



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI

E

UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA

E

PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – sotto - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Antonella D'Agostino

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui afferisce laboratorio ospitante:

Università degli studi di Roma “Tor Vergata”

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

6 mesi

TRASMISSIONE ENDOCANNABINOIDERICA NELL'IMPOTENZA

Gli endocannabinoidi sono una nuova classe di mediatori lipidici, isolati dal cervello e dai tessuti periferici (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1998) e ritrovati anche nel latte materno (Di Marzo et al., 1998), che comprendono amidi ed esteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena che esibiscono attività cannabimimetica. L'anandamide (AEA) e il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) sono i principali endocannabinoidi in grado di mimare i diversi effetti farmacologici (es. ipotermia; vasodilatazione; antinocicezione) del Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC) che è il principio psicoattivo dei derivati della cannabis sativa.

Diversamente dai classici neurotrasmettitori e neuropeptidi, l'anandamide e il 2-AG non sono depositati in vescicole intracellulari ma sono prodotti e rilasciati su richiesta dalla scissione, recettore indotta, di precursori fosfolipidici.

Il precursore dell'anandamide, in particolare, è una N-arachidonoilfosfatidiletanolamina (Na₂PE) che si ritiene possa derivare dal trasferimento dell'acido arachidonico dalla posizione 1 dell'1-2-diarachidonoilcolina alla fosfatidiletanolamina, reazione catalizzata da un N-aciltransferasi Ca²⁺ dipendente. L'N-arachidonoilfosfatidiletanolamina è poi scissa da una fosfolipasi D specifica per le Na₂PE, non ancora caratterizzata, in AEA e acido fosfatidico (Hansen et al., 2000). L'attività biologica dell'anandamide e del 2-AG è terminata mediante la loro rimozione dallo spazio extracellulare attraverso un processo a due stadi che prevede: la captazione degli endocannabinoidi all'interno della cellula mediata da un trasportatore ad alta affinità, seguita dalla degradazione intracellulare da parte di un'amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH). Sono state caratterizzate diverse proprietà di un trasportatore di membrana selettivo per l'AEA (AMT), sebbene la sua struttura molecolare sia ancora ignota. È stato dimostrato che l'AMT trasporta l'anandamide all'interno della cellula mediante un processo saturabile che ha le caratteristiche di una diffusione facilitata: tale processo è bidirezionale ed indipendente sia dall'energia che dal Na⁺, diversamente dai trasportatori di amine e di aminoacidi (Hillard et al., 1997). I bersagli molecolari dell'anandamide e del 2-AG sono i recettori che, insieme ai cannabinoidi endogeni, i trasportatori di membrana e le idrolasi, costituiscono il "Sistema endocannabinoide". La famiglia recettoriale include: i recettori cannabinoidi CB1, presenti maggiormente nei neuroni centrali e periferici, e i recettori CB2, espressi prevalentemente dalle cellule immunitarie, i recettori cannabinoidi non CB1 e non CB2, i recettori non cannabinoidi e quelli vanilloidi (VR1). Diverse azioni biologiche dell'anandamide e del 2-AG o di entrambi, si esplicano attraverso l'attivazione di uno o più di questi targets. In particolare, i recettori CB1R e CB2R appartengono alla famiglia dei recettori legati alle proteine G (Gi/Go), sensibili alla tossina della pertosse. Essi sono legati a diversi sistemi di trasduzione, quali l'inibizione della adenilato ciclasi e la riduzione dei livelli di AMP ciclico, l'inibizione dei canali allo ione Ca²⁺-voltage dipendenti di tipo N, L, P e Q, l'attivazione di canali allo ione K⁺, della fosfolipasi C e di differenti protein chinasi (vedi Mackie & Hille, 1992; Twitchell et al., 1997; Pan et al., 1998; Freund et al., 2003; Howlett et al., 2004; Guo & Ikeda, 2004).

Gli endocannabinoidi svolgono molteplici azioni sul sistema nervoso in quanto inibiscono la comunicazione nelle "Gap Junction" di cellule gliali (Venance et al., 1995), interagiscono con la neurotrasmissione dopaminergica (Giuffrida et al., 1999) e sono anche coinvolti nella neurotossicità indotta dal glutammato (Hampson et al., 1998; Hansen et al., 1999).

A livello periferico l'anandamide e il 2-AG esercitano azioni cardiovascolari (Wagner et al., 1998) giocando un ruolo importante come agenti vasorilassanti e anche come regolatori del sistema immunitario e della fertilità (Maccarrone et al., 2000).

Di interesse per questo progetto di ricerca è il ruolo che gli endocannabinoidi esercitano sull'attività dei neuroni correlati alla funzione erettile e al comportamento sessuale maschile. Il comportamento

sessuale ha un ruolo fondamentale nella riproduzione delle specie animali ed è il risultato di una complessa attività neurale, centrale e periferica, complicata ulteriormente da influenze endocrine ormonali. Recenti studi neuroanatomici, neurofarmacologici e elettrofisiologici hanno portato alla identificazione di alcune vie che proiettano nel midollo spinale proprio a livello del tratto lombosacrale e che potrebbero essere coinvolte nel controllo delle vie neurali che innervano l'apparato genitale, modulando quindi l'espressione dell'erezione e della eiaculazione, due delle principali funzioni sessuali maschili. La più nota di queste vie origina nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo (PVN), è di natura ossitocinergica e la sua attivazione da parte di diversi trasmettitori (dopamina, ossitocina, aminoacidi eccitatori) porta all'espressione dell'erezione peniena, mentre la sua inibizione, per esempio da parte del GABA o dei peptidi oppioidi, la inibisce (Melis & Argiolas, 2003, Argiolas & Melis, 2004). Questi neuroni ossitocinergici del PVN dispongono di recettori CB1R funzionalmente attivabili attraverso la somministrazione di cannabinoidi naturali e di sintesi (Herkenham et al., 1991; McGregor et al., 1998; Patel et al., 1998).

Altri studi hanno poi dimostrato che i cannabinoidi esercitano profondi effetti inibitori sulla riproduzione maschile, agendo sia a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi che a livello del testicolo e degli spermatozoi (Maccarrone et al., 2003; Rossato et al., 2004). Inoltre, è stato recentemente riportato che la soppressione nel PVN dell'attività del CB1R, mediante il suo specifico antagonista SR141776, porta al potenziamento della risposta erettile, sia indotta che non indotta dall'apomorfina (Melis et al., 2004; da Silva et al., 2003).

OBIETTIVI

Nell'ambito del presente progetto verranno approfonditi gli aspetti biochimici relativi al "tono endocannabinoide" e al suo "controllo metabolico" nel PVN e nell'apparato riproduttivo maschile. L'obiettivo è quello di approfondire la conoscenza biochimica del sistema endocannabinoide presente nel PVN e nell'apparato riproduttivo maschile degli animali. Durante la caratterizzazione saranno misurati i livelli di AEA, in condizioni fisiologiche ed in presenza di vari induttori dell'erezione peniena, e saranno dosate le attività enzimatiche di NAPE-PLD, AMT e FAAH, coinvolte nella regolazione dei livelli endogeni di AEA. Verranno inoltre saggiati i livelli di cAMP in modo da valutare la modulazione dell'adenilato ciclasi, una delle vie principali di trasduzione del segnale mediate dai recettori CBR1. Le informazioni ottenute da questi esperimenti serviranno a chiarire il ruolo che il sistema endocannabinoide può svolgere nella modulazione dei comportamenti sessuali maschili.

METODOLOGIE

Verranno effettuate analisi biochimiche del sistema endocannabinoide. Il legame di [³H]-AEA e di [³H]-CP55.940 (un agonista sintetico dei recettori CB1) a frazioni di membrana isolate dal PVN e al testicolo del ratto verrà determinato mediante saggi di binding, come descritto (Maccarrone et al., 2000). Le costanti di dissociazione apparente (Kd) e di legame massimo apparente (Bmax) verranno calcolate mediante analisi di regressione nonlineare, usando il programma Prism 3 (GraphPAD Software for Science). L'idrolisi di [³H]AEA da parte dell'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH; E.C. 3.5.1.4) sarà dosata in estratti tissutali mediante cromatografia liquida ad alta prestazione su fase inversa, come già descritto (Maccarrone et al., 1999). Le costanti cinetiche di AMT e FAAH, vale a dire la costante apparente di Michaelis-Menten (KM) e la velocità massima apparente (Vmax), verranno calcolate mediante analisi di regressione nonlineare, usando il programma Prism 3. L'attività della fosfolipasi D che sintetizza AEA (NAPE-PLD; E.C. 3.1.4.4) sarà dosata misurando il rilascio di [³H]AEA da N-[³H]arachidonoil-fosfatidiletanolamina (N-[³H]ArPE), seguendo il metodo di Moesgaard et al., 2000, modificato secondo Okamoto et al., 2004. [³H]AEA, [³H]CP55,940 e N-[³H]ArPE sono disponibili commercialmente. I livelli endogeni di AEA nei campioni verranno misurati mediante gas cromatografia-spettrometria di massa, come

riportato di recente (Maccarrone et al., 2001). L'analisi statistica dei dati biochimici verrà eseguita mediante il test t di Student, parametrico, oppure mediante il test U di Mann-Whitney, non parametrico, usando il programma the InStat 3 (GraphPAD). L'espressione proteica della FAAH verrà valutata mediante separazione dei lisati cellulari tramite SDS-PAGE e successiva analisi di Western blot, usando anticorpi anti-FAAH, disponibili in commercio. La misura dell'AMP ciclico sarà effettuata come precedentemente descritto (Bari et al., 2005).

RISULTATI ATTESI

In seguito alla misurazione dei livelli di cannabinoidi endogeni e dell'attività degli enzimi che sono implicati nella loro sintesi e metabolismo (PLD, FAAH, AMT), in nuclei discreti dell'ipotalamo di ratti maschi, precedentemente identificati per la loro capacità sessuale (potenti ed impotenti), ci si aspetta, innanzitutto, di ottenere un maggior attività dei recettori cannabinici di tipo 1 (CB1R) nel PVN dei ratti sessualmente impotenti o inesperti, poiché risultati preliminari hanno già suggerito che il blocco dei recettori CB1 nel nucleo paraventricolare facilita la risposta erettile. Infatti, la soppressione dell'attività del CB1R nel PVN, mediante il suo specifico antagonista SR141776, porta al potenziamento della risposta erettile. Inoltre ci si aspetta anche una maggior attività degli enzimi coinvolti nella sintesi e nella degradazione dell'anandamide quali NAPE-PLD, AMT e FAAH.

BIBLIOGRAFIA

1. Devane W.A., Hannus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., 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.
2. Mechoulam R., Fride E., Di Marzo, V. (1998). Endocannabinoids. *Eur. J. Pharmacol.* 359, 1-18.
3. Hansen H.H., Hansen S.H., Schousboe A., Hansen H.S. (2000). Determination of the phospholipid precursor of anandamide and other N-acyl ethanolamine phospholipids before and after sodium azide-induced toxicity in cultured neocortical neurons. *J. Neurochem.* 75, 861-871.
4. Hillard C.J., Edgemond W.S., Jarrahian A., Campbell W.B. (1997). Accumulation of N-arachidonylethanolamide (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J. Neurochem.* 69, 631-638.
5. Mackie K & Hille B 1992. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3825-3829
6. Twitchell W, Brown S, Mackie K 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 78, 43-50
7. Pan X, Ikeda SR, Lewis DL 1998. SR 141716A acts as an inverse agonist to increase neuronal voltage-dependent Ca²⁺ currents by reversal of tonic CB1 cannabinoid receptor activity. *Mol. Pharmacol.* 54, 1064-1072

8. Freund TF, Katona I, Piomelli D 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017-1066
9. Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ 2004. Cannabinoid physiology and pharmacology:30 years of progress. *Neuropharmacology* 47, 345-358
10. Guo J & Ikeda SR 2004. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol. Pharmacol.* 65, 665-674
11. Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C 1995. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 376, 590-594
12. Giuffrida A., Parsons L.H., Kerr T.M., Rodriguez de Fonseca F., Navarro M., Piomelli D. (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature Neurosci.* 2, 358-363.
13. Hampson A.J., Grimaldi M., Axelrod J., Wink D. (1998). Cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8268-8273.
14. Hansen H.S., Moesgaard B., Hansen H.H., Schousboe A., Petersen G. (1999). Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine (including anandamide) during glutamate-induced neurotoxicity. *Lipids* 34, S327-S330.
15. Wagner J.A., Varga K., Kunos, G. (1998). Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J. Mol. Med.* 76, 824-836.
16. Maccarrone M., De Felici M., Bari M., Klinger F., Siracusa G., Finazzi-Agrò A. (2000). Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones. *Eur. J. Biochem.* 267, 2991-2997.
17. Melis MR, Succu S, Mascia MS, Argiolas A 2004. Antagonism of cannabinoid CB1 receptors in the paraventricular nucleus of male rats induces penile erection. *Neurosci. Lett.* 359, 17-20
18. Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 563-583
19. McGregor IS, Arnold JC, Weber MF, Topple AN, Hunt GE 1998. A comparison of delta 9-THC and anandamide induced c-fos expression in the rat forebrain. *Brain Res.* 802, 19-26
20. Patel NA, Moldow RL, Patel JA, Wu G, Chang SL 1998. Arachidonylethanolamide (AEA) activation of FOS proto-oncogene protein immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* 797, 225-233
21. Maccarrone M, Ceconi S, Rossi G, Battista N, Pauselli R, Finazzi-Agrò A 2003. Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells. *Endocrinology.* 144(1), 20-28

22. Rossato M, Popa FI, Ferigo M, Clari G, Foresta C 2004. Human sperm express cannabinoid receptor cb1 which activation inhibits motility, acrosome reaction and mitochondrial function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(2), 984-91
23. da Silva GE, Fernandes MS, Takahashi RN 2003. Potentiation of penile erection and yawning responses to apomorphine by cannabinoid receptor antagonist in rats. *Neurosci. Lett.* 349, 49-52
24. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A 2000a. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 275, 13484-13492
25. Moesgaard B, Petersen G, Jaroszewski JW, Hansen HS 2000. Age dependent accumulation of N-acyl-ethanolamine phospholipids in ischemic rat brain. A ³¹P NMR and enzyme activity study. *J. Lipid Res.* 41, 985-990
26. Maccarrone M, Attinà M, Bari M, Cartoni A, Ledent C, Finazzi-Agrò A 2001. Anandamide degradation and N-acylethanolamines level in wild-type and CB1 cannabinoid receptor knockout mice of different ages. *J. Neurochem.* 78, 339-340
27. Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A 2000a. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 275, 13484-13492
28. M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. 2005. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* Apr 1;280(13):12212-20.