificato e caratterizzato come il circuito neuronale attraverso il quale il  $\Delta^9$ -THC interagisce per esplicitare i suoi effetti fisiologici e psicotropi, è composto da ligandi endogeni dei recettori cannabinoidi denominati endocannabinoidi, dai recettori cannabinoidergici (CB), dalle proteine e dagli enzimi che regolano la sintesi e la degradazione degli endocannabinoidi.

Gli endocannabinoidi sono coinvolti in numerosi processi fisiologici, come la termoregolazione, il consumo di cibo, le funzioni immunitarie, le percezioni, le funzioni cognitive e le funzioni motorie. Inoltre il sistema endocannabinoide viene considerato come facente parte di un *network* protettivo, in quanto lavora in stretta “collaborazione” col sistema immunitario, e pertanto viene implicato in un largo numero di condizioni patologiche [Pope C, et al. 2010]. Nel SNC, gli endocannabinoidi agiscono come neuromodulatori ed esplicano le loro funzioni grazie alla presenza dei due recettori per i cannabinoidi, CB1 e CB2. Questi sono entrambi dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR) ma hanno una diversa distribuzione nel SNC; il primo è molto più abbondante e ha una localizzazione neuronale, mentre il secondo è prevalentemente situato nelle cellule microgliali

[Fowler CJ, et al. 2010]. Inoltre l'AEA non si lega solo al CB1 e al CB2, ma è capace anche di stimolare i recettori vanilloidi, TRPV1 [Grotenhermen F, 2006].

Gli endocannabinoidi non vengono sintetizzati e immagazzinati nelle vescicole sinaptiche neuronali, come avviene per i neurotrasmettitori, ma essi vengono sintetizzati *on-demand* a partire dal N-arachidonil-fosfatidiletanolamina (NArPE), precursore biosintetico dell'AEA, e dal diacilglicerolo (DAG) e acido arachidonico da cui viene invece sintetizzato il 2-AG. Una volta sintetizzati, gli endocannabinoidi vengono rilasciati dalle cellule nello spazio sinaptico dove esplicano le loro azioni legandosi ai recettori, quindi vengono inattivati rapidamente tramite *re-uptake* neuronale e successiva idrolisi enzimatica. Gli enzimi maggiormente responsabili della reazione di degradazione sono la *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) e la *monoacylglycerol lipase* (MAGL); la prima si occupa della reazione di idrolisi amidica dell'AEA, la seconda invece si occupa dell'idrolisi esterea del 2-AG [De Petrocellis L and Di Marzo V, 2009]. I cannabinoidi, che siano endogeni o esogeni, interagiscono con i recettori CB1 e CB2.

Il recettore CB1 ha una localizzazione presinaptica pertanto gli endocannabinoidi hanno un ruolo molto importante nella regolazione della trasmissione sinaptica. Essi sono coinvolti nella cosiddetta *depolarization-induced suppression of inhibition* (DSI) e nella *depolarization-induced suppression of*

*excitation* (DSE); cioè l'attivazione del recettore presinaptico CB1 accoppiato alla proteina  $G_{i/o}$  induce l'inibizione dell'apertura dei canali al  $Ca^{2+}$  impedendo l'ingresso dello ione nella cellula neuronale e inibendo il rilascio del neurotrasmettitore (NT) dalle vescicole sinaptiche. In questo modo i cannabinoidi bloccano la risposta inibitoria o eccitatoria del neurone in cui si trova il recettore CB1 che hanno attivato. Oltre a questa via di trasduzione del segnale, la stimolazione del recettore CB1 attiva numerose altre *pathways*, tra cui quella della proteina chinasi A (PKA). L'attivazione del recettore CB1 accoppiato alla proteina  $G_{i/o}$ , induce l'inibizione dell'adenilato ciclasi (AC) che porta ad una riduzione del AMP ciclico (cAMP), che stimola la PKA. La ridotta attività della PKA, può causare diversi effetti, ad esempio nei neuroni ippocampali quest'azione del CB1 attenua gli effetti eccitotossici mediati dall'attivazione dei recettori NMDA [Howlett AC, et al. 2010]. L'attivazione dei recettori CB1 mediata dai cannabinoidi, attiva anche le proteine chinasi MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) inducendo le ERK 1/2 (*extracellular-signal regulated kinases*) che stimolano, a seconda della cellula in cui si trovano, diversi fattori di trascrizione.

Anche il recettore CB2 è capace di attivare le proteine  $G_{i/o}$  inducendo le risposte intracellulari cellule-specifiche, appena descritte [Howlett AC, 2002].

Inoltre il CB1 può attivare altri *pathways* mediati da diversi secondi messaggeri, attraverso l'attivazione di proteine G di tipo q. Queste includono la via della fosfolipasi C/inositolo-trifosfato/ $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, la via del fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K)/Akt, e la via delle chinasi Jun N-terminali (JNK) 1 e 2 [Howlett AC, 2002].

Infine è importante ricordare l'esistenza di due proteine specifiche che interagiscono con i recettori per i cannabinoidi, chiamate CRIP1a e CRIP1b, che hanno un ruolo importante nella regolazione del trafficking intracellulare, nella desensitizzazione e nell'attività costitutiva del recettore CB1 [Howlett AC, et al. 2010].

## 1.7 CANNABINOIDI: NEUROINFIAMMAZIONE E PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE

Col termine neuroinfiammazione si esprime un concetto relativamente recente che indica una risposta infiammatoria localizzata a livello cerebrale e che si distingue dall'infiammazione localizzata a livello del sistema periferico. Nel caso della neuroinfiammazione, le cellule che giocano il ruolo più importante sono le cellule gliali, quali gli astrociti e le cellule microgliali, i linfociti, i monociti e i macrofagi. Una delle maggiori conseguenze dell'attivazione delle cellule gliali secondaria a un danno, è la sintesi e il rilascio di molecole citotossiche, come le citochine, le chemochine, il glutammato, le interleuchine, la NO e i ROS. L'obiettivo finale di questa risposta infiammatoria è quella di eliminare gli eventuali agenti patogeni ed eventualmente riparare il tessuto nervoso danneggiato. Durante la neuroinfiammazione insieme al rilascio di molecole citotossiche vengono rilasciate dalle cellule gliali, anche molecole di altro tipo quali i fattori di crescita, al fine di bilanciare l'omeostasi cerebrale [Fattore L, 2015]. Nelle malattie neurodegenerative è spesso presente un forte stato di neuroinfiammazione che viene considerato uno dei fattori eziologici della malattia [Minghetti L, 2005]. Anche durante il normale invecchiamento si osserva l'attivazione delle cellule gliali, ma nelle condizioni neurodegenerative associate all'età, tale attivazione è esacerbata. Infatti, è stato dimostrato che l'uso di sostanze con proprietà antinfiammatorie aiuta ad arginare i sintomi delle patologie neurodegenerative, e in particolare i cannabinoidi hanno

mostrato avere questo tipo di attività antinfiammatoria che induce effetti neuroprotettivi in diversi tipi di paradigmi neurodegenerativi [Correa F, et al. 2005; van der Stelt M and Di Marzo V, 2005].

L'azione antinfiammatoria dei cannabinoidi, come il THC, è mediata dalla presenza dei recettori, CB1 e CB2, nelle cellule gliali in particolare negli astrociti e nella microglia. Queste cellule esprimono entrambi i recettori per i cannabinoidi, hanno sia gli enzimi di biosintesi che quelli di degradazione degli endocannabinoidi, e sotto stimolazione hanno la capacità di rilasciare gli endocannabinoidi [Stella N, 2009; Stella N, 2010]. Uno studio condotto dal gruppo di ricerca di Baker nel 2000 ha dimostrato che il trattamento con  $\Delta^9$ -THC o WIN 55212-2, due agonisti dei recettori CB1 e CB2, nel topo diminuisce i sintomi di spasticità e tremori su un modello di sclerosi multipla, patologia caratterizzata da infiammazione cronica nel SNC. Quest'azione neuroprotettiva viene bloccata sia dal SR141716A che dal SR144528, rispettivamente antagonisti del recettore CB1 e CB2 [Baker D, 2000].

Numerosi studi hanno infine, evidenziato gli effetti neuroprotettivi degli agonisti dei recettori CB1 e CB2, in diversi modelli animali di neurodegenerazione [Fernandez-Ruiz J, et al. 2010].

In un modello di Alzheimer, ratti dell'età di 23 mesi sono stati trattati per 21 giorni con l'agonista misto dei recettori CB1 e CB2, il WIN. Tale tipo di trattamento

riduce l'espressione della microglia attivata nell'ippocampo e diminuisce i livelli di mRNA delle citochine pro-infiammatorie, come l'interleuchina-6 (IL-6). Inoltre sono diminuiti anche i livelli delle proteine pro-infiammatorie *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) e interleuchina 1- $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) [Marchalant Y, et al. 2009].

Gli effetti neuroprotettivi dei cannabinoidi naturali e sintetici sono stati dimostrati non solo in modelli animali neurodegenerativi come quelli di Parkinson [Garcia-Arencibia M, et al. 2009] e della malattia di Huntington [Valdeolivas S, et al. 2012], ma anche in modelli animali di danno cerebrale come eccitotossicità da GLU, ipossia, ischemia e stress ossidativo [Panikashvili D, et al. 2001; Marsicano G, et al. 2002].

## 1.8 SCOPO DEL LAVORO

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare in un modello animale di neurotossicità indotta da METH gli effetti neuroprotettivi del  $\Delta 9$ -THC. È stato utilizzato un protocollo di trattamento di METH (*binge* di elevate dosi di METH) che, come riportato in precedenti studi, è in grado di indurre neurotossicità [Krasnova, 2009]. In particolare, i ratti sottoposti al regime neurotossico di METH (4 iniezioni sottocute (s.c.) alla dose di 10 mg/Kg, ad intervalli di 2h) sono stati pretrattati (PRE) o post-trattati (POST) con  $\Delta 9$ -THC somministrato per via intraperitoneale (i.p.) alla dose di 1 o 3 mg/Kg. Gli animali sono stati quindi sacrificati tramite perfusione o per decapitazione tre giorni dopo l'ultima somministrazione di  $\Delta 9$ -THC.

L'azione neuroprotettiva del  $\Delta 9$ -THC è stata determinata valutando la riduzione dell'astrogliosi mediante l'immunoreattività in immunocistochimica (IHC) per la GFAP e l'espressione di nNOS, i quali sono aumentati nella neurotossicità indotta dalla METH. Inoltre, allo scopo di determinare un possibile ruolo del recettore CB1 nel trattamento con  $\Delta 9$ -THC, i ratti post-trattati con  $\Delta 9$ -THC alla dose di 1mg/Kg sono stati pre-trattati per via i.p. con l'antagonista dei recettori CB1, SR141716A (SR) alla dose di 1 mg/Kg.

Per evidenziare altri fattori coinvolti nel meccanismo neuroprotettivo del  $\Delta 9$ -THC, nei ratti sottoposti al regime neurotossico con METH e post-trattati con  $\Delta 9$ -THC

(1 mg/Kg) sono stati valutati mediante western blot (WB) o IHC, altri marcatori di neurotossicità e neuroinfiammazione quali la TH, il BDNF e l'IBA1.

Infine negli stessi animali è stata valutata, tramite WB, l'espressione dei recettori CB2, responsabili della regolazione di alcuni di quei marcatori implicati nella neuroinfiammazione e nella neurotossicità indotte dalla METH.

## 2 MATERIALI E METODI

### 2.1 ANIMALI

In questo studio sono stati utilizzati ratti Sprague Dowley maschi adulti (Charles River, Como, Italy) del peso di circa 300-350 g , stabulati in gabbie individuali alla temperatura di 22°C e con il 60% di umidità, con un ciclo luce/buio di 12 ore (luce dalle h: 7,00).

Tutte le procedure sperimentali descritte in tale studio sono state condotte in accordo con la legge Italiana sulla “Protezione degli animali usati per gli esperimenti da laboratorio o per altri scopi scientifici”. Lo stato di salute e benessere degli animali è stato regolarmente monitorato dallo staff veterinario dello stabulario.

### 2.2 FARMACI E DISEGNO SPERIMENTALE

La (+) Metanfetamina Cloridrata (METH, Sigma-Aldrich, MO, USA) è stata diluita (1mg/ml) in soluzione salina sterile e somministrata per via sottocutanea (s.c.) ad un volume di 1ml/Kg.

Il  $\Delta^9$ -Tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC, RTI International, Research Triangle Park, NC, USA) alla concentrazione iniziale di 50mg/ml in etanolo, e l'SR141716A (SR,

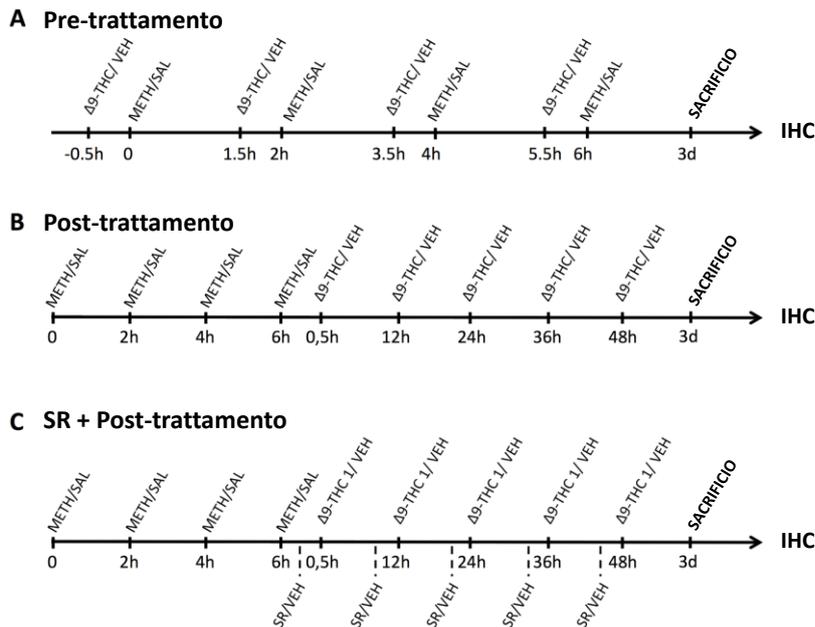
fornito gentilmente dalla Sanofy Synthelabo, Montpellier, France) sono stati diluiti in Tween 80 (al 2%), etanolo (al 2%) e soluzione salina (al 96%), e somministrati per via intraperitoneale (i.p.) ad un volume di 1ml/Kg.

I ratti sono stati divisi in maniera casuale in due differenti gruppi i quali hanno ricevuto rispettivamente quattro iniezioni s.c. di METH alla dose di 10mg/Kg (calcolata come base libera) o di soluzione salina (SAL) a intervalli di due ore. Il trattamento e la dose di METH sono stati scelti sulla base di dati riportati in letteratura che dimostrano che a queste dosi essa induce effetti neurotossici sui sistemi DAergico e 5HTergico, e danni neuronali a lungo termine comparabili a quelli trovati nei soggetti che abusano di questa sostanza [Krasnova IN and Cadet JL, 2009; Marshall JF, O'Dell SJ 2012].

Come mostrato in figura 6, i ratti trattati con METH o con SAL, hanno ricevuto anche iniezioni i.p. di  $\Delta$ 9-THC (alle dosi di 1 o 3 mg/Kg;  $\Delta$ 9-THC1,  $\Delta$ 9-THC3) o di veicolo (VEH, al volume di 1ml/Kg) 30 minuti prima di ciascuna somministrazione di METH o SAL (pre-trattamento, PRE; Fig 6A), o 0.5, 12, 24, 36 e 48 ore dopo l'ultima iniezione di METH o SAL (post-trattamento, POST; Fig 6B).

I gruppi del post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC1 o VEH, sono stati anche pre-trattati con SR alla dose di 1mg/Kg per via i.p. o con VEH (1ml/Kg) 15 minuti prima di ciascuna somministrazione di  $\Delta$ 9-THC o VEH (Fig 6C).

**Fig.6**

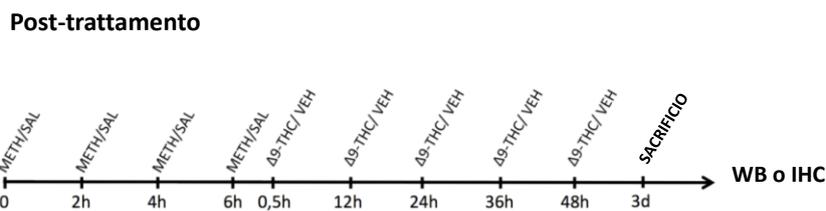


**Figura 6. Schema riassuntivo del disegno sperimentale**

**A. Pre-trattamento:** i ratti hanno ricevuto un'iniezione di  $\Delta 9$ -THC alla dose di 1mg/Kg o di 3mg/Kg o di VEH, 30 minuti prima di ciascuna somministrazione di METH o SAL. Tre giorni dopo l'ultima somministrazione di METH o di SAL, i ratti sono stati sacrificati mediante perfusione transcardiaca e i cervelli utilizzati per le analisi di immunoistochimica (IHC). **B. Post-trattamento:** 30 minuti e 12, 24, 36 e 48 ore dopo l'ultima somministrazione di METH o SAL, i ratti hanno ricevuto un'iniezione di  $\Delta 9$ -THC alla dose di 1mg/Kg o di 3mg/Kg o di VEH. Dopo tre giorni dall'ultima somministrazione di METH o SAL, i ratti sono stati sacrificati tramite perfusione e i cervelli degli animali sono stati quindi utilizzati per le analisi di IHC. **C. Trattamento con SR:** gli animali che hanno ricevuto il post-trattamento con THC alla dose di 1mg/Kg, sono stati pre-trattati con l'SR alla dose di 1mg/Kg o di VEH 15 minuti prima di ciascuna iniezione di  $\Delta 9$ -THC o VEH. Tre giorni dopo l'ultima somministrazione di METH o SAL, i ratti sono stati perfusi e i cervelli degli animali sono stati utilizzati per le analisi di IHC.

Infine è stato effettuato un quarto trattamento (Fig.7) con il medesimo regime neurotossico di METH, che prevede quattro iniezioni alla dose di 10mg/Kg, e il post-trattamento con la dose inferiore di  $\Delta$ 9-THC. Tre giorni dopo l'ultima somministrazione di METH, metà dei ratti sono stati perfusi per gli studi di IHC, mentre l'altra metà è stata sacrificata tramite decapitazione e i cervelli sono stati processati per gli esperimenti in WB.

**Fig.7**



**Figura 7. Schema riassuntivo del secondo disegno sperimentale**

I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.6B.

## 2.3 PESI E TEMPERATURE

Il peso e la temperatura rettale dei ratti sono stati misurati prima di iniziare il trattamento al tempo T0, 1 ora dopo ciascuna somministrazione di METH o SAL e 30 minuti dopo ciascuna somministrazione di  $\Delta$ 9-THC o VEH.

Durante il trattamento con METH, quando la temperatura dei ratti ha raggiunto i 40°C, questi vengono sottoposti a doccia fredda o spostati in una gabbia con ghiaccio, al fine di abbassare la temperatura corporea.

## 2.4 IMMUNOISTOCHIMICA

### PREPARAZIONE DEL TESSUTO

Tre giorni dopo l'ultima somministrazione di METH, gli animali sono stati anestetizzati con Cloralio Idrato alla dose di 400mg/Kg e sottoposti a perfusione transcardiaca con Paraformaldeide al 4% (PF 4%) e Gluteraldeide allo 0.1% (Glu 0.1%) in tampone salino fosfato 0.1M (PBS, pH=7.4). Successivamente i cervelli sono stati rimossi rapidamente, post-fissati nello stesso liquido fissativo per 6h e dopo ripetuti lavaggi in PBS, sono stati crioprotetti in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS per 48h.

### IMMUNOFLUORESCENZA

La reazione di immunoistochimica è stata effettuata in *free-floating* su sezioni di cervello coronali dello spessore di 40µm, tagliate al criostato a livello delle due aree cerebrali di interesse: corteccia prefrontale (PFC) e caudato putamen (CPu). Per facilitare il riconoscimento delle aree cerebrali da raccogliere, alcune sezioni adiacenti a quelle raccolte sono state colorate con *Neutral Red* e osservate al microscopio ottico. Successivamente è stato effettuato un blocco delle sezioni che prevede l'incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 10% di

*normal goat serum* (NGS) e 1% di *bovine serum albumin* (BSA) in PBS con lo 0.2% di *Triton X-100* (PBS-T).

Le sezioni sono state poi incubate con gli anticorpi primari che sono stati diluiti in una soluzione di PBS-T con l'1% di NGS e lo 0.1% di BSA. Gli anticorpi (Ab) utilizzati sono i seguenti: Ab monoclonale di topo anti-*glial fibrillary acidic protein* (GFAP; marcatore astrocitario) (Millipore Temecula, CA, USA) diluito 1:5000 e incubato per due notti a +4°C; Ab policlonale di coniglio anti-*neuronal Nitric Oxide Synthase* (nNOS; marcatore dell'enzima neuronale nNOS) (Millipore Temecula, CA, USA) diluito 1:3000 e incubato per due notti a +4°C; e Ab policlonale di coniglio anti-*ionized calcium binding adapter molecule 1* (IBA1; marcatore della microglia) (Wako Chemicals, USA) diluito 1:2000 e incubato per una notte a +4°C. Dopo l'incubazione, vengono effettuati alcuni lavaggi in PBS-T e successivamente le sezioni vengono incubate per 1 ora a temperatura ambiente con i rispettivi anticorpi secondari: *Alexa Fluor goat anti-mouse 594 IgG* (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA); *Alexa Fluor goat anti-rabbit 488 IgG* (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA); *Alexa Fluor goat anti-rabbit 594 IgG* (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Infine le sezioni sono state lavate in PBS e montate su vetrino utilizzando il *VectaShield anti-fade mounting media* (Vector Inc.).

Sono stati effettuati anche esperimenti di controllo paralleli omettendo l'anticorpo primario; in questi non è stata riscontrata alcuna positività di marcatura.

#### ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI E ANALISI QUANTITATIVA

Per le osservazioni è stato utilizzato un microscopio *Olympus IX 61* dotato di obiettivi 2.5, 4, 10, 20 e 60x a immersione in olio.

Per l'acquisizione delle immagini è stata utilizzata una fotocamera *Olympus 12-bit cooled F View II* (Hamburg, Germany) e la luce di eccitazione è stata filtrata con un filtro al 6% di trasmittanza.

Per ciascun animale l'analisi dell'immunoreattività per GFAP, nNOS e IBA1 è stata effettuata su una sezione ogni 3 successive, per un totale di 8 sezioni contenenti tutta l'estensione dell'area della corteccia cingolata 1 e 3 (Cg1 e Cg3), e del Caudato Putamen (CPu). In accordo con l'atlante di Paxinos e Watson [Paxinos G and Watson C, 1997], i livelli coronali selezionati per le aree interessate corrispondono alle *plates* 6-8 per la Cg1 e Cg3 (AP: da +4.20 a +3.20) e alle *plates* 11-29 per il CPu (AP: da +1.70 a -0.3).

Per l'analisi semi-quantitativa del marcatore per la GFAP, è stato utilizzato un obiettivo 20x e sono state acquisite 3 immagini della regione di interesse (*regions of interest*, ROI) non sovrapposte fra loro e di area pari a 140000  $\mu\text{m}^2$ , per ciascuna

sezione. Per quanto riguarda l'acquisizione, la profondità di fuoco è stata ottenuta utilizzando il modulo z-stack (*Olympus Soft Imaging Solution*, GNHB, Munster, Germany) e sommando le intensità massime di 8 immagini acquisite a step di fuoco da 0.25  $\mu\text{m}$  di profondità ciascuno, per un totale di 2 mm di spessore. Dopo la cattura, le immagini sono state analizzate utilizzando il *software* Cell P AnalySIS che ha permesso di applicare la densità soglia al singolo canale in scala di grigi per individuare le fibre positive. Successivamente, è stata stimata per ciascuna immagine la percentuale di area occupata da fibre positive; e per ciascun animale è stata espressa la media delle immagini di tutte le sezioni analizzate  $\pm$  SEM.

L'acquisizione delle immagini delle cellule immunoreattive per nNOS è stata eseguita utilizzando un obiettivo 20x e catturando 3 immagini ROI non sovrapposte per emisfero con area pari a 0.15  $\text{mm}^2$  ciascuna. I limiti delle ROI sono stati definiti basandosi su dettagli strutturali del tessuto e al fine di assicurare la non sovrapposizione delle stesse ROI, la distanza tra le 6 immagini catturate per ogni sezione, è stata fissata come pari a circa il doppio del diametro medio di un neurone (20 $\mu\text{m}$ ). Le 6 immagini per sezione così ottenute, sono state analizzate col *software* Cell P AnalySIS che ha permesso di effettuare la conta. Le cellule nNOS positive che toccavano i bordi superiore o destro della ROI, sono state escluse dalla conta. I neuroni nNOS immunoreattivi (-IR) che sono stati contati in ciascuna immagine di

una sezione, sono stati sommati tra loro e infine le somme per ciascun animale sono state espresse come  $\text{media}/\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$ .

L'acquisizione delle immagini per la marcatura di IBA1 è stata effettuata, come per nNOS, utilizzando un obiettivo 20x e catturando 3 ROI non sovrapposte per emisfero, per un totale di 6 immagini per sezione. L'analisi delle cellule positive per IBA1 è stata effettuata utilizzando il *software* Cell P AnalySIS mediante la conta al tocco e le cellule IBA1-IR contate in ciascuna immagine di una sezione sono state sommate e infine le somme per ciascun animale sono state espresse come  $\text{media}/\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$ .

## 2.5 WESTERN BLOT

### PREPARAZIONE DEL TESSUTO

Tre giorni dopo l'ultima somministrazione di METH i ratti sono stati sacrificati per decapitazione, i cervelli sono stati rapidamente rimossi, le aree cerebrali di interesse (Corteccia e CPu) isolate e rapidamente congelate in azoto liquido, e infine conservate a -80°C fino all'utilizzo. Il giorno della preparazione, i tessuti sono stati scongelati in ghiaccio e in 5 volumi di tampone di lisi freddo (SDS al 2% e 1 pastiglia di inibitori delle proteasi (Complete Protease Inhibitor tablet; Roche, Mannheim, Germany)). I tessuti sono stati quindi omogenati grazie all'utilizzo di un *polytron*, per 15 secondi per due volte e incubati a +4°C sotto rotazione per 40'. Infine, gli omogenati sono stati centrifugati a 8000xg per 30 minuti e i surnatanti recuperati. La quantità di proteine è stata misurata con il metodo di *Bradford* utilizzando il kit *Bio-Rad DC protein assay* (Bio-Rad, Milano, Italia).

Infine i campioni sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino all'utilizzo.

### IMMUNOBLOTTING

Il giorno della corsa elettroforetica i campioni sono stati scongelati in ghiaccio, diluiti alla concentrazione finale di 4µg/µl con loading buffer *LDS sample buffer 4x* (Life

Technologies) e il 5% di  $\beta$ -mercaptoetanolo (Sigma-Aldrich, MO, USA) e denaturati a 95°C per 5'. Infine gli omogenati sono stati caricati (40 $\mu$ g per campione) e fatti correre in gel a gradiente (4–12% NuPAGE Bis–Tris mini gels 12 well 1 mm gels, Life Technologies, CA, USA) e successivamente trasferiti su membrane in *polyvinylidene difluoride* (PVDF) seguendo il protocollo della ditta (Amersham GE Healthcare, UK). Al termine, il corretto trasferimento è stato evidenziato con la colorazione in rosso *ponceau* della membrana, che è stata poi lavata in H<sub>2</sub>O distillata per numerose volte. Parallelamente ai campioni sono stati fatti correre 5 $\mu$ l di marker dei pesi specifici (BioRad, Milano, Italia) per identificare le bande specifiche.

A questo punto è stato effettuato il blocco della membrana per 1 ora a temperatura ambiente; la soluzione di blocco è stata ottimizzata a seconda dell'anticorpo primario utilizzato: per il marcatore della *tyrosine hydroxylase* (TH) e del *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) è stata utilizzata una soluzione di blocco costituita da Tris 20mM, NaCl 137mM, pH=7.4, e 0.1% Tween-20 (TBS-T) con il 5% di *non fat dry milk* (NFM); invece per il marcatore del *Cannabinoid receptor 2* (CB2) la membrana è stata bloccata in TBS-T con il 5% di BSA. Successivamente le membrane sono state incubate con gli anticorpi primari per una notte a +4°C in agitazione: Ab monoclonale di topo *anti-TH* (Millipore Temecula, CA, USA; diluito 1:1000 in TBS-T con NFM 5%), Ab policlonale di coniglio *anti-BDNF* (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA; diluito 1:500 in TBS-T con NFM 5%), Ab policlonale di

coniglio *anti-CB2* (offerto gentilmente dal professor Ken Mackie, Indiana University; diluito 1:1000 in TBS-T con BSA 5%).

Quindi, le membrane sono state lavate in TBS-T e messe in incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari: *Horse Radish Peroxidase (HRP) anti-mouse* (Vector, CA, USA; diluito 1:5000 in TBS-T) e *HRP anti-rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). Infine le membrane vengono lavate in TBS-T, incubate con la soluzione di rivelazione in chemiluminescenza, *ECL-Detection reagent* come descritto dalla ditta (Amersham GE Healthcare, UK) e infine acquisite e digitalizzate utilizzando il LAS-4000 (FujiFilm).

Tutte le membrane sono state inoltre, strippate a 60°C per 30 minuti in *stripping buffer* (2% SDS in Tris-HCl pH 7.4 0.05 M e lo 1 %  $\beta$ -mercaptoetanololo) e incubate con l'anticorpo monoclonale per il marcatore della proteina endogena costitutiva *house keeping protein*,  $\beta$ -Actina (1:20000 in TBS-T/5%BSA, AbCam, UK) per la normalizzazione del carico di proteine.

Successivamente è stata effettuata l'analisi densitometrica semi-quantitativa dei segnali acquisiti, utilizzando il *software* Multi Gauge -ver.2.0- (FujiFilm). I segnali delle bande specifiche sono stati normalizzati con le densità della corrispondente banda della proteina endogena  $\beta$ -Actina. Quindi, i dati normalizzati sono stati espressi come rapporto proteina/ $\beta$ -actina.

## 2.6 ANALISI STATISTICA

I dati densitometrici sono stati calcolati e espressi come media  $\pm$  SEM o come ratio proteina/ $\beta$ -actina.

I dati dei ratti trattati con METH e SAL sono stati comparati utilizzando un *two-tailed unpaired Student's t-test*; mentre i dati dei ratti trattati con METH-THC e METH-VEH sono stati analizzati mediante un'analisi delle varianze (ANOVA) a 2 vie utilizzando come fattori il trattamento ( $\Delta$ 9-THC e VEH) e il tempo del trattamento (PRE e POST), seguita da ANOVA di livello inferiore, quando è stato ritenuto appropriato. Inoltre, l'analisi dei ratti post-trattati con  $\Delta$ 9-THC e pre-trattati con SR, è stata effettuata con un'ANOVA a 2 vie con il trattamento ( $\Delta$ 9-THC e VEH) e il pre-trattamento (SR e VEH) come fattori. I dati riguardanti i marcatori per IBA-1 in IHC e per TH, BDNF e CB2 in WB, sono stati analizzati mediante un'ANOVA a 2 vie utilizzando come fattori, il trattamento (METH e SAL) e il post-trattamento ( $\Delta$ 9-THC e VEH), seguita da un *two-tailed unpaired Student's t-test* quando è stato ritenuto appropriato.

Inoltre è stata utilizzata una ANOVA a misure ripetute per le temperature e i pesi corporei.

I confronti tra i gruppi nei *post-hoc* sono stati eseguiti usando il test del Bonferroni.

### 3 RISULTATI

#### 3.1 EFFETTO DELLA METH E DEL $\Delta$ 9-THC SULLA TEMPERATURA CORPOREA, SUL PESO E SULLA MORTALITA'

L'alterazione della temperatura corporea dei ratti, indotta dalla METH è stata analizzata mediante una ANOVA a 2 vie a misure ripetute e l'effetto del  $\Delta$ 9-THC è stato analizzato separando il pre-trattamento dal post-trattamento.

Le iniezioni ripetute di METH inducono un'ipertermia tempo-dipendente [treatment:  $F_{(1,35)}=82.3$ ,  $p<0.0001$ ; time:  $F_{(4,140)}=43.8$ ,  $p<0.0001$ ; treatment x time:  $F_{(4,140)}=32.6$ ,  $p<0.0001$ ]. Non sono state riscontrate differenze nelle temperature basali dei ratti trattati con SAL e con METH (SAL:  $37.57 \pm 0.10$ ; METH:  $37.26 \pm 0.13$ ). Come indicato in figura 8, il trattamento con METH induce un aumento della temperatura immediatamente dopo la prima iniezione e il massimo effetto ipertermico si ottiene dopo la terza e quarta somministrazione. Il *post hoc* del Bonferroni ha mostrato che i ratti trattati con METH presentano temperature significativamente più elevate dei ratti trattati con SAL a tutti i tempi, T0, T1, T2, T3 e T4.

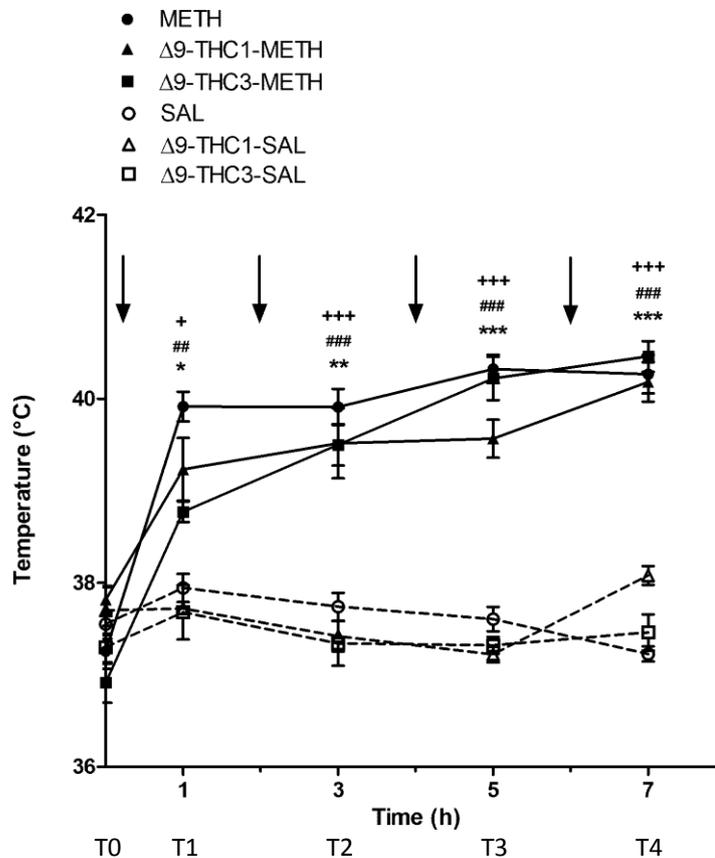
Per quanto riguarda il pre-trattamento è stata eseguita una ANOVA a 2 vie con il trattamento (METH) e il pre-trattamento ( $\Delta$ 9-THC1 e  $\Delta$ 9-THC3) come fattori e il tempo come fattore a misure ripetute (T0, T1, T2, T3, T4). Non sono state

osservate differenze tra le temperature basali dei ratti dei diversi gruppi sperimentali (METH:37.46 ± 0.13; SAL:37.55 ± 0.10; Δ9-THC1+METH:37.82 ± 0.13; Δ9-THC1+SAL:37.7 ± 0.27; Δ9-THC3+METH:36.92 ± 0.22; Δ9-THC3+SAL:37.3 ± 0.23). L'analisi a 2 vie ha rivelato un effetto principale del trattamento [ $F_{(1,36)}=195.0$ ,  $p<0.0001$ ]; del tempo [ $F_{(4,144)}=48.8$ ,  $p<0.0001$ ]; un'interazione tra tempo e trattamento [time x treatment:  $F_{(4,144)}=51.1$ ,  $p<0.0001$ ] e infine un'interazione tra tempo e pre-trattamento [time x pre-treatment:  $F_{(8,144)}=3.3$ ,  $p=0.001564$ ]. Il *post-hoc* col test del Bonferroni ha mostrato che i ratti trattati con METH presentano temperature rettali significativamente più elevate se comparate alle temperature rettali dei ratti trattati con SAL (1h:  $p<0.05$ ; 3h:  $p<0.01$ ; 5 e 7h :  $p<0.0001$ ) (Fig.8).

L'effetto del Δ9-THC sulle temperature corporee dei ratti trattati con METH o SAL è stato analizzato separatamente per le dosi di 1 e 3 mg/Kg, mediante una ANOVA a 2 vie a misure ripetute con il trattamento (METH), il pre-trattamento (Δ9-THC1 o Δ9-THC3) e il tempo (T0, T1, T2, T3, T4) come variabili. L'analisi a due vie ha rivelato che il trattamento con METH induce un'ipertermia tempo-dipendente sia nei ratti pre-trattati con Δ9-THC1 [treatment:  $F_{(1,36)}=60.7$ ,  $p<0.0001$ ; time:  $F_{(4,36)}=11.7$ ,  $p<0.0001$ ; treatment x time interaction:  $F_{(4,36)}=10.1$ ,  $p<0.0001$ ], che nei ratti pre-trattati con Δ9-THC3 [treatment:  $F_{(1,36)}=81.7$ ,  $p<0.0001$ ; time:  $F_{(4,36)}=33.2$ ,  $p<0.0001$ ; treatment x time interaction:  $F_{(4,36)}=31.8$ ,  $p<0.0001$ ]. Come mostrato in figura 8, i ratti che hanno ricevuto il trattamento con Δ9-THC1-METH e con Δ9-THC3-METH presentano

temperature rettali più elevate rispetto ai ratti trattati con  $\Delta$ 9-THC1-SAL e  $\Delta$ 9-THC3-SAL. Inoltre, non è stata evidenziata alcuna differenza tra i gruppi trattati con METH e pretrattati con SAL e quelli pretrattati con  $\Delta$ 9-THC1 o  $\Delta$ 9-THC3. Pertanto, il pretrattamento con entrambe le dosi di  $\Delta$ 9-THC (1 e 3 mg/Kg) non riduce l'ipertermia indotta dal trattamento con METH.

Fig. 8



**Figura 8. Temperatura corporea: effetto del trattamento con METH e del pre-trattamento con Δ9-THC1 e Δ9-THC3**

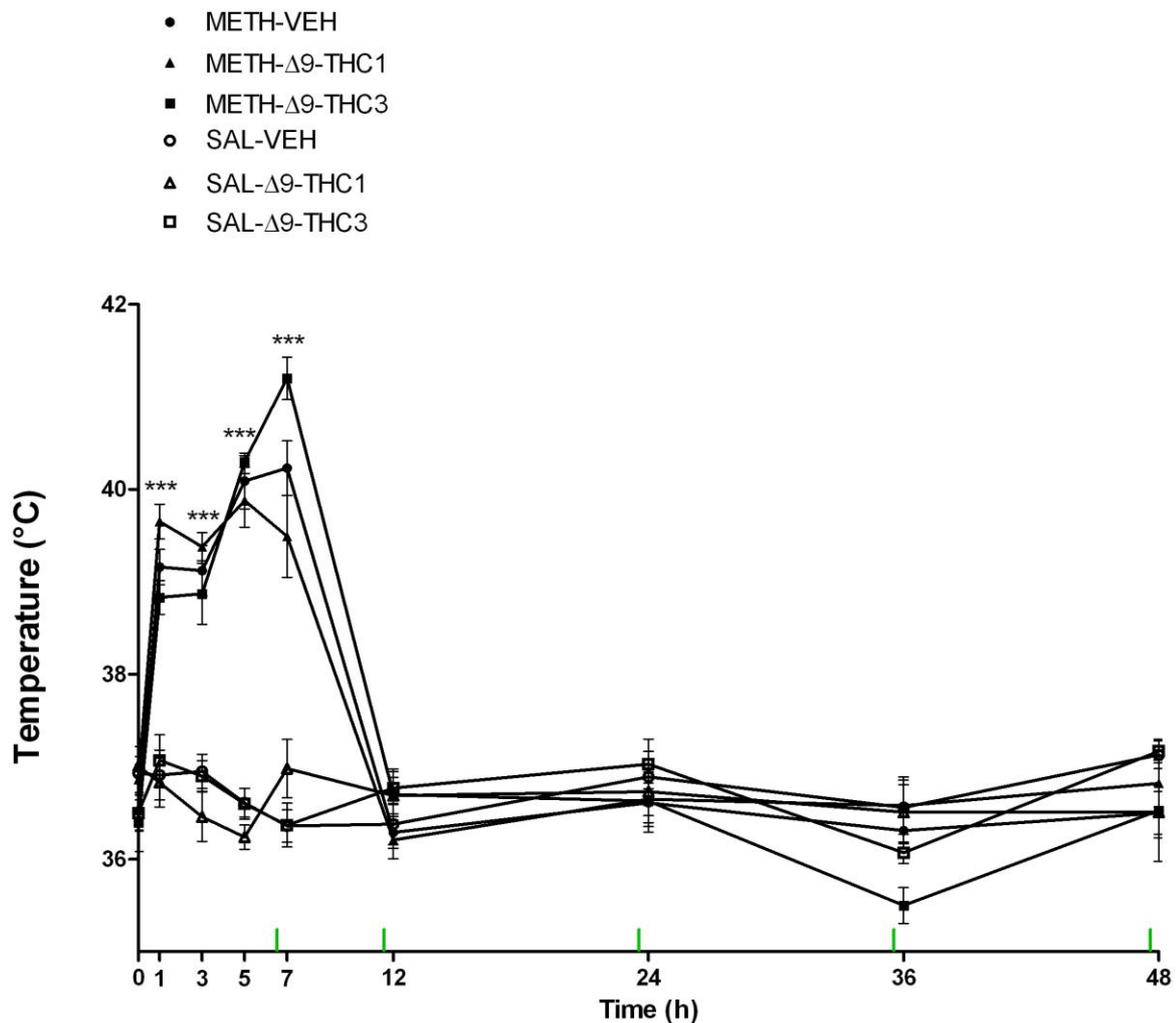
I ratti sono stati trattati con METH (4 x 10mg/Kg) o SAL e pre-trattati con Δ9-THC (1 o 3 mg/Kg) o con VEH. Le temperature rettali sono state misurate subito prima dell'inizio del trattamento (T0, temperature basali) e 1h dopo ciascuna somministrazione di METH o SAL (T1, T2, T3, T4). I valori sono stati espressi come media ± SEM.

METH: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs il tempo corrispondente del gruppo di controllo (SAL). Δ9-THC1-METH: ##p<0.01, ###p<0.001 vs il tempo corrispondente del proprio gruppo di controllo (Δ9-THC1-SAL). Δ9-THC3-METH: +p<0.05, +++p<0.001 vs il tempo corrispondente del proprio gruppo di controllo (Δ9-THC3-SAL).

Le frecce indicano ciascuna somministrazione di METH o SAL.

Il post-trattamento è stato analizzato con una ANOVA a 2 vie con il trattamento (METH) e il post-trattamento ( $\Delta 9$ -THC1 e  $\Delta 9$ -THC3) come fattori, e il tempo come fattore a misure ripetute (T0, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8). Anche in questo caso, non sono state osservate differenze tra le temperature basali dei ratti dei diversi gruppi sperimentali (METH:  $36.52 \pm 0.20$ ; SAL:  $36.93 \pm 0.29$ ; METH- $\Delta 9$ -THC1:  $36.86 \pm 0.17$ ; SAL- $\Delta 9$ -THC1:  $37.01 \pm 0.10$ ; METH- $\Delta 9$ -THC3:  $36.40 \pm 0.32$ ; SAL- $\Delta 9$ -THC3:  $36.50 \pm 0.19$ ). L'ANOVA a 2 vie ha mostrato un effetto principale del trattamento [ $F_{(1,49)}=166.6$ ,  $p<0.0001$ ]; del tempo [ $F_{(8,392)}=59.8$ ,  $p<0.0001$ ]; un'interazione tra tempo e trattamento [time x treatment:  $F_{(8,392)}=63.5$ ,  $p<0.0001$ ]; e un'interazione tra tempo, trattamento e post-trattamento [time x treatment x post-treatment:  $F_{(16,392)}=1.9$ ,  $p=0.016124$ ]. Il *post-hoc* col test del Bonferroni (Fig.9) ha mostrato un effetto ipertermico tempo dipendente indotto dal trattamento con la METH, nei tempi T1, T2, T3, T4; inoltre il test ha evidenziato che il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC a entrambe le dosi non influenza le temperatura corporea dei ratti.

**Fig.9**



**Figura 9. Temperatura corporea: effetto del trattamento con METH e del post-trattamento con Δ9-THC1 e Δ9-THC3**

I ratti sono stati trattati con 4 iniezioni di METH alla dose di 10 mg/Kg o con SAL e post-trattati con Δ9-THC1 o Δ9-THC3 o VEH. Le temperature rettali sono state misurate al tempo T0, prima di iniziare il trattamento (temperature basali), 1h dopo ciascuna somministrazione di METH (T1, T2, T3, T4), e 30 min dopo ciascuna iniezione di Δ9-THC (T5, T6, T7, T8). Tra le temperature basali dei ratti non sono state riscontrate differenze. I valori delle temperature sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. Il trattamento con METH aumenta in maniera significativa la temperatura corporea rispetto ai ratti trattati con SAL. Il post-trattamento con il Δ9-THC, a entrambe le dosi, non induce alcun effetto sulle temperature.

\*\*\* $p < 0.001$  vs il tempo corrispondente del gruppo di controllo.

Le linee verdi indicano ciascuna somministrazione di Δ9-THC1 o Δ9-THC3 o VEH.

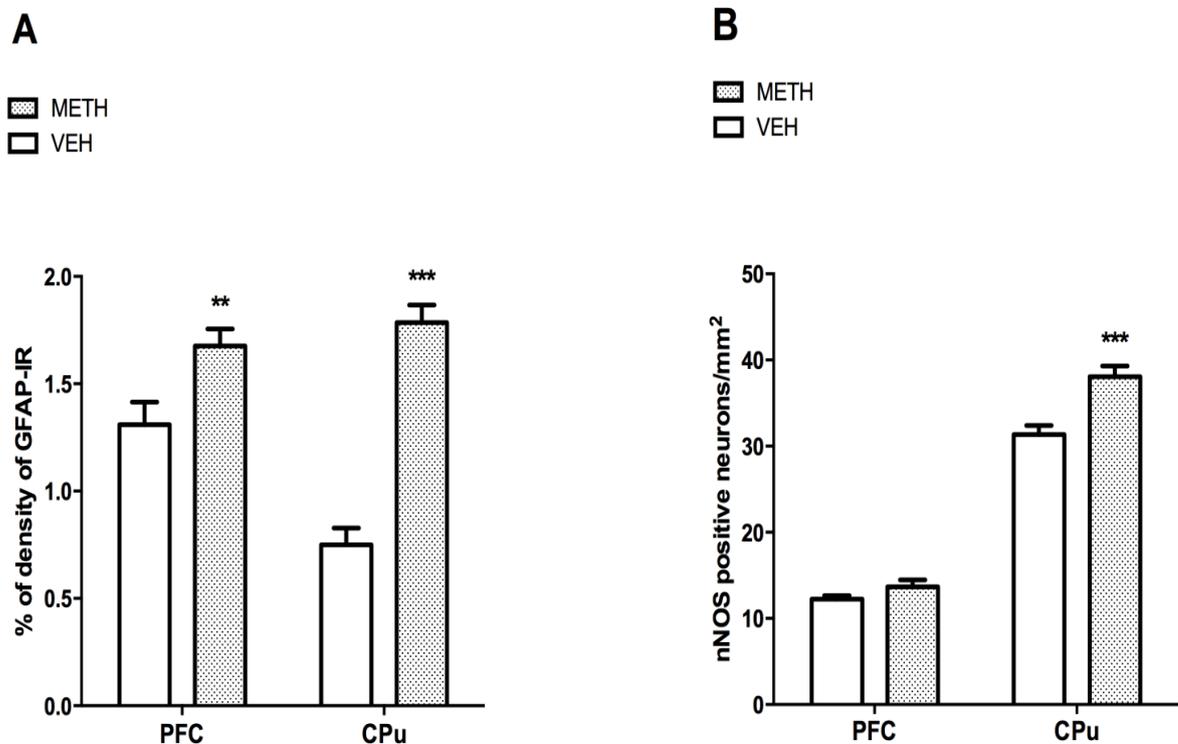
Per quanto riguarda i pesi corporei dei ratti, in accordo con i nostri dati precedenti [Bortolato M, et al 2010]. 24h dopo l'ultima somministrazione di METH i ratti hanno mostrato una diminuzione significativa ( $p < 0.0001$ ; -10%) del peso corporeo rispetto ai ratti trattati con SAL

Infine, il test di Fisher ha rivelato che la METH induce una mortalità di circa il 27%, percentuale in accordo con i dati presenti in letteratura [Krasnova IN and Cadet JL, et al. 2009].

### 3.2 EFFETTO DELLA METH SULLA IMMUNOREATTIVITA' DELLA GFAP E DEL nNOS

Gli effetti della neuroinfiammazione e dello stress ossidativo indotti dalla METH, sono stati misurati valutando l'IR della GFAP e del nNOS nelle aree di interesse, PFC e CPU. Il t-Test ha rivelato che, il regime neurotossico di METH induce un aumento dei livelli di IR della GFAP sia nella PFC ( $t_{(24)}=2.83$ ,  $p<0.01$ ; +27%; Fig.10 A) che nel CPu ( $t_{(20)}=9.06$ ,  $p<0.0001$ , +137%; Fig.10 A), così come un aumento del numero di neuroni nNOS positivi nel CPu ( $t_{(29)}=4.02$ ,  $p<0.001$ ; +21%, Fig.10 B). Non è stata evidenziata alcuna differenza nel numero di cellule nNOS-positive nella PFC.

Fig.10



**Figura 10. La METH aumenta i livelli di IR della GFAP e il numero di neuroni nNOS positivi**

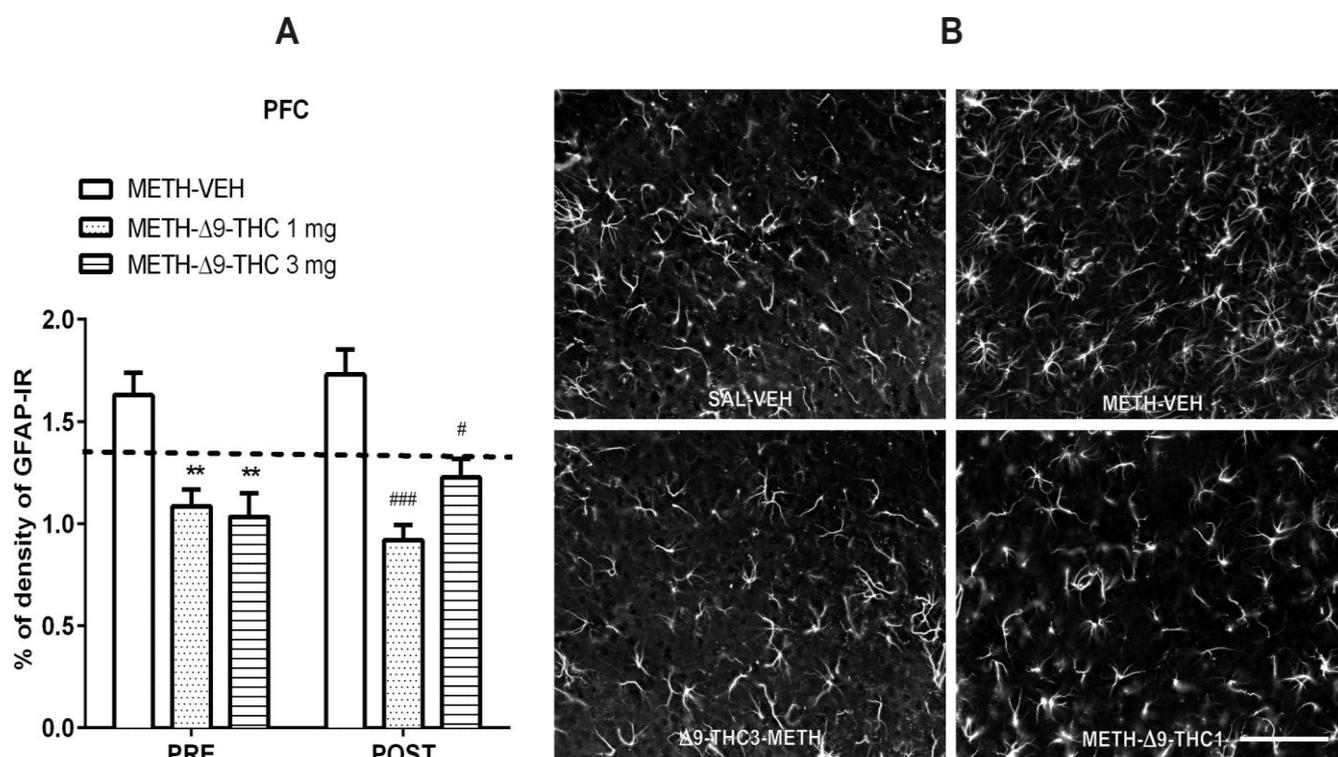
Sia in A che in B i ratti sono stati trattati con un regime neurotossico di METH (4 x 10mg/Kg) o con VEH. I valori delle percentuali di densità di GFAP-IR (**A**) e del numero di neuroni nNOS positivi per mm<sup>2</sup> (**B**) sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  vs il gruppo di controllo trattato con salina (*unpaired Student's t-test* a due code).

### 3.3 IL $\Delta$ 9-THC RIDUCE L'INCREMENTO DELL'ESPRESSIONE DELLA GFAP E DEL nNOS INDOTTO DALLA METH

L'effetto del  $\Delta$ 9-THC sulla neuroinfiammazione e sullo stress ossidativo indotti dalla METH, è stata analizzato tramite una ANOVA a 2 vie con il trattamento ( $\Delta$ 9-THC 1 e  $\Delta$ 9-THC3) e il tempo del trattamento (pre-trattamento, PRE e post-trattamento, POST) come fattori.

Per quanto riguarda l'effetto del  $\Delta$ 9-THC sull'attivazione astrogliale indotta da METH in PFC, l'analisi a due vie ha evidenziato un effetto principale del trattamento [ $F_{(2,32)}=25.49$ ,  $p<0.0001$ ] e il *post-hoc* Bonferroni ha rivelato che entrambe le dosi di  $\Delta$ 9-THC, 1 e 3 mg/Kg, diminuiscono in maniera significativa ( $p<0.001$ ) l'IR della GFAP paragonata ai rispettivi controlli. Non è stato evidenziato né un effetto del tempo [ $F_{(1,32)}=0.22$ ,  $p=0.638$ ], né un'interazione tra i fattori [treatment x time:  $F_{(2,32)}=1.42$ ,  $p=0.254$ ]. I dati del pre-trattamento e del post-trattamento sono stati analizzati separatamente mediante un'analisi delle varianze a 1 via. L'ANOVA ha evidenziato una diminuzione dell'IR della GFAP sia nel pre-trattamento che nel post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC a entrambe le dosi, rispetto ai controlli trattati solo con METH (PRE:-34% e -37%, per 1 e 3 mg/kg, rispettivamente;  $p<0.01$ ; POST:-47% e -29%;  $p<0.001$  and  $p<0.05$ , rispettivamente) (Fig.11).

Fig.11

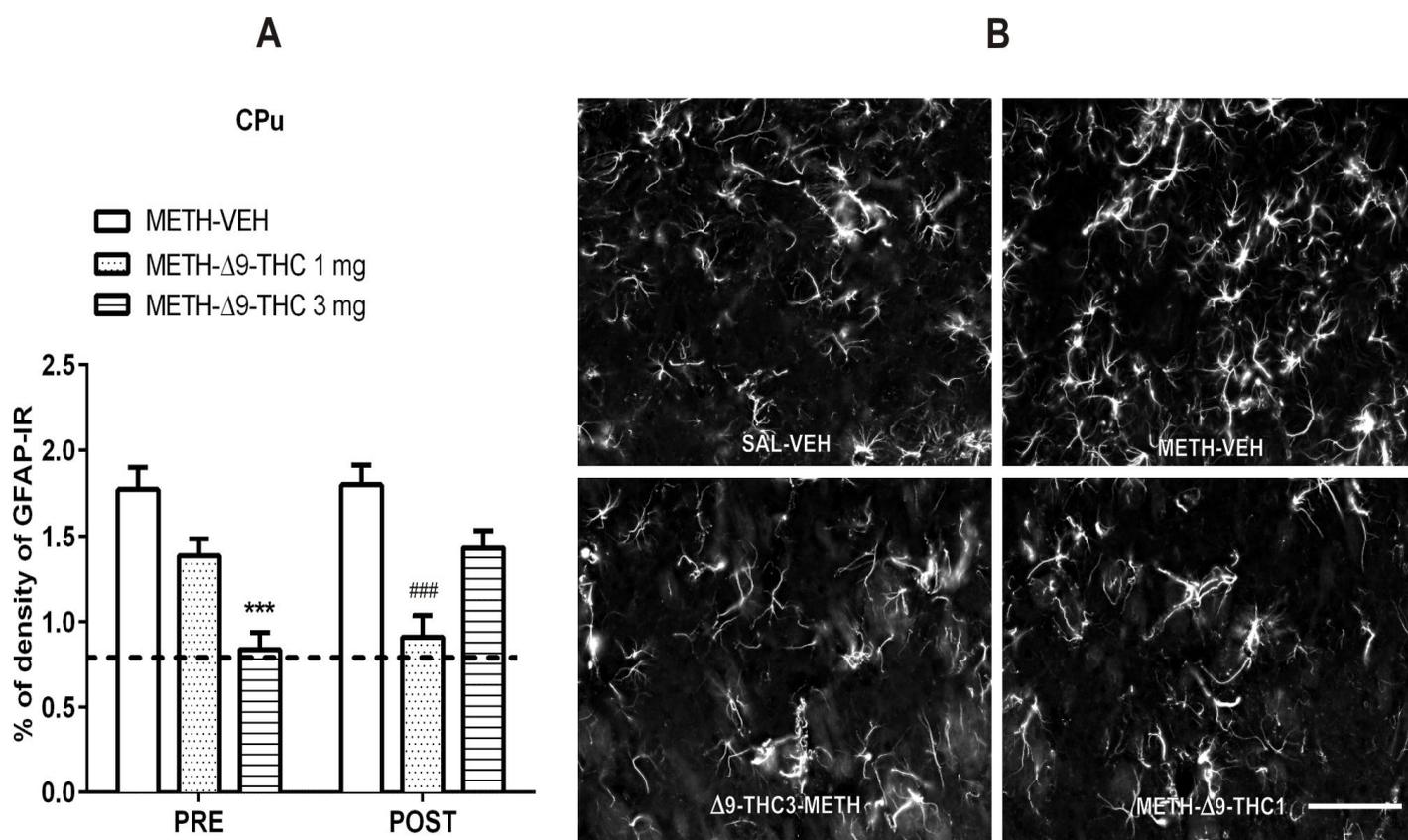


**Figura 11. Il Δ9-THC riduce l'astrogliosi indotta dalla METH nella PFC**

**A.** I ratti sono stati trattati con METH (4 x 10mg/Kg) e pre-trattati (PRE) o post-trattati (POST) con il Δ9-THC alle dosi di 1 o 3 mg/Kg. La somministrazione di Δ9-THC a entrambe le dosi, sia come pre-trattamento che come post-trattamento, riduce la neuroinfiammazione astrocitaria indotta dalla METH. PRE: -34% e -37%; POST: -47% e -29%, per Δ9-THC1 e Δ9-THC3 rispettivamente verso i gruppi di controllo. \*\* $p < 0.01$  vs PRE METH-VEH; # $p < 0.05$  e ### $p < 0.001$  vs POST METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). La linea orizzontale tratteggiata indica la percentuale della densità di fibre GFAP-IR del gruppo di controllo trattato con SAL-VEH. **B.** Immagini rappresentative della IR in immunofluorescenza della GFAP nella PFC, dei gruppi SAL-VEH, METH-VEH, METH-Δ9-THC3 e METH-Δ9-THC1. La barra indica un'unità pari a 100 $\mu$ m.

Nello striato l'ANOVA a 2 vie ha evidenziato un effetto significativo del trattamento [ $F_{(2,32)}=16.28$ ,  $p<0.0001$ ] e un'interazione tra trattamento e tempo di trattamento [treatment x time:  $F_{(2,32)}=8.12$ ,  $p<0.01$ ]. Al fine di comparare ciascun gruppo all'altro è stato effettuato il *post-hoc* col test del Bonferroni, che ha evidenziato che l'IR della GFAP è diminuita in maniera significativa nei ratti pre-trattati con  $\Delta 9$ -THC3 (-53%,  $p<0.001$ ) e nei ratti post-trattati con  $\Delta 9$ -THC1 (-50%,  $p<0.001$ ) se confrontati con i loro rispettivi gruppi di controllo (rispettivamente VEH-METH e METH-VEH; Fig.12).

Fig.12

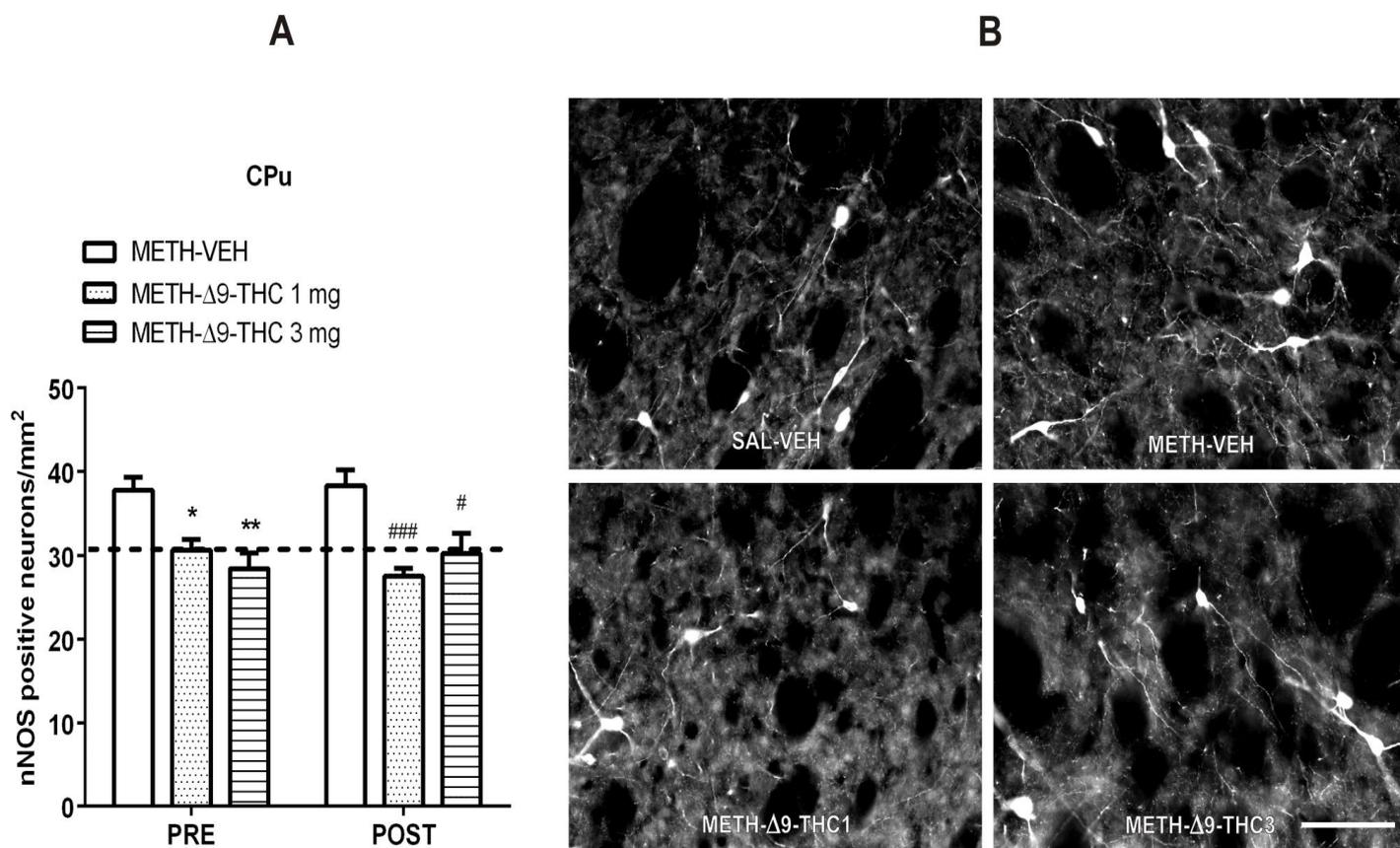


**Figura 12. Il  $\Delta 9$ -THC riduce l'astrogliosi indotta dalla METH in CPu**

**A.** I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig. 11. Il pre-trattamento con  $\Delta 9$ -THC3 e il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC1 riducono significativamente l'astrogliosi indotta dal trattamento con METH (-53% e -50%, rispettivamente). \*\*\* $p < 0.001$  vs PRE METH-VEH; ### $p < 0.001$  vs POST METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). La linea orizzontale tratteggiata indica la percentuale della densità di fibre GFAP-IR del gruppo di controllo trattato con SAL-VEH. **B.** Immagini rappresentative della IR in immunofluorescenza della GFAP in CPu, nei gruppi SAL-VEH, METH-VEH, METH- $\Delta 9$ -THC3- e METH- $\Delta 9$ -THC1. La barra indica un'unità pari a 100 $\mu$ m.

Infine, per quanto concerne lo stress ossidativo indotto dalla METH nello striato, l'ANOVA a 2 vie ha mostrato un effetto principale del trattamento [ $F_{(2,37)}=20.53$ ,  $p<0.0001$ ] e il successivo *post-hoc* col Bonferroni ha evidenziato che il  $\Delta 9$ -THC a entrambe le dosi ( $\Delta 9$ -THC 1 e 3 mg/Kg) induce una diminuzione significativa ( $p<0.001$ ) dell'espressione del nNOS rispetto ai controlli. Non è stato osservato alcun effetto del tempo [ $F_{(1,37)}=0.031$ ,  $p=0.86$ ], né interazione tra trattamento e tempo [treatment x time:  $F_{(2,37)}=1.032$ ,  $p=0.366$ ]. Successivamente, per poter valutare meglio l'effetto del  $\Delta 9$ -THC, i dati del tempo del trattamento (pre-trattamento e post-trattamento) sono stati analizzati separatamente mediante una ANOVA a 1 via, seguita dal *post-hoc* col test Bonferroni. Come è mostrato in figura 13, sia il pre-trattamento che il post-trattamento con entrambe le dosi di  $\Delta 9$ -THC (1 e 3 mg/Kg) inducono una diminuzione del nNOS neuronale nello striato. In particolare, il pre-trattamento con la dose inferiore di  $\Delta 9$ -THC induce una riduzione del 19% ( $p<0.05$ ) del numero di neuroni positivi per nNOS, mentre il  $\Delta 9$ -THC3 induce una diminuzione del 25% ( $p<0.01$ ). Infine, il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC alla dose di 1 mg/Kg diminuisce il numero dei neuroni nNOS-positivi del 28% ( $p<0.001$ ), mentre la dose più elevata di  $\Delta 9$ -THC induce una riduzione del 21% ( $p<0.05$ ).

Fig.13



**Figura 13. Il  $\Delta 9$ -THC riduce l'aumentata espressione dei neuroni nNOS positivi indotta dalla METH**

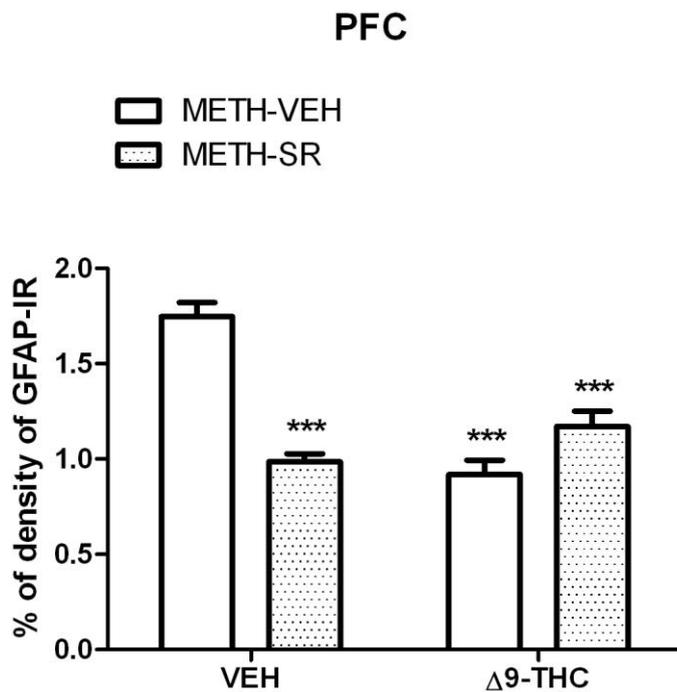
**A.** I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.11. Sia il pre-trattamento che il post-trattamento con entrambe le dosi di  $\Delta 9$ -THC in CPU diminuisce il numero di neuroni nNOS positivi. PRE: -19% e -25%; POST: -28% e -21%, rispettivamente per  $\Delta 9$ -THC1 e  $\Delta 9$ -THC3. \* $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$  vs PRE METH-VEH; # $p < 0.05$  e ### $p < 0.001$  vs POST METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). La linea tratteggiata rappresenta i valori dei neuroni nNOS positivi nel gruppo SAL-VEH ( $31 \pm 1.03$ ). **B.** Immagini rappresentative del IR del nNOS in immunofluorescenza in CPU, nei gruppi SAL-VEH, METH-VEH, METH- $\Delta 9$ -THC1 e METH- $\Delta 9$ -THC3. La barra indica un'unità pari a  $100\mu\text{m}$ .

### 3.4 EFFETTO DEL SR SULL'IR DELLA GFAP E SULL'ESPRESSIONE DEL nNOS

Per valutare il possibile coinvolgimento del recettore CB1 nella neuroprotezione indotta dal  $\Delta 9$ -THC, è stato testato l'effetto dell'antagonista (SR) del recettore CB1 sul post-trattamento con la dose inferiore di  $\Delta 9$ -THC. SR *di per se* non modifica nè i valori dell'IR della GFAP in PFC (SAL-VEH=1.30  $\pm$  0.10; SAL-SR=1.03  $\pm$  0.17) e in CPu (SAL-VEH=0.75  $\pm$  0.08; SAL-SR=0.66  $\pm$  0.04), nè l'espressione del nNOS nello striato (SAL-VEH=31.36  $\pm$  1.04; SAL-SR=27.00  $\pm$  1.40).

L'effetto del SR sull'IR della GFAP nella PFC dei ratti trattati con METH e post-trattati con il  $\Delta 9$ -THC (o il VEH), è stato valutato con una ANOVA a 2 vie con il trattamento ( $\Delta 9$ -THC) e il pre-trattamento (SR) come fattori. L'analisi delle varianze ha evidenziato un effetto principale del trattamento [ $F_{(1,35)}=12.02$ ,  $p=0.0014$ ] e del pre-trattamento [ $F_{(1,35)}=7.09$ ,  $p=0.011$ ], così come un'interazione tra il trattamento e il pre-trattamento [ $\Delta 9$ -THC x SR:  $F_{(1,35)}=32.88$ ,  $p<0.0001$ ]. Il successivo *post-hoc* con il Bonferroni ha rivelato che, nei ratti trattati con  $\Delta 9$ -THC, l'IR della GFAP diminuisce significativamente ( $p<0.001$ ) rispetto ai ratti di controllo trattati solo con METH. Inaspettatamente, l'analisi ha mostrato che anche il pre-trattamento con l'SR, da solo o in combinazione con il  $\Delta 9$ -THC, riduce in maniera significativa ( $p<0.001$ ) l'IR della GFAP rispetto al gruppo di controllo (Fig.14).

Fig.14

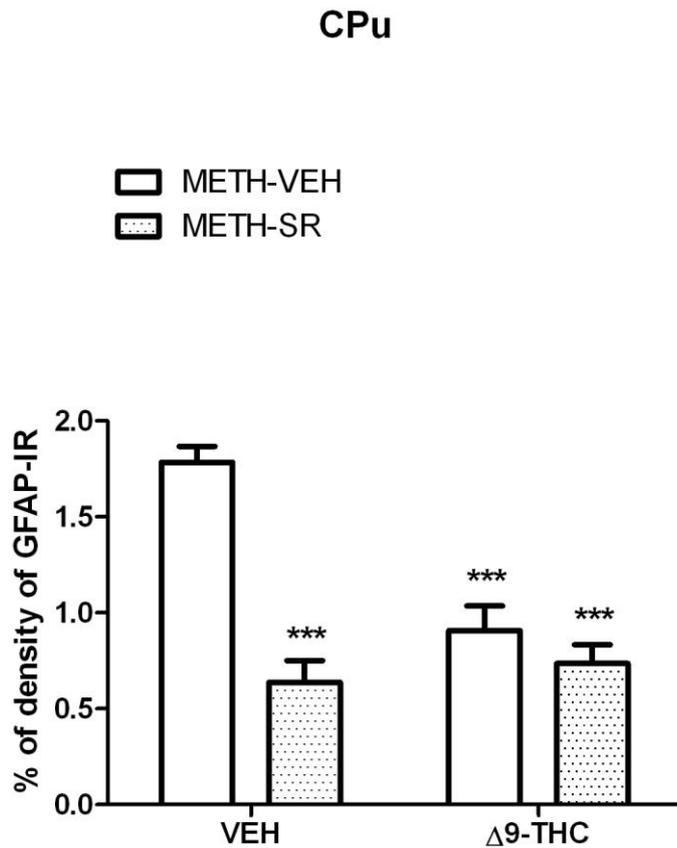


**Figura 14. Effetto del SR sull'IR della GFAP in PFC**

I ratti trattati con la METH sono stati post-trattati con  $\Delta 9$ -THC (1mg/Kg) e pre-trattati con l'antagonista del CB1, SR (1mg/Kg). Parallelamente, gruppi di controllo sono stati trattati con i veicoli rispettivi ai trattamenti. Gli animali trattati con  $\Delta 9$ -THC e pre-trattati con VEH, così come quelli trattati con SR, da solo o in combinazione con il  $\Delta 9$ -THC, mostrano una significativa diminuzione dell'espressione della GFAP-IR rispetto al controllo trattato con METH. \*\*\* $p < 0.001$  vs METH-VEH+VEH (*post-hoc* Bonferroni).

Per quanto riguarda l'IR della GFAP nello striato, come mostrato in figura 15, l'ANOVA a 2 vie ha evidenziato un effetto principale del trattamento ( $\Delta 9$ -THC) [ $F_{(1,35)}=12.70$ ,  $p=0.001$ ] e del pre-trattamento (SR) [ $F_{(1,35)}=36.49$ ,  $p<0.0001$ ], e un'interazione fra i due fattori [ $\Delta 9$ -THC x SR:  $F_{(1,35)}=19.86$ ,  $p<0.0001$ ]. Il *post-hoc* col Bonferroni infine, ha rivelato che entrambi i trattamenti,  $\Delta 9$ -THC e SR, somministrati da soli o in combinazione, diminuiscono significativamente ( $p<0.001$ ) la percentuale di fibre IR per la GFAP, rispetto al gruppo di controllo (METH-VEH+VEH).

Fig.15

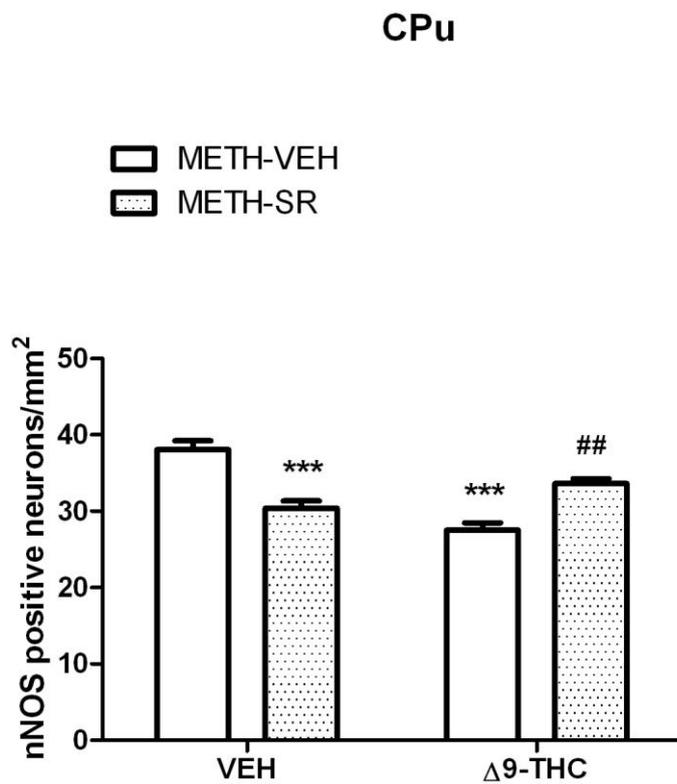


**Figura 15. Effetto del SR sull'IR della GFAP in CPu**

I ratti sono stati trattati come viene descritto nella legenda della Fig.14. I trattamenti con  $\Delta 9$ -THC e con SR, da soli o in combinazione tra loro, inducono una riduzione significativa della percentuale di densità di GFAP-IR rispetto al gruppo di controllo trattato solo con METH. \*\*\* $p < 0.001$  vs METH-VEH+VEH (*post-hoc* Bonferroni).

Infine, per quanto concerne l'espressione del nNOS, l'analisi delle varianze a 2 vie ha evidenziato un'interazione significativa tra i due fattori dell'analisi,  $\Delta 9$ -THC e SR [ $\Delta 9$ -THC x SR:  $F_{(1,40)}=32.45$ ,  $p<0.0001$ ]. L'analisi *post-hoc* con il test del Bonferroni ha rivelato che sia il trattamento con il  $\Delta 9$ -THC che il trattamento con l'SR da soli, inducono una diminuzione significativa ( $p<0.0001$ ) del numero dei neuroni positivi per l'nNOS rispetto al gruppo di controllo trattato solo con METH. Il gruppo di ratti trattato con METH-SR+ $\Delta 9$ -THC invece, mostra un aumento del numero di neuroni positivi per l'nNOS ( $p<0.01$ ; *post-hoc* col Bonferroni) rispetto al gruppo METH-VEH+THC (Fig.16).

Fig.16



**Figura 16. Effetto del SR sull'espressione dei neuroni nNOS positivi in CPu**

I ratti sono stati trattati come è descritto in Fig.14. La somministrazione del SR diminuisce parzialmente l'effetto del Δ9-THC sull'overespressione indotta da METH. SR *di per se* diminuisce i neuroni nNOS positivi rispetto al gruppo di controllo. \*\*\* $p < 0.001$  vs METH-VEH+VEH e ## $p < 0.05$  vs METH-VEH+Δ9-THC (*post-hoc* Bonferroni).

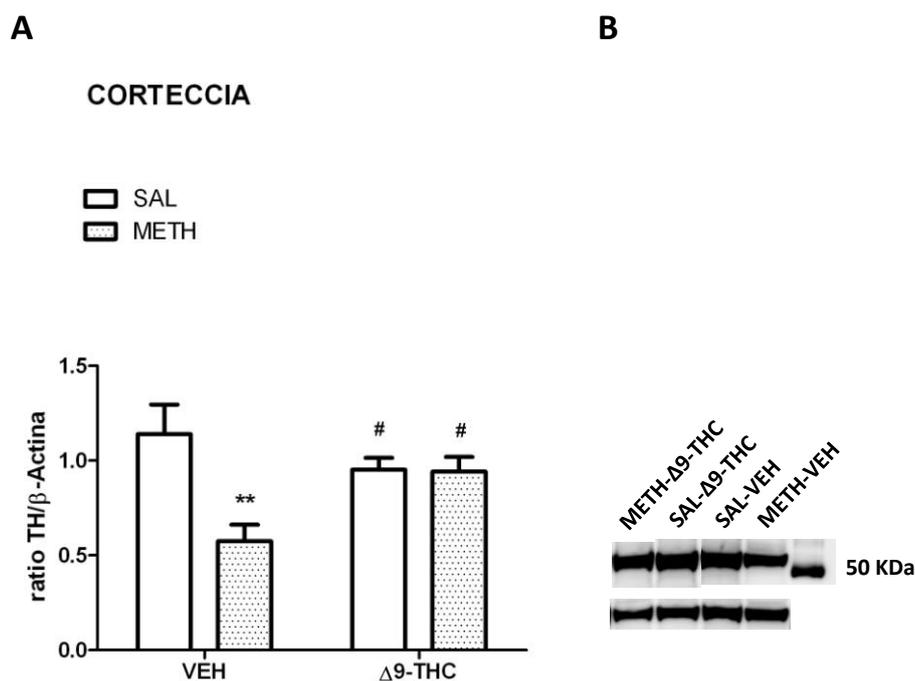
Questi risultati suggeriscono che il post-trattamento con il  $\Delta^9$ -THC alla dose di 1mg/Kg, è capace di diminuire l'*over*-espressione del nNOS e l'IR della GFAP indotte dalla METH, attraverso meccanismi rispettivamente mediati e non mediati dal recettore CB1.

### 3.5 EFFETTO DEL POST-TRATTAMENTO CON $\Delta$ 9-THC SULL'ESPRESSIONE DELLA TH INDOTTA DALLA METH

Allo scopo di valutare l'effetto neuroprotettivo del  $\Delta$ 9-THC è stata valutata l'espressione della proteina TH in alcune aree cerebrali, la corteccia e il CPu, tramite l'analisi delle varianze a 2 vie con il trattamento (METH) e il post-trattamento ( $\Delta$ 9-THC1) come fattori

Per quanto riguarda la corteccia, l'ANOVA a 2 vie ha evidenziato un effetto principale del trattamento [ $F_{(1,34)}=8.53$ ,  $p=0.0056$ ] e un'interazione tra i fattori [treatment x post-treatment:  $F_{(1,34)}=11.31$ ,  $p=0.007$ ]. Il *post hoc* Bonferroni ha rivelato che il trattamento con la METH induce una significativa diminuzione ( $p<0.01$ ) dell'espressione della proteina TH rispetto al gruppo di controllo trattato con SAL. Il post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC1 aumenta in maniera significativa l'espressione della TH rispetto agli animali trattati con METH ( $p<0.05$ ), ripristinando quasi i valori basali della TH (Fig.17).

Fig.17

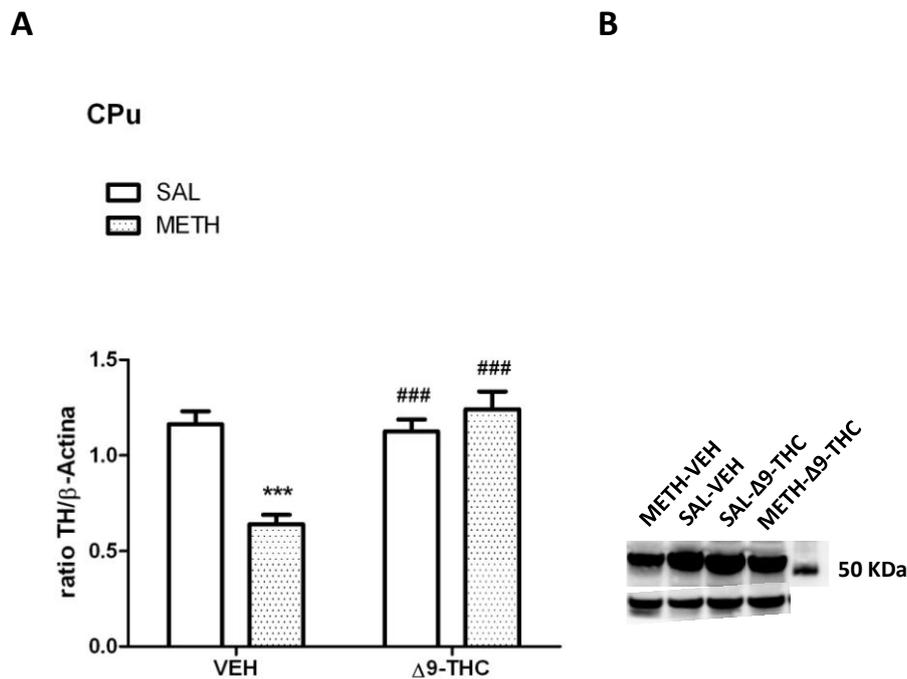


**Figura 17.  $\Delta$ 9-THC inibisce il decremento dell'espressione della TH indotta dalla METH nella corteccia**

**A.** I ratti sono stati trattati con METH (4 x 10mg/Kg) o con SAL e post-trattati con  $\Delta$ 9-THC (1mg/Kg) o con VEH. Il trattamento con METH diminuisce in maniera significativa (-50%) l'espressione della TH rispetto al controllo, mentre il post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC ripristina i livelli di espressione della proteina, aumentando la sua espressione (+33%) rispetto al trattamento con la METH. \*\* $p < 0.01$  vs SAL-VEH; # $p < 0.05$  vs METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). **B.** Immagini rappresentative dell'immunoblot effettuato per la TH in corteccia, nei gruppi sperimentali METH- $\Delta$ 9-THC, SAL- $\Delta$ 9-THC, SAL-VEH e METH-VEH. In basso la proteina endogena  $\beta$ -Actina con la quale è stata eseguita la normalizzazione dei valori di ciascun campione.

Per quanto concerne lo striato, l'analisi a 2 vie ha mostrato un effetto principale del trattamento [ $F_{(1,34)}=6.91$ ,  $p=0.013$ ] e del post-trattamento [ $F_{(1,34)}=13.4$ ,  $p=0.0008$ ], e un'interazione tra i fattori [treatment x post-treatment:  $F_{(1,34)}=17.15$ ,  $p=0.0002$ ]. Il *post-hoc* Bonferroni ha rivelato che i ratti trattati con la METH anche in CPu hanno una diminuzione significativa della TH ( $p<0.001$ ) rispetto ai controlli (SAL), e che il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC ripristina completamente l'espressione della proteina ( $p<0.001$  vs METH-VEH) (Fig.18).

Fig.18



**Figura 18. Δ9-THC inibisce il decremento dell'espressione della TH indotta dalla METH in CPu.**

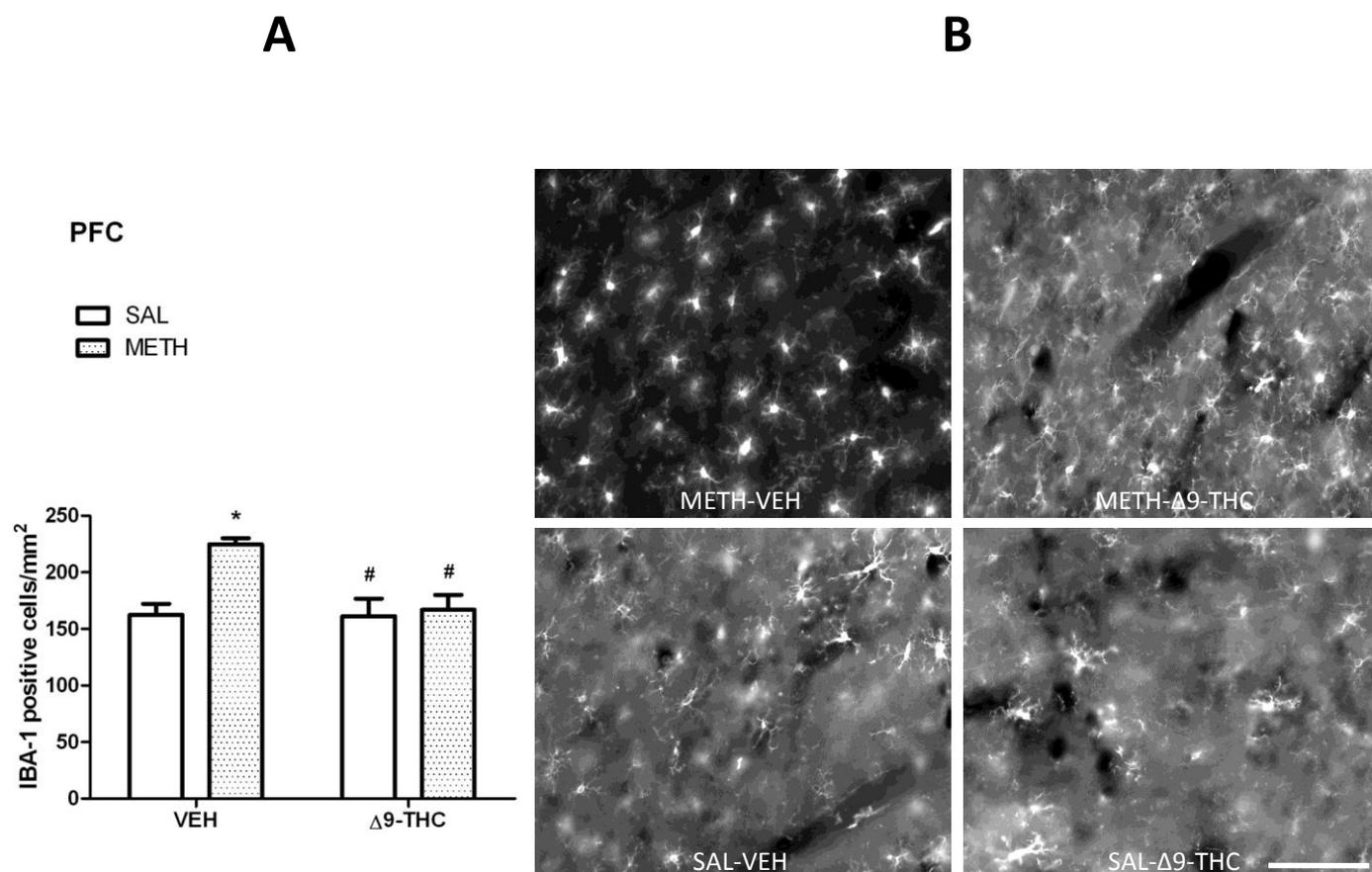
**A.** I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.17. L'espressione della TH nello striato è diminuita in maniera significativa (-45%) nei ratti trattati con METH rispetto a quelli trattati con il VEH. Il post-trattamento con Δ9-THC aumenta in maniera significativa (+42%) l'espressione della TH rispetto ai ratti trattati con METH. \*\*\* $p < 0.001$  vs SAL-VEH; #### $p < 0.001$  vs METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). **B.** Immagini rappresentative dell'immunoblot effettuato per la TH nello striato, nei gruppi sperimentali METH-VEH, SAL-VEH, SAL-Δ9-THC e METH-Δ9-THC. In basso la proteina endogena β-Actina con la quale è stata eseguita la normalizzazione dei valori di ciascun campione.

### 3.6 IL $\Delta$ 9-THC RIDUCE L'AUMENTATA ESPRESSIONE DI IBA-1 INDOTTA DALLA METH

L'espressione dell'IBA-1, indice di attivazione microgliale e di neuroinfiammazione, è stata valutata sia in PFC che in CPu tramite un'ANOVA a 2 vie con il trattamento (METH) e il post-trattamento ( $\Delta$ 9-THC) come fattori.

In PFC l'ANOVA ha rivelato un effetto principale del trattamento [ $F_{(1,13)}=7.45$ ,  $p=0.017$ ] e del post-trattamento [ $F_{(1,13)}=5.66$ ,  $p=0.033$ ], e un'interazione tra i fattori [trattamento x post-trattamento:  $F_{(1,13)}=5.16$ ,  $p=0.041$ ]. Il *post-hoc* Bonferroni ha evidenziato che il trattamento con la METH induce un aumento significativo ( $p<0.05$ ) dell'espressione dell'IBA-1 rispetto ai ratti trattati con SAL, mentre il post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC induce una diminuzione significativa ( $p<0.05$ ) del numero di cellule positive per IBA-1, rispetto ai ratti trattati con METH (Fig.19).

Fig.19



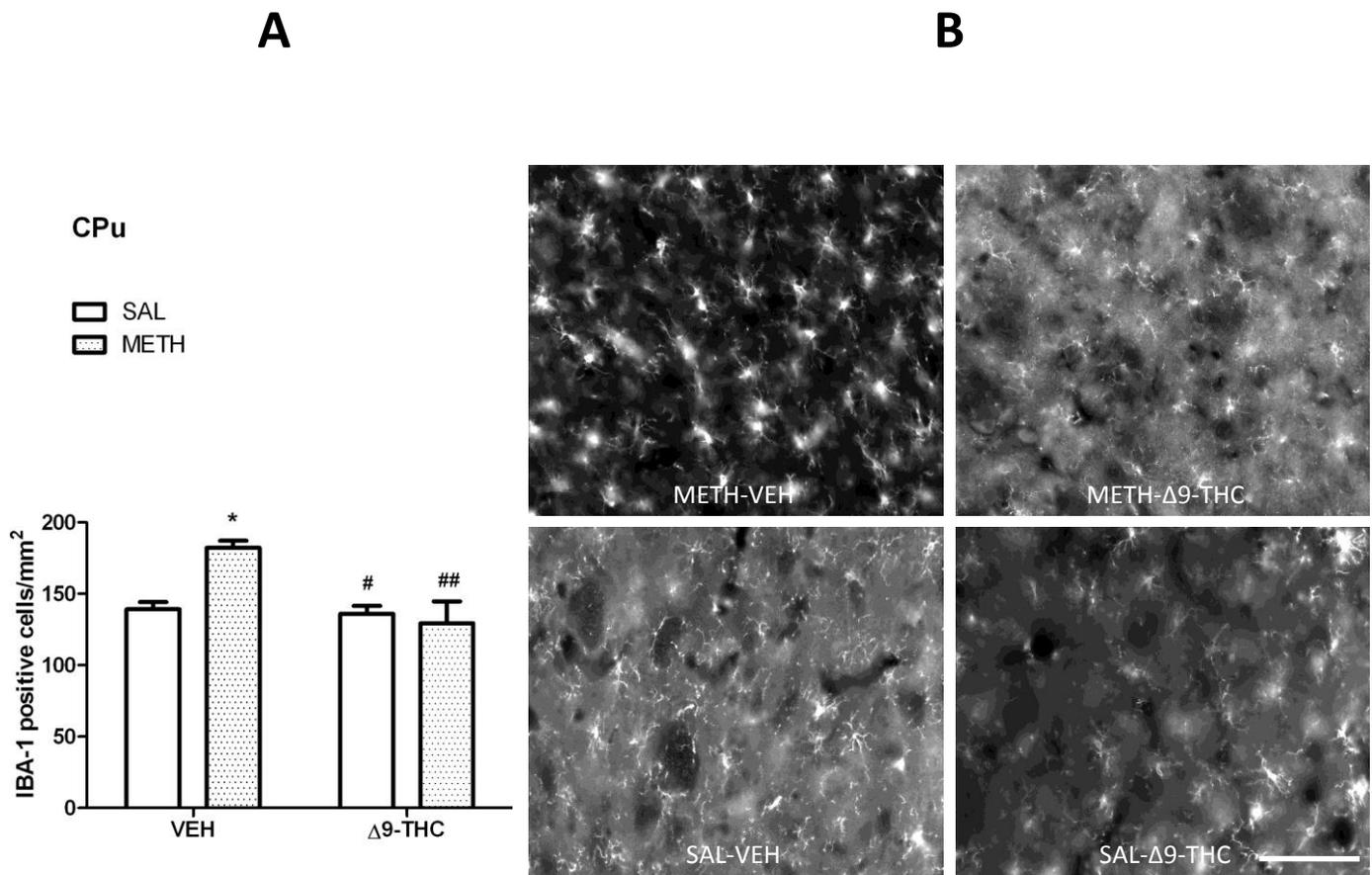
**Figura 19. Il  $\Delta 9$ -THC diminuisce l'aumentata espressione delle cellule microgliali IBA-1 positive indotta dalla METH in PFC**

**A.** I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.17. Il trattamento con METH induce un aumento dell'espressione dell'IBA-1 (+38%) rispetto al controllo (SAL-VEH). Il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC ripristina i valori basali di IBA-1-IR, diminuendo l'incremento dell'IBA-1-IR indotto dal trattamento con la METH. \* $p < 0.05$  vs SAL-VEH, # $p < 0.05$  vs METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). **B.** Immagini rappresentative della IR dell'IBA-1 in immunofluorescenza in PFC, nei gruppi METH-VEH, METH- $\Delta 9$ -THC, SAL-VEH e SAL- $\Delta 9$ -THC.

La barra micrometrica indica un'unità pari a 100 $\mu$ m.

In CPU, come è mostrato in figura 20, l'ANOVA a 2 vie ha evidenziato un effetto principale del post-trattamento [ $F_{(1,14)}=8.29$ ,  $p=0.012$ ] e un'interazione tra i fattori [trattamento x post-trattamento:  $F_{(1,14)}=6.48$ ,  $p=0.023$ ]. Il confronto fra i gruppi, effettuato con l'analisi *post-hoc* Bonferroni, ha evidenziato che il trattamento con la METH induce un aumento significativo ( $p<0.05$ ) del numero di cellule IBA-1 positive rispetto ai ratti trattati con SAL. Il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC diminuisce significativamente ( $p<0.01$ ) l'espressione delle cellule microgliali positive per IBA-1 indotta dalla METH, riportando i livelli di IBA-1 ai valori basali.

Fig.20



**Figura 20. Il  $\Delta 9$ -THC diminuisce l'aumentata espressione delle cellule microgliali IBA-1 positive indotta dalla METH in CPu**

**A.** I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.17. Il numero di cellule microgliali IBA-1-IR è aumentato significativamente dal trattamento con METH (+31%) rispetto al controllo (SAL-VEH). L'aumento di espressione di IBA-1 è inibito dal post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC che ripristina i valori basali dell'IBA-1R . \* $p < 0.05$  vs SAL-VEH; # $p < 0.05$  e ## $p < 0.01$  vs METH-VEH (*post-hoc* Bonferroni). **B.** Immagini rappresentative della IR dell'IBA-1 in immunofluorescenza in PFC, nei gruppi METH-VEH, METH- $\Delta 9$ -THC, SAL-VEH e SAL- $\Delta 9$ -THC. La barra indica un'unità pari a 100 $\mu$ m.

### 3.7 ESPRESSIONE DELLA NEUROTROFINA BDNF NEI RATTI TRATTATI CON METH E POST-TRATTATI CON $\Delta$ 9-THC

Allo scopo di valutare il coinvolgimento della neurotrofina BDNF nella neurotossicità indotta dalla METH e nella neuroprotezione indotta dal  $\Delta$ 9-THC, i livelli di questa proteina sono stati valutati tramite western blot nella corteccia cerebrale e nel CPu. I risultati sono stati analizzati mediante un'ANOVA a 2 vie con il trattamento (METH) e il post-trattamento ( $\Delta$ 9-THC) come fattori.

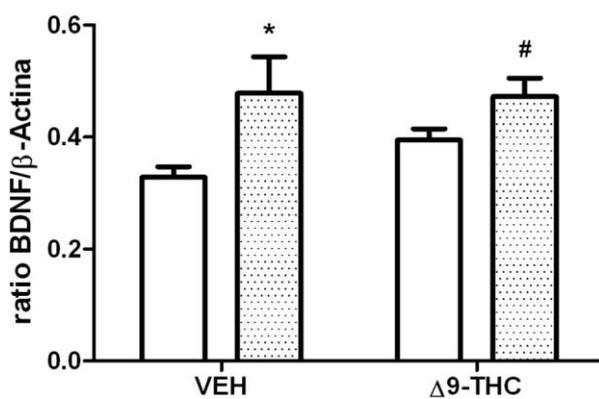
L'analisi a 2 vie ha mostrato sia in corteccia che in CPu un effetto principale del trattamento (METH) [ $F_{(1,29)}=4.82$ ,  $p=0.036$  e  $F_{(1,32)}=5.57$ ,  $p=0.024$ ; rispettivamente per la corteccia e per il CPu]. Dall'analisi non è emerso alcun effetto del post-trattamento né interazione tra i fattori. In entrambe le aree cerebrali, il trattamento con la METH aumenta l'espressione della proteina BDNF, mentre il post-trattamento con il  $\Delta$ 9-THC non è in grado di bloccare gli effetti indotti dalla METH (Fig.21).

Fig.21

A

CORTECCIA

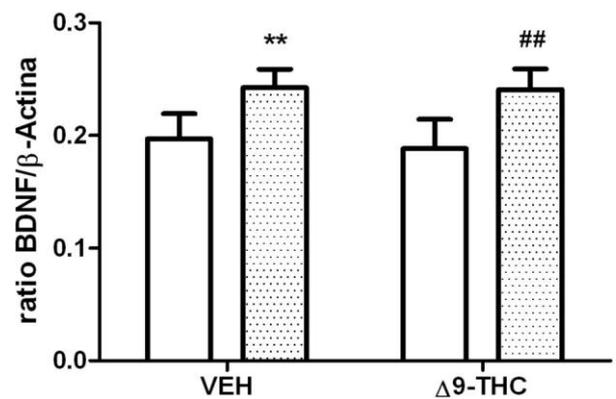
□ SAL  
▨ METH



B

CPu

□ SAL  
▨ METH



**Figura 21. Espressione della proteina neurotrofica BDNF nella corteccia e nel CPu di ratti trattati con METH e METH-Δ9-THC**

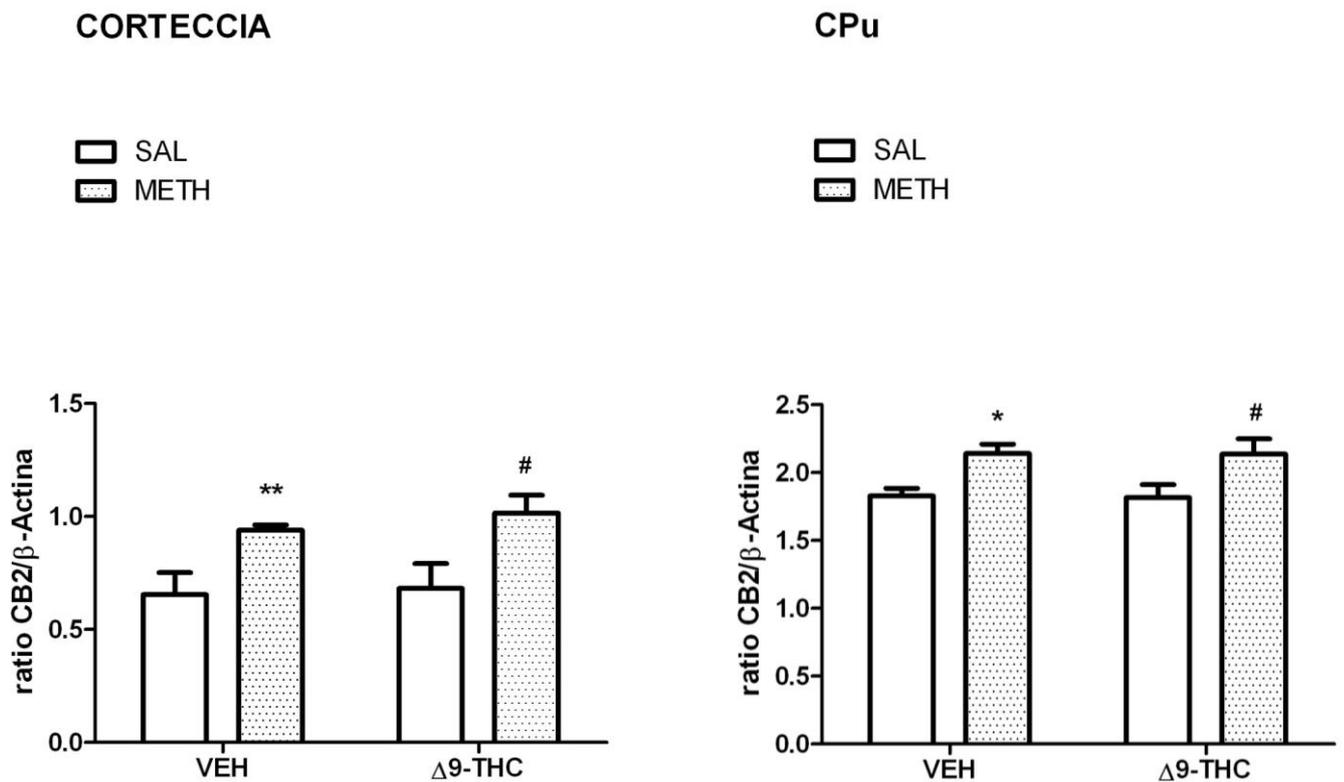
I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.17. In entrambe le aree cerebrali, corteccia e CPu, dei ratti trattati con METH-VEH e METH-Δ9-THC è presente un aumento significativo del BDNF rispetto ai ratti trattati con SAL-VEH e SAL-Δ9-THC. CORTECCIA: \* $p < 0.05$  vs SAL-VEH, # $p < 0.05$  vs SAL-THC; CPu: \*\* $p < 0.01$  vs SAL-VEH, ## $p < 0.01$  vs SAL-THC (unpaired Student's t-test).

### 3.8 ESPRESSIONE DEL RECETTORE CB2 NEI RATTI TRATTATI CON METH E POST-TRATTATI CON $\Delta$ 9-THC

L'espressione del recettore CB2 è stata analizzata tramite western blot, al fine di valutare un possibile coinvolgimento di questa proteina nella neurotossicità indotta da METH e nel meccanismo di protezione indotto dal  $\Delta$ 9-THC.

Come mostrato in figura 22, l'ANOVA a 2 vie ha evidenziato un effetto principale del trattamento sia in corteccia che in CPu [ $F_{(1,31)}=5.17$ ,  $p=0.029$ ;  $F_{(1,31)}=5.96$ ,  $p=0.020$ , rispettivamente]. L'ANOVA non ha dimostrato nessun effetto del post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC, né alcuna interazione trattamento (METH) e post-trattamento ( $\Delta$ 9-THC)

Fig.22



**Figura 22. Espressione del recettore CB2 nei ratti trattati con METH e METH- $\Delta$ 9-THC**

I ratti sono stati trattati come descritto nella legenda della Fig.17. In entrambe le aree cerebrali, corteccia e striato, dei ratti trattati con METH-VEH o METH- $\Delta$ 9-THC si vede un' aumentata espressione del recettore CB2 rispetto ai ratti controllo (SAL post-trattato con VEH o con  $\Delta$ 9-THC). CORTECCIA: \*\* $p < 0.01$  vs SAL-VEH , # $p < 0.05$  vs SAL-THC; CPU: \* $p < 0.05$  vs SAL-VEH , # $p < 0.05$  vs SAL-THC (*unpaired Student's t-test*).

#### 4 DISCUSSIONE

In questo studio di dottorato è stato dimostrato che il trattamento dei ratti con un *binge* di METH (4 x 10 mg/Kg) induce una forte ipertermia e aumenta sia il numero di neuroni positivi per nNOS (in CPU), *marker* del danno neuronale, che l'IR per la GFAP e per l'IBA1 (in PFC e in CPU), rispettivamente *markers* della neuroinfiammazione astrogliale e microgliale. Inoltre, questo trattamento induce una diminuzione dell'espressione della TH (nella corteccia e nello striato), *marker* di neurotossicità e neurodegenerazione. Questi dati sono in linea con quelli riportati in letteratura [Krasnova IN and Cadet JL, 2009; Thomas DM, et al. 2004; Perry VH, et al. 2007] e supportano il fatto che il *binge* di METH (4 x 10 mg/Kg) usato in questo studio sia un modello di neurotossicità e neurodegenerazione. Il *binge* di METH è il modello più frequentemente utilizzato nel ratto ed è generalmente associato alla neurotossicità, alla deplezione di DA e 5HT, all'ipertermia e ad una mortalità elevata [Davidson C, et al. 2001]. La validità di questo modello è supportata anche da un nostro precedente studio che ha dimostrato che un regime di METH (4 x 4 mg/Kg) è stato capace di indurre neurotossicità, valutata come riduzione delle terminazioni 5HTergiche e DAergiche in diverse aree cerebrali 3 e 7 giorni dopo l'ultima somministrazione di METH. [Bortolato M, et al. 2009].

Nel corrente studio, utilizzando questo modello di neurotossicità indotta dalla METH, sono stati messi in luce gli effetti neuroprotettivi del  $\Delta 9$ -THC, il principale costituente della cannabis sativa. In particolare, è stato dimostrato che il  $\Delta 9$ -THC, riduce l'espressione dei due *markers* di tossicità neuronale, nNOS e GFAP, che sono aumentati con il trattamento con la METH.

In particolare, l'*over*-espressione del nNOS, indotta dalla METH in CPU, viene attenuata sia dal pre-trattamento che dal post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC alla dose di 1 mg/Kg e 3 mg/Kg. L'ossido nitrico (NO) gioca un ruolo chiave nella neurotossicità indotta dalla METH; esso è sintetizzato dall'enzima neuronale nNOS, funziona come neuromodulatore e viene implicato in numerosi disturbi del SNC, fra cui la neurotossicità indotta dalla METH [Davidson C, et al. 2001]. L'aumento extracellulare di GLU indotto da una dose neurotossica di METH attiva i recettori NMDA causando un aumento intracellulare di  $Ca^{2+}$ , che a sua volta induce l'attivazione del nNOS mediante un meccanismo dipendente dalla via  $Ca^{2+}$ -calmodulina, con produzione finale di NO. Quest'ultimo è capace di reagire con gli ioni superossido formati dall'autossidazione della DA, dando origine alle specie reattive dell'azoto (RNS) [Marshall JF and O'Dell SJ, 2012].

Uno studio condotto su topi trattati con METH, ha dimostrato che il pretrattamento con un inibitore di questo enzima, il 7-NI, previene la neurotossicità

indotta dalla METH [Izthak SF and Ali J, 1996]; l'effetto neuroprotettivo di questo inibitore sembra coinvolgere anche un meccanismo di riduzione dell'ipertermia indotta dalla METH [Callahan BT and Ricaurte GA, 1998]. Infatti è stato dimostrato che il *binge* di METH nei topi nNOS-KO non induce neurotossicità DAergica, né ipertermia [Izthak Y, et al. 1998].

Numerosi studi descrivono le interazioni tra i cannabinoidi e l'enzima NOS suggerendo il coinvolgimento del recettore CB1 nella regolazione della sintesi del NO. Ad esempio, è stato dimostrato che il trattamento con  $\Delta$ 9-THC dei neuroni della retina, previene la neurotossicità mediata dal NO e dai perossinitriti e pertanto protegge questi neuroni dalla tossicità mediata dai recettori NMDA [El-Remessy AB, et al. 2003]. Inoltre, uno studio condotto sui neuroni cerebrocorticali di topo, ha dimostrato che la tossicità indotta dal NMDA viene ridotta sia *in vitro* che *in vivo* dal trattamento con un agonista del recettore CB1, il WIN, tramite un meccanismo che coinvolge l'attivazione del nNOS e della PKA. Lo stesso studio ha rivelato anche una maggiore attività dell'enzima nNOS nelle cellule della corteccia cerebrale dei topi CB1-KO rispetto a quella dei wild-type [Kim YS and Joh TH, 2006].

In questo progetto di dottorato, è stato inoltre dimostrato che in PFC e in CPU sia il pre- che il post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC riduce l'astrogliosi indotta dalla METH, suggerendo che l'effetto neuroprotettivo possa essere almeno parzialmente

mediato dalle proprietà anti-infiammatorie del  $\Delta 9$ -THC. In particolare mentre in PFC entrambe le dosi di  $\Delta 9$ -THC (1 e 3 mg/kg) riducono l'astrogliosi, in CPu il  $\Delta 9$ -THC riduce l'astrogliosi rispettivamente a 3mg/kg nel pre-trattamento e a 1mg/kg nel post-trattamento. La mancata dose-risposta negli effetti del  $\Delta 9$ -THC nel ridurre l'*over* espressione del nNOS in CPu e l'astrogliosi potrebbe suggerire che la massima protezione sia ottenuta con la dose più bassa (1 mg/kg), dovuto al cosiddetto effetto *ceiling*.

La neuroinfiammazione è un evento importante nella neurotossicità indotta dalla METH; infatti è stato dimostrato che l'attivazione astrocitaria viene indotta dal trattamento con un *binge* di METH, che aumenta i livelli di GFAP nello striato, nella corteccia e nell'ippocampo [Thomas DM, et al. 2004]. Farmaci antinfiammatori (come il ketoprofene, l'indometacina, la tetraciclina e la miociclina) proteggono dalla gliosi e dalla neurotossicità indotta dalla METH [Asanuma M, et al. 2003]. Goncalves e collaboratori nel 2010 hanno dimostrato che l'indometacina previene l'*up*-regolazione della GFAP indotta dalla METH nell'ippocampo di topo [Goncalves J, et al. 2010]. Inoltre è stato dimostrato che gli agonisti dei recettori cannabinoidi inibiscono la produzione di NO nella microglia, nei neuroni e nei macrofagi [Massi P, et al. 2008]. Infine, numerose evidenze, utilizzando diversi approcci sperimentali incluso le tecniche immunoistochimiche, hanno rivelato la presenza dei recettori

CB1 in colture cellulari di astrociti e in sezioni di cervello di ratto e topo [Stella N, 2004].

La neurotossicità indotta dalla METH, e il trattamento con il  $\Delta$ 9-THC sono generalmente associati rispettivamente a effetti ipertermici e ipotermici [Krasnova IN and Cadet JL, 2009]. Pertanto, in questo studio è stato testato l'effetto del trattamento col  $\Delta$ 9-THC a 1 e 3 mg/Kg sull'ipertermia indotta dalla METH. Contrariamente ad altri studi [Tourino C, et al. 2010] che hanno dimostrato che il  $\Delta$ 9-THC era in grado di ridurre l'ipertermia indotta dal MDMA, nel nostro studio sia il pre-trattamento che il post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC non previene l'effetto ipertermico della METH. Questi risultati suggeriscono che l'effetto neuroprotettivo del  $\Delta$ 9-THC è indipendente dalla temperatura e che probabilmente è mediato da altri meccanismi tra cui per esempio quelli CB1-recettore-mediati.

Allo scopo di evidenziare un possibile meccanismo CB1-mediato è stato effettuato un pre-trattamento con SR, l'antagonista dei recettori CB1, sui ratti post-trattati con  $\Delta$ 9-THC alla dose di 1 mg/Kg. La scelta di analizzare il coinvolgimento del recettore CB1 solo sul post-trattamento con  $\Delta$ 9-THC alla dose di 1 mg/Kg, è secondaria agli effetti di neuroprotezione osservati con questo schema di trattamento (i.e. GFAP e nNOS in CPu) e al possibile effetto *ceiling* (vedi paragrafo precedente).

E' stato dimostrato che SR attenua l'effetto neuroprotettivo del  $\Delta 9$ -THC sull'*over*-espressione del nNOS indotta dalla METH. Questo effetto potrebbe essere mediato dai recettori presinaptici CB1 presenti sulle terminazioni glutammatergiche o sugli astrociti, il cui blocco determina un aumento del rilascio di GLU e quindi eccitotossicità. SR invece non è in grado di bloccare la capacità della  $\Delta 9$ -THC di diminuire l'astrogliosi indotta dalla METH sia nello striato che nella corteccia prefrontale. Questi dati rivelano che il  $\Delta 9$ -THC potrebbe inibire l'astrogliosi indotta dalla METH non attraverso un meccanismo CB1-dipendente, ma tramite un meccanismo CB2-mediato. In accordo con tale ipotesi, recentemente Tourino e collaboratori (2010) hanno dimostrato che il  $\Delta 9$ -THC sopprimeva l'attivazione astrocitaria indotta da MDMA attraverso un meccanismo mediato dal recettore CB2 [Tourino C, et al. 2010].

Inaspettatamente, i dati relativi all'effetto del SR dimostrano che in CPu e in PFC *di per se* induce una diminuzione sia del nNOS che dell'astrogliosi attivati dalla METH; tale effetto non è stato mai descritto precedentemente. Numerosi studi hanno riportato che SR esercita un ruolo neuroprotettivo in modelli animali d'ischemia cerebrale e danno neuronale indotto da NMDA [Pellegrini-Giampietro DE, et al. 2009; Hansen HS, et al. 1998]. Nei modelli animali di occlusione dell'arteria cerebrale l'effetto neuroprotetico del SR era associato con: i) un aumento dei contenuti striatali di AEA; ii) un aumento dell'attività enzimatica della fosfolipasi D

che idrolizza la N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE); e iii) una ridotta espressione e attività della FAAH [Muthian S, et al. 2004; Amantea D, et al. 2007; Berger C, et al. 2004]. Inoltre Pegorini e collaboratori nel 2006 hanno suggerito un possibile ruolo del recettore vanilloide TRPV1 nell'effetto neuroprotettivo del SR, dimostrando che l'effetto neuroprotettivo del SR nel modello animale di ischemia cerebrale transitoria, è bloccato dall'antagonista dei TRPV1, la capsazepina [Pegorini S, et al. 2006]. Questi dati suggeriscono che SR può avere un effetto protettivo contro l'eccitotossicità, attraverso il blocco dei CB1 e prevenendo la loro attivazione mediata dalla produzione di AEA endogeno che si accumula durante il danno cerebrale [Marinelli S, et al. 2002]. Poiché l'AEA attiva sia i recettori CB1 che i TRPV1 [De Petrocellis L, et al. 2001], le aumentate concentrazioni di AEA attivano e desensitizzano i recettori vanilloidi [Pegorini S, et al. 2006], inducendo un effetto neuroprotettivo. Inoltre è stato dimostrato che, in seguito al danno neuronale, l'aumento intracellulare di  $Ca^{2+}$  induce la produzione di NAPE e N-aciletanolamina (NAE), inclusa l'AEA [Hansen HS, et al. 1998].

In alternativa, l'effetto protettivo del SR potrebbe essere mediato da un meccanismo che agisce sul rilascio di GLU, che sia indipendente dal CB1, come viene riportato da uno studio effettuato in vitro sui sinaptosomi ippocampali di ratto e topo [Kofalvi A, et al. 2003].

Allo scopo d'identificare altri meccanismi coinvolti nell'azione neuroprotettiva indotta dal  $\Delta 9$ -THC, oltre a quelli mediati dal CB1, è stato analizzato l'effetto del post-trattamento con il  $\Delta 9$ -THC alla dose di 1 mg/Kg sull'espressione di altri *markers* di neurotossicità.

Il  $\Delta 9$ -THC, sia nella corteccia che nello striato, protegge i terminali DAergici, infatti attenua l'effetto della METH sui livelli della TH, riportando i valori di quest'ultima ai livelli basali. In maniera consistente, nei modelli di neurotossicità indotta dalla METH, l'espressione della TH è utilizzata come indice della perdita dei terminali DAergici la cui riduzione è parallela alla diminuzione di DA misurata in HPLC [Nader J, 2014; Thiriet C, et al. 2005].

In accordo con i risultati del presente lavoro, recenti dati di Nader e collaboratori nel 2014, hanno dimostrato che il pre-trattamento con  $\Delta 9$ -THC (3 mg/Kg) o con gli inibitori della FAAH (URB597) e della MAGL (JZL184) riporta i livelli di TH ai valori basali. Questo effetto è bloccato dall'antagonista selettivo per i recettori CB2, l'AM630, ma non dal SR, antagonista dei recettori CB1 [Nader J, 2014].

Inoltre i nostri dati dimostrano che il post-trattamento con  $\Delta 9$ -THC sia in CPU che in PFC diminuisce l'incremento dei valori dell'IBA1 indotti dalla METH riportandoli ai valori basali.

Torres e collaboratori (2010) hanno dimostrato che l'agonista selettivo per i recettori CB2, il JWH-015, blocca l'attivazione della microglia indotta dal MDMA, suggerendo un coinvolgimento di tale recettore nel meccanismo di neuroprotezione nella neurotossicità indotta da MDMA. Inoltre nel loro lavoro Torres et coll hanno riportato anche un incremento della immunoreattività per i recettori CB2, la cui aumentata espressione è diminuita dalla somministrazione di JWH-015 [Torres E, et al. 2010].

I nostri dati dimostrano che il trattamento con METH, induce un aumento dell'espressione del recettore CB2, che però non viene modificata in seguito al post-trattamento con il  $\Delta$ 9-THC.

Il mancato effetto del nostro post-trattamento ( $\Delta$ 9-THC 1mg/kg) sull'espressione del recettore CB2 può essere attribuita sia all'utilizzo di droghe d'abuso differenti, i.e MDMA vs METH, che al differente trattamento cannabinoide, JWH vs THC, che non è un agonista selettivo dei CB2r ma agisce su entrambi i recettori CB1 e CB2.

Infine è stato dimostrato che il trattamento con la METH, aumenta i livelli della proteina neurotrofica BDNF sia in corteccia che in striato. Numerose evidenze indicano come i fattori neurotrofici, regolando la plasticità sinaptica, possano contribuire al fenomeno di "neuro-adattamento" secondario all'abuso di droghe

psicoattive [Fumagalli F, et al. 2007], tipo la METH. Inoltre è ampiamente noto che il BDNF i) esercita una forte influenza sulla funzionalità neuronale sia durante lo sviluppo che nell'adulto, ii) ha un azione neuroprotettiva in diverse condizioni sperimentali di danno cerebrale e iii) svolge un ruolo importante nei processi cognitivi e comportamentali [Fumagalli F, et al. 2003; Fumagalli F, et al. 2007]. Nonostante ciò in letteratura sono presenti dati divergenti sugli effetti che il trattamento con droghe psicostimolanti può indurre sull'espressione del mRNA e della proteina del BDNF. Fumagalli e collaboratori,(2007) hanno dimostrato che il trattamento acuto con cocaina induce un aumento sia dei livelli di mRNA che di proteina del BDNF. Il trattamento cronico con la stessa sostanza induce una marcata up-regolazione del mRNA del BDNF, ma diminuisce fortemente i livelli della proteina [Fumagalli F, et al. 2007]. Il trattamento con un *binge* di METH induce un aumento dell'espressione del BDNF nell'ippocampo e nello striato nei ratti a 11 e a 15 giorni dalla nascita [Curtis EK, 2006]. Il trattamento con un *binge* di METH induce anche un aumento dell'espressione del mRNA del BDNF in ratti adulti sacrificati 1h o 7h o 24h dopo il trattamento con METH [Braun AA, et al. 2011].

Pertanto i nostri dati dimostrano, in linea con quelli di Braun (2011) che dimostrano un incremento del mRNA per il BDNF, che il trattamento con la METH, *up-regola* l'espressione della proteina del BDNF. Questi dati indicano che

l'aumentata produzione del BDNF possa essere un meccanismo di compenso al danno neurotossico indotto dalla METH.

Il trattamento con  $\Delta 9$ -THC non interagisce con questo tipo di meccanismo compensatorio e non modifica l'aumentata espressione della proteina BDNF.

In conclusione questo studio fornisce i primi dati che dimostrano che il  $\Delta 9$ -THC riduce i danni cerebrali indotti dal trattamento con METH, attraverso meccanismi CB1-mediati e -non mediati. I dati suggeriscono un possibile coinvolgimento del recettore CB2 nel meccanismo di neuroprotezione del  $\Delta 9$ -THC, tuttavia al fine di mettere in luce il reale coinvolgimento di questo recettore nel meccanismo neuroprotettivo indotto dal  $\Delta 9$ -THC è necessario condurre ulteriori studi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Amantea D, Spagnuolo P, Bari M, Fezza F, Mazzei C, et al. (2007) Modulation of the endocannabinoid system by focal brain ischemia in the rat is involved in neuroprotection afforded by 17beta-estradiol. *FEBS J.* 274: 4464–4775.
- 2) Asanuma M, Tsuji T, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N (2003) Methamphetamine-induced neurotoxicity in mouse brain is attenuated by ketoprofen, a non-steroidal anti-inflammatory drug. *Neurosci Lett.* 352: 13-16.
- 3) Axt KJ and Molliver ME (1991) Immunocytochemical evidence for methamphetamine-induced serotonergic axon loss in the rat brain. *Synapse.* 9: 302-313.
- 4) Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature.* 404: 84-87.
- 5) Belcher AM, O'Dell SJ, Marshall JF (2005) Impaired object recognition memory following methamphetamine, but not p-chloroamphetamine or d-

amphetamine-induced neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology*. 30: 2026-2034.

- 6) Berger C, Schmid PC, Schabitz WR, Wolf M, Schwab S, et al. (2004) Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? *J Neurochem*. 88: 1159–1167.
- 7) Berman SB, et al. (1996) Modification of dopamine transporter function: effect of reactive oxygen species and dopamine. *J Neurochem*. 67: 593–600.
- 8) Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*. 8: 57–69.
- 9) Bortolato M, Frau R, Piras AP, Luesu W, Bini V, Diaz G, Gessa G, Ennas MG, Castelli MP (2009) Methamphetamine induces long-term alterations in reactivity to environmental stimuli: correlation with dopaminergic and serotonergic toxicity. *Neurotox Res*. 15: 232-245.

- 10) Bortolato M, Frau R, Bini V, Luesu W, Loriga R, et al. (2010) Methamphetamine neurotoxicity increases brain expression and alters behavioral functions of CB1 cannabinoid receptors. *J Psychiatr Res.* 44: 944–955.
  
- 11) Braun AA, Herring NR, Schaefer TL, Hemmerle AM, Dickerson JW, Seroogy KB, Vorhees CV, Williams MT (2011) Neurotoxic (+)-methamphetamine treatment in rats brain-derived neurotrophic factor and tropomyosin receptor kinase B expression in multiple brain regions. *Neuroscience.* 184: 164-171.
  
- 12) Brown JM, Quinton MS, Yamamoto BK (2005) Methamphetamine-induced inhibition of mitochondrial complex II: roles of glutamate and peroxynitrite. *J Neurochem.* 95: 429–436.
  
- 13) Cadet JL, Sheng P, Ali S, Rothman R, Carlson E, Epstein C. (1994) Attenuation of methamphetamine-induced neurotoxicity in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *J. Neurochem.* 62: 380–383.

- 14) Cadet JL, Jayanthi S, Deng X (2003) Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. *FASEB J.* 17: 1775-1788.
  
- 15) Cadet JL and Krasnova IN (2009) Molecular bases of methamphetamine-induced neurodegeneration. *Int Rev Neurobiol.* 88: 101–119.
  
- 16) Callahan BT and Ricaurte GA (1998) Effect of 7-nitroindazole on body temperature and methamphetamine-induced dopamine toxicity. *Neuroreport.* 9: 2691-2695.
  
- 17) Cass WA (1996) GDNF selectively protects dopamine neurons over serotonin neurons against the neurotoxic effects of methamphetamine. *J Neurosci.* 16: 8132-8139.
  
- 18) Cass WA and Manning MW (1999) Recovery of presynaptic dopaminergic functioning in rats treated with neurotoxic doses of methamphetamine. *J Neurosci.* 19: 7653–7660.

- 19) Cass WA (2000)a Attenuation and recovery of evoked overflow of striatal serotonin in rats treated with neurotoxic doses of methamphetamine. *J Neurochem.* 74: 1079–1085.
- 20) Cass WA, Manning MW, Bailey SL (2000)b Restorative effects of GDNF on striatal dopamine release in rats treated with neurotoxic doses of methamphetamine. *Ann Y Acad Sci.* 914: 127-136.
- 21) Chang L, Alicata D, Ernst T, Volkow N (2007) Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addiction.* 102 Suppl 1: 16–32.
- 22) Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E, Arevalo-Martin A, Dacagne F, Romero E, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2005) The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem.* 5: 671-675.
- 23) Curtis EK (2006) Meth mouth: a review of methamphetamine abuse and its oral manifestations. *Gen Dent.* 54: 125-129.

- 24) Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH (2001) Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev.* 36: 1-22.
- 25) De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V (2001) Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett.* 506: 253–256.
- 26) De Petrocellis L and Di Marzo V (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 23: 1-15.
- 27) Deng X and Cadet JL (2000) Methamphetamine-induced apoptosis is attenuated in the striata of copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 83: 121-124.
- 28) Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34: 605-613.

- 29) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-1949.
- 30) El-Remessy AB, Khalil IE, Matragoon S, Abou-Mohamed G, Tsai NJ, Roon P, Caldwell RB, Caldwell RW, Green K, Liou GI (2003) Neuroprotective effect of (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am J Pathol*. 163: 1997-2008.
- 31) Fattore L (2015) *Cannabinoids in neurologic and mental disease*. 1st edition. Elsevier. Academic Press.
- 32) Fernandez-Ruiz J, Garcia C, Sagredo O, Gomez-Ruiz M, de Lago E (2010) The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin Ther Targets*. 14: 387–404.

- 33) Fowler CJ, Rojo ML, Rodriguez-Gaztelumendi A (2010) Modulation of the endocannabinoid system: Neuroprotection or neurotoxicity? *Exp Neurol.* 224: 37-47.
- 34) Fukami G., Hashimoto K., Koike K., Okamura N., Shimizu E., Iyo M (2004) Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. *Brain Res.* 1016: 90–95.
- 35) Fumagalli F, Molteni R, Roceri M, Bedogni F, Santero R, Fossati C, Gennarelli M, Racagni G, Riva MA (2003) Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity. *J Neurosci Res.* 72: 622-628.
- 36) Fumagalli F, DiPasquale L, Caffino L, Racagni G, Riva MA (2007) Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *Eur J Neurosci.* 26: 2756-2763.
- 37) Gaoni Y and Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc.* 86: 1646–1647.

- 38) Garcia-Arencia M, Garcia C, Fernandez-Ruiz J (2009) Cannabinoids and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 8: 432–439.
- 39) Goncalves J, Baptista S, Martins T, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, Malva JO, Silva AP (2010) Methamphetamine-induced neuroinflammation and neuronal dysfunction in the mice hippocampus: preventive effect of indomethacin. *Eur J Neurosci*. 31: 315-326.
- 40) Gonzalez R, Rippeth JD, Carey CL, Heaton RK, Moore DJ, Schweinsburg BC, Cerner M, Grant I (2004) Neurocognitive performance of methamphetamine users discordant for history of marijuana exposure. *Drug Alcohol Depend*. 76: 181-190.
- 41) Grotenhermen F (2006) Cannabinoids and the endocannabinoid system. Mini-review. *Cannabinoids*. 1:10-14.
- 42) Hansen HS, Lauritzen L, Moesgaard B, Strand AM, Hansen HH (1998) Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acetyethanolamines: proposed role in neurotoxicity. *Biochem Pharmacol* 55: 719–725.

- 43) Hirata H, Ladenheim B, Carlson E, Epstein C, Cadet JL. (1996) Autoradiographic evidence for methamphetamine-induced striatal dopaminergic loss in mouse brain: attenuation in CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Brain Res.* 714: 95–103.
- 44) Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69: 619-631.
- 45) Howlett AC, Blume LC, Dalton GD (2010) CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Pharmacol Biochem Behav.* 97: 144-151.
- 46) Itzhak SF and Ali J (1996) The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. *J Neurochem.* 67: 1770–1773.
- 47) Itzhak Y, Gandia C, Huang PL, Ali SF (1998) Resistance of neuronal nitric oxid synthase-deficient mice to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 284: 1040-1047.

- 48) Itzhak Y and Achat-Mendes C (2004) Methamphetamine and MDMA (Ecstasy) Neurotoxicity: 'of Mice and Men'. *IUBMB Life*. 56: 249-255.
- 49) Kim YS and Joh TH (2006) Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med*. 38: 333–347.
- 50) Kitamura O, Tokunaga I, Gotohda T, Kubo S (2007) Immunohistochemical investigation of dopaminergic terminal markers and caspase-3 activation in the striatum of human methamphetamine users. *Int J Legal Med*. 121: 163–168.
- 51) Kofalvi A, Vizi ES, Ledent C, Sperla'gh B (2003) Cannabinoids inhibit the release of [3H] glutamate from rodent hippocampal synaptosomes via a novel CB1 receptor-independent action. *Eur J Neurosci*. 18: 1973–1978.
- 52) Krasnova IN and Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res Rev*. 60: 379-407.

- 53) Kuhn DM, Francescutti-Verbeem DM, Thomas DM (2006) Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. *Ann N Y Acad Sci.* 1074: 31–41.
- 54) LaVoie MJ, Card JP, Hasting TG (2004) Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Exp Neurol.* 187: 47-57.
- 55) Marchalant Y, Brothers HM, Wenk GL (2009) Cannabinoid agonist WIN-55,212-2 partially restores neurogenesis in the aged rat brain. *Mol Psychiatry.* 14: 1068-1069.
- 56) Marinelli S, Vaughan CW, Christie MJ, Connor M (2002) Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. *J Physiol.* 543: 531–40.
- 57) Marshall JF and O'Dell SJ (2012) Methamphetamine influences on brain and behavior: unsafe at any speed? *Trends Neurosci.* 35: 536–545.

- 58) Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C (2002) Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. *J Neurochem.* 80: 448–456.
- 59) Massi P, Valenti M, Bolognini D, Parolaro D (2008) Expression and function of the endocannabinoid system in glial cells. *Curr Pharm Des.* 14: 2289–2298.
- 60) Maxwell JC and Brecht ML (2011) Methamphetamine: here we go again? *Addict Behav.* 36: 1168–1173.
- 61) Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 50: 83-90.
- 62) Mendelson J, Uemura N, Harris D, Nath RP, Fernandez E, Jacob P 3rd, et al. (2006) Human pharmacology of the methamphetamine stereoisomers. *Clin Pharmacol Ther.* 80: 403–420.

- 63) Minghetti L (2005) Role of inflammation in neurodegenerative disease. *Curr Opin Neurol.* 18: 315-321.
- 64) Moszczynska A, Fitzmaurice P, Ang L, Kalasinsky KS, Schmunk GA, Peretti FJ, Aiken SS, Wickham DJ, Kish SJ (2004) Why is parkinsonism not a feature of human methamphetamine users? *Brain* 127: 363–370.
- 65) Munro S, Thomas KL, Abushaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365: 61–65.
- 66) Muthian S, Rademacher DJ, Roelke CT, Gross GJ, Hillard CJ (2004) Anandamide content is increased and CB1 cannabinoid receptor blockade is protective during transient, focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* 129: 743–50.
- 67) Nader J, Rapino C, Gennequin B, Chavant F, Francheteau M, Makryannis A, Duranti A, Maccarrone M, Solinas M, Thiriet N (2014) Prior stimulation of the endocannabinoid system prevents methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum through activation of CB2 receptors. *Neuropharmacology.* 87: 214-221.

- 68) O'Callaghan JP and Miller DB (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 270: 741–751.
- 69) Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, et al. (2001)
- 70) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.*
- 71) 413: 527–533.
- 72) Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press, 3rd ed.
- 73) Pegorini S, Zani A, Braidà D, Guerini-Rocco C, Sala M (2006) Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. *Br J Pharmacol.* 147: 552–559.

- 74) Pellegrini-Giampietro DE, Mannaioni G, Bagetta G (2009) Post-ischemic brain damage: the endocannabinoid system in the mechanisms of neuronal death. *FEBS J.* 276: 2–12.
- 75) Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007) Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 161–167.
- 76) Pope C, Mechoulam R, Parsons L (2010) Endocannabinoid signaling in neurotoxicity and neuroprotection. *Neurotoxicology.* 31: 562-571.
- 77) Pu C and Vorhees CV (1993) Developmental dissociation of methamphetamine-induced depletion of dopaminergic terminals and astrocyte reaction in rat striatum. *Brain Res Dev Brain Res.* 72: 325–328.
- 78) Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 266: 4244–4250.

- 79) Sapp E, Kegel KB, Aronin N, Hashikawa T, Uchiyama Y, Tohyama K, Bhide PG, Vonsattel JP, DiFiglia M (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60: 161–172.
- 80) Schepers RJ, Oyler JM, Joseph RE Jr, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA (2003) Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin Chem.* 49: 121–132.
- 81) Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G, Takei N, Yoshikawa E, Nakamura K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Suda S, Suzuki K, Kawai M, Takebayashi K, Yamamoto S, Matsuzaki H, Ueki T, Mori N, Gold MS, Cadet JL (2008) Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. *J Neurosci.* 28: 5756–5761.
- 82) Stella N (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia.* 48: 267-277.
- 83) Stella N (2009) Endocannabinoid signaling in microglial cells. *Neuropharmacology.* 56 Suppl 1: 244-253.

- 84) Stella N (2010) Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia*. 58: 1017-1030.
- 85) Thiriet C, Deng X, Solinas M, Ladenheim B, Curtis W, Goldberg SR, Palmiter RD, Cadet JL (2005) Neuropeptide Y protects against methamphetamine-induced neuronal apoptosis in the mouse striatum. *J Neurosci*. 25: 5273-5279.
- 86) Thomas DM, Dowgiert J, Geddes TJ, Francescutti-Verbeem D, Liu X, Kuhn DM (2004) Microglial is a pharmacologically specific marker for the neurotoxic amphetamines. *Neurosci Lett*. 367: 349–354.
- 87) Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Borcel E, Peraile I, Mayado A, O’Shea E, Colado MI (2010) Evidence that MDMA (‘ecstasy’) increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. *J Neurochem*. 113: 67-78.
- 88) Tossmann P, Boldt S, Tensil MD (2001) The use of drugs within techno party scene in European metropolitan cities. *Eur Addict Res*. 7: 2-23.

- 89) Tourino C, Zimmer A, Valverde O (2010) THC prevents MDMA neurotoxicity in mice. *PloS One*. 5: e9143.
- 90) Uehara T (2007) Accumulation of misfolded protein through nitrosative stress linked to neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal*. 9: 597–601.
- 91) United Nation Office on Drugs and Crime (UNODC) (2013) World Drug Report 2013 (United Nations publication, Sales No. E.13.XI.6).
- 92) Valdeolivas S, Satta V, Pertwee RG, Fernandez-Ruiz J, Sagredo O (2012) Sativex-like combination of phytocannabinoids is neuroprotective in malonate-lesioned rats, an inflammatory model of Huntington's disease: role of CB1 and CB2 receptors. *ACS Chem Neurosci*. 3: 400-406.
- 93) van der Stelt M and Di Marzo V (2005) Cannabinoid receptor and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*. 7: 37-50.

- 94) Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Franceschi D, Sedler M, Gatley SJ, Miller E, Hitzemann R, Ding YS, Logan J (2001) Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *J Neurosci.* 21: 9414–9418.
- 95) Wilson JM, Kalasinsky KS, Levey AI, Bergeron C, Reiber G, Anthony RM, Schmunk GA, Shannak K, Haycock JW, Kish SJ (1996) Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. *Nat Med.* 2: 699–703.
- 96) Xiang Z, Haroutunian V, Ho L, Purohit D, Pasinetti GM (2006) Microglia activation in the brain as inflammatory biomarker of Alzheimer's disease neuropathology and clinical dementia. *Dis Markers.* 22: 95–102.
- 97) Yamamoto BK, Moszczynska A, Gudelsky GA (2010) Amphetamine toxicities: Classical and emerging mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1187:101-121.

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze, dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

