Il sistema endocannabinoide e le sue funzioni

Elisa Bellamoli [1]
Catia Seri [2]
Francesco Bricolo [1]
Giovanni Serpelloni [3]
Fabrizio Schifano [4]

[1] Dipartimento delle Dipendenze ULSS 20 Verona - Unità di neuroscienze
[2] Sistema Nazionale di Allerta Precoce, Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri
[3] Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri
[4] Department of Pharmacy, University of Heartfordshire, United Kingdom

INTRODUZIONE

Il sistema endocannabinoide è un complesso sistema endogeno di comunicazione tra cellule. Esso è composto da recettori endocannabinoidi, i loro ligandi endogeni (gli endocannabinoidi) e le proteine coinvolte nel metabolismo e nel trasporto degli endocannabinoidi. Questo sistema è di grande importanza per il normale funzionamento dell'organismo.

Il sistema endocannabinoide prende il suo nome dalla pianta di cannabis poiché alcuni fitocannabinoidi in essa presenti, tra cui il THC, mimano gli effetti degli endocannabinoidi legandosi ai medesimi recettori. La maggior parte dei neurotrasmettitori sono stati scoperti molto prima dei recettori corrispondenti ai quali si legano per svolgere la loro azione sul Sistema Nervoso Centrale (SNC). Tuttavia nuove tecniche di studio e di ricerca hanno teso a rovesciare questa tradizione e, come già nel caso della scoperta del sistema oppioide endogeno, anche nel caso degli endocannabinoidi, essi sono stati individuati dopo la scoperta dei loro recettori, i quali erano stati identificati grazie ai fitocannabinoidi.

LE PRINCIPALI FUNZIONI DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

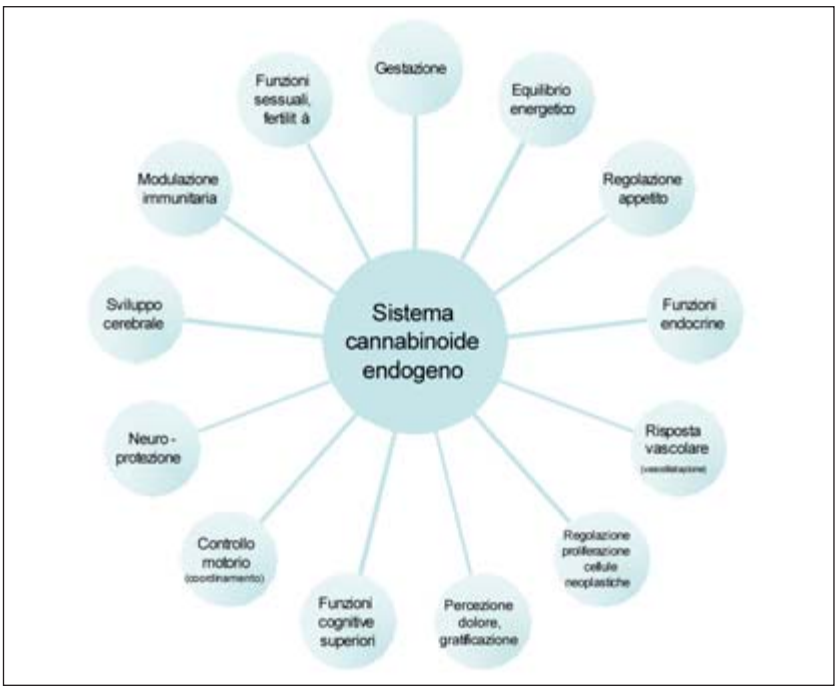

Figura 1.
Le principali funzioni del sistema endocannabinoide in normali condizioni fisiologiche.

FUNZIONI	DESCRIZIONE DELLE RISPOSTE MEDIATE DAL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE
Funzioni cognitive superiori	- Attenzione, memoria, apprendimento - Emozioni - Capacità di prendere decisioni (decision making) e controllo del comportamento
Controllo motorio	- Controllo e coordinazione del movimento - Mantenimento della postura corporea e dell'equilibrio
Percezione del dolore e gratificazione	- Sensibilità agli stimoli dolorosi - Sensibilità agli stimoli piacevoli
Neuroprotezione	- Azione protettiva del SNC dalla sovrastimolazione o sovrainibizione esercitata da altri neurotrasmettitori
Sviluppo cerebrale	- Sviluppo neuronale - Controllo della plasticità sinaptica
Funzioni immunitarie	- Attività immunomodulatoria - Infiammazione
Funzioni sessuali e fertilità	- Processi di maturazione degli spermatozoi - Interazioni con la funzione ovarica - Effetti sulla libido
Gestazione	- Attecchimento dell'embrione - Meccanismi che regolano le prime fasi della gravidanza
Equilibrio energetico	- Regolazione dell'assunzione di cibo - Modulazione dell'omeostasi metabolica
Regolazione dell'appetito	- Modulazione della sensazione di sazietà - Sensibilità viscerale, nausea e vomito
Funzioni endocrine	- Modulazione della secrezione di ghiandole endocrine
Funzioni cardiovascolari	- Risposta vascolare (azione vasodilatatoria e ipotensiva)
Regolazione cellule neoplastiche	- Ruolo del sistema endocannabinoide nella regolazione dei processi di proliferazione cellulare alla base della crescita dei tumori

Tabella 1.
Funzioni in cui è coinvolto il sistema endocannabinoide in normali condizioni fisiologiche.

La produzione in tutto l'organismo di componenti del sistema endocannabinoide e la presenza di questo sistema in organismi di livello inferiore, indicano un ruolo vitale di questo sistema nella normale fisiologia animale, incluso l'uomo (De Petrocellis et al. 2004, McPartland et al. 2006).

In base alla localizzazione dei recettori, è stato ipotizzato che il sistema endocannabinoide sia coinvolto in un gran numero di processi fisiologici (Figura 1, Tabella 1), tra i quali il controllo motorio, la memoria e l'apprendimento, la percezione del dolore, la regolazione dell'equilibrio energetico, e in comportamenti come l'assunzione di cibo (Ameri 1999, Di Marzo 1998). Altre funzioni del sistema endocannabinoide, nella normale fisiologia, potrebbero essere correlate alle funzioni endocrine, alle risposte vascolari, alla modulazione del sistema immunitario, alla neuroprotezione (Correa et al. 2005, Van der Stelt & Di Marzo 2005, Wang et al. 2006, Idris et al. 2005, De Oliveira Alvares et al. 2006, Arenos et al. 2006, Mikics et al. 2006, Guindon et al. 2006).

RECETTORI CANNABINOIDI

Il corpo umano possiede specifici siti di legame per i cannabinoidi, distribuiti sulla superficie di molti tipi di cellule. Il nostro organismo produce i loro ligandi endogeni, chiamati endocannabinoidi, i quali si legano proprio ai recettori cannabinoidi (CB), attivandoli. Questi recettori appartengono alla numerosa famiglia dei recettori accoppiati alla proteina G (GPCR), superfamiglia della quale fa parte la maggioranza dei recettori più comuni. I GPCR sono recettori di membrana che consistono in sette domini trans membrana (7TM) con un terminale amminico extracellulare ed un terminale carbonilico intracellulare (Howlett, 2002).

Fino a qualche anno fa si pensava che esistessero solo due tipi di recettori cannabinoidi, i CB_1 (Figura 2) scoperti nel 1990 (Matsuda et al.1990, Gerard et al. 1991) e i CB_2 scoperti qualche anno dopo, nel 1993 (Munro et al. 1993, Griffin et al. 2000) ma ci sono crescenti evidenze dell'esistenza di ulteriori recettori cannabinoidi sia a livello centrale che periferico. Uno di questi potrebbe essere il recettore "orfano" accoppiato alla proteina G, denominato GPR55 (Lauckner 2008, Ryberg et al. 2007).

Localizzazione dei recettori cannabinoidi

I recettori cannabinoidi hanno differenti meccanismi di distribuzione tissutale e di segnalazione. I CB_1 sono tra i più abbondanti e i più ampiamente distribuiti GPCR

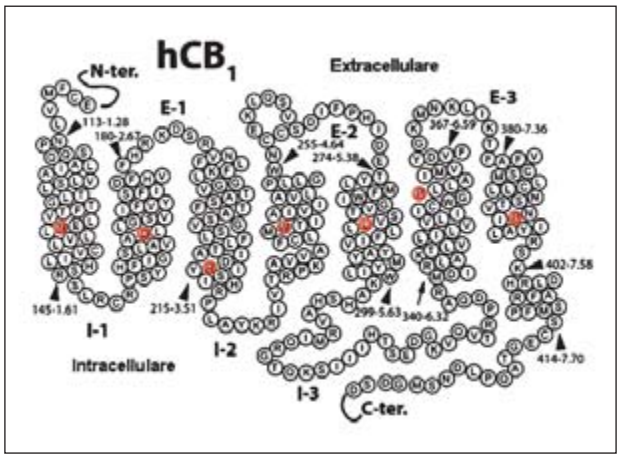

Figura 2.
Il recettore cannabinoide CB_1 ha una struttura a sette domini trans membrana (7TM) (Fonte: The endocannabinoid system handbook. ECSN 2008).

nell'encefalo. Si trovano principalmente sulle cellule nervose (neuroni) del SNC (oltre che nell'encefalo quindi, anche nel midollo spinale). A livello dell'encefalo, la distribuzione dei CB_1 (Figura 3) è particolarmente marcata nelle regioni responsabili della coordinazione motoria e del movimento (per esempio, il cervelletto, i gangli della base, nello specifico, lo striato e la substantia nigra), dell'attenzione e delle funzioni cognitive complesse come il giudizio (ad esempio, la corteccia cerebrale), dell'apprendimento, della memoria e delle emozioni (ad esempio, amigdala e ippocampo) (Biegon & Kerman 2001, Glass et al. 1997, Herkenham et al. 1990, Maileux et al. 1992, Pettit et al. 1998).

I recettori CB_1 sono presenti in minor quantità, anche in alcuni organi e tessuti periferici tra cui ghiandole endocrine, ghiandole salivari, leucociti, milza, cuore e parte dell'apparato riproduttivo, urinario e gastrointestinale.

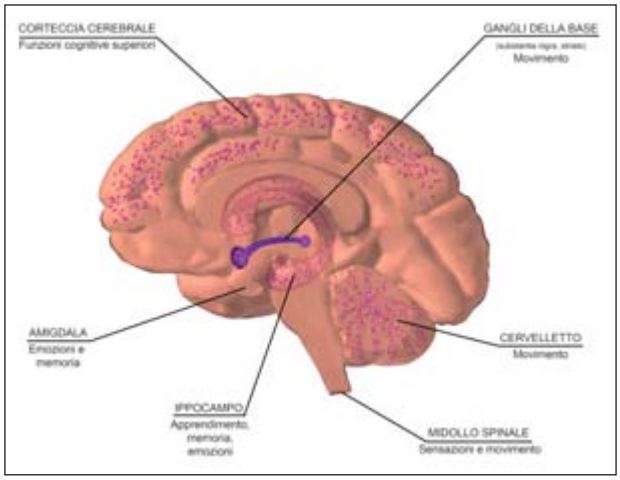

Figura 3.
Distribuzione dei recettori CB1 nel cervello. Nello specifico, le aree indicate con i puntini rosa sono quelle in cui maggiormente si lega il cannabinoide esogeno THC (Fonte: NIDA).

A differenza dei CB_1 invece, i recettori CB_2 sono espressi principalmente a livello periferico. Sono presenti prevalentemente nelle cellule immunocompetenti, tra cui i leucociti, la milza e le tonsille, il midollo osseo ematopoietico ma anche nel pancreas. Recentemente sono stati identificati anche nel SNC, pur se a basse concentrazioni (Van Sickle et al. 2005), in particolare sulle cellule gliali e microgliali.

Attività dei recettori cannabinoidi

Il ruolo dei recettori cannabinoidi è essenzialmente quello di regolare il rilascio di altri messaggeri chimici. I recettori CB_1 interferiscono con il rilascio di alcuni neurotrasmettitori e la loro attivazione protegge il SNC dalla sovrastimolazione o dalla sovrainibizione prodotta da altri neurotrasmettitori.

I recettori CB_2 invece, svolgono prevalentemente un'azione periferica con attività immunomodulatoria. Nel sistema immunitario, infatti, una delle funzioni dei recettori cannabinoidi è la modulazione del rilascio di citochine, molecole proteiche responsabili della regolazione della funzione immune e delle risposte infiammatorie.

Tipologie di cannabinoidi

Il termine cannabinoide si riferisce ad ogni composto che ha la capacità di interagire con i recettori cannabinoidi. Con la definizione di alcune sottocategorie chimiche è possibile prendere in considerazione varie forme di prodotti sia naturali che sintetici. Ad oggi sono state descritte tre tipologie di cannabinoidi: i cannabinoidi endogeni, i fitocannabinoidi, e i cannabinoidi sintetici realizzati in laboratorio a scopo terapeutico e/o di ricerca scientifica.

CANNABINOIDI ENDOGENI

Con il termine cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi si identifica una classe di messaggeri lipidici endogeni, accomunati dalla capacità di interagire con almeno uno dei recettori cannabinoidi a livello centrale o periferico, regolando alcune funzioni fisiologiche e comportamentali. Tutti gli endocannabinoidi sono derivati di acidi grassi polinsaturi, che si differenziano, nella struttura chimica, dai fitocannabinoidi.

Gli endocannabinoidi al momento conosciuti sono i seguenti:
– N-arachidonoiletanolamide (anandamide, AEA)
– 2-arachidonoilglicerolo (2-AG)
– 2-arachidonil gliceril etere (noladina, 2-AGE)
– virodamina (O-arachidonoil etanolamina)
– N-arachidonoil-dopamina (NADA).
L'anandamide è stata isolata ed identificata nel 1992 nel cervello di maiale (Devane et al. 1992), subito dopo la

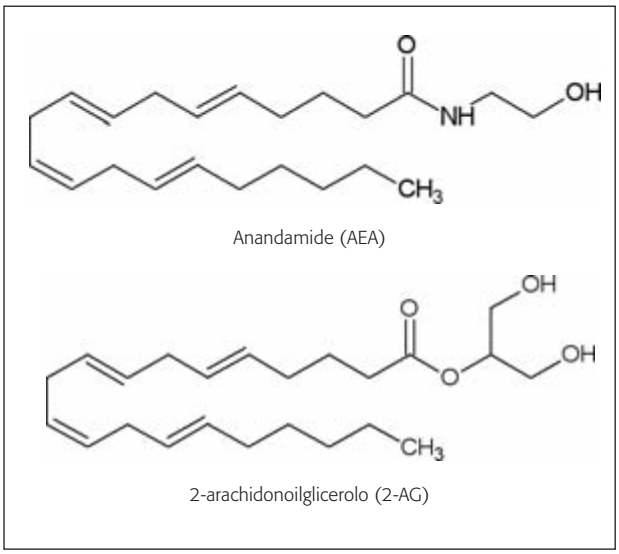

Figura 4.
Struttura dell'anandamide e del 2-arachidonoilglicerolo.

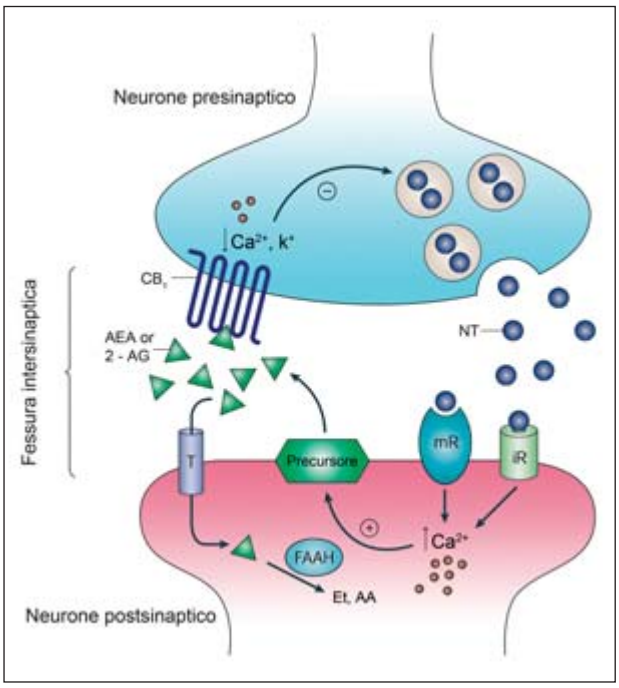

Figura 5.Il sistema endocannabinoide endogeno (Guzman, 2003).
Uno dei ruoli accertati del sistema endocannabinoide è quello di agire da neuromodulatore nel cervello. Le membrane neuronali postsinaptiche contengono i precursori degli endocannabinoidi per rilasciare gli endocannabinoidi attivi (anandamide (AEA), 2-arachidonoilglicerolo (2-AG)) nella fessura intersinaptica. La sintesi ed il rilascio avviene in seguito all'aumento degli ioni calcio (Ca^+) provocato dall'interazione di altri neurotrasmettitori (NT) con i rispettivi recettori che possono essere metabotropici (mR) o ionotropici (iR). Gli endocannabinoidi così liberati, possono funzionare da messaggeri retrogradi, legandosi ai recettori cannabinoidi CB_1 presinaptici, i quali a loro volta, inibiscono i canali del calcio voltaggio dipendente (Ca^+) e attivano quelli del potassio (K^+). Questo effetto sulla polarizzazione di membrana comporta una inibizione del rilascio di altri neurotrasmettitori (quali glutammato, dopamina, GABA). Il processo neuromodulatorio degli endocannabinoidi termina con un meccanismo di ricaptazione all'interno dei neuroni, che coinvolge la presenza di un possibile trasportatore (T) o per diffusione. Una volta all'interno del neurone, vengono degradati dal FAAH, un enzima che scinde l'anandamide (AEA) nelle sue componenti, l'acido arachidonico (AA) e l'etanolamina (Et) (Guzman, 2003).

scoperta dei recettori CB_1 e rappresenta la prima molecola endogena individuata in grado di legarsi selettivamente ad essi. Si tratta di un derivato ammidico dell'acido arachidonico, componente delle membrane cellulari. Deve il suo nome alla parola in Sanscrito "ananda" che significa "beatitudine".

L'anandamide e il 2-AG (Figura 4) costituiscono i due primi endocannabinoidi ad essere stati isolati e per questo sono anche i più studiati fino ad ora.

Sono entrambe piccole molecole lipidiche, piuttosto diverse da qualunque altro neurotrasmettitore conosciuto. A causa della loro natura lipidica, gli endocannabinoidi non vengono immagazzinati nelle vescicole sinaptiche come accade per numerosi altri neurotrasmettitori monoamminici, ma sono sintetizzati all'occorrenza dai neuroni, in seguito alla depolarizzazione della membrana e all'aumento intracellulare dei livelli del calcio (Ca^{2+}) (Freund et al. 2003, Piomelli 2003). La sintesi avviene a partire da fosfolipidi di membrana, precursori che dopo idrolisi enzimatica, ad opera di due enzimi NAPE-PLD e DAGL alfa e beta, liberano, rispettivamente, gli endocannabinoidi AEA o 2-AG dalla membrana pre o post sinaptica, nello spazio intersinaptico (Figura 5). Una volta rilasciati, i nuovi endocannabinoidi sintetizzati viaggiano in direzione retrograda lungo la fessura sinaptica, in quanto si legano ai recettori cannabinoidi sui terminali presinaptici (Freund et al. 2003). L'attivazione di recettori cannabinoidi CB_1, comporta l'inibizione dell'attività dell'adenilatociclasi, con minor produzione del secondo messaggero cAMP, avvia la chiusura dei canali Ca^{2+}, inibendo l'ingresso di ioni Ca^{2+}, e apre i canali del potassio (K^+) causando una iperpolarizzazione delle membrane. Inoltre è presente anche una attivazione di alcune chinasi, tra cui le MAP chinasi. L'inibizione o l'attivazione di canali ionici è una delle conseguenze principali che risulta dal legame degli endocannabinoidi ai loro recettori CB_1 (Szabo & Schliker 2005). Attraverso questa influenza sui canali ionici, gli endocannabinoidi possono inibire il rilascio di neurotrasmettitori dai terminali assonici, perciò hanno un ruolo importante in alcune forme di plasticità sinaptica sia a breve che a lungo termine (Chevaleyre et al. 2006, Mackie 2006).

Riassumendo, gli endocannabinoidi vengono rilasciati dai neuroni postsinaptici per agire sui terminali presinaptici. I recettori CB_1 si trovano principalmente nei terminali presinaptici del SNC. La comunicazione in questa direzione, dal "post" al "pre", viene chiamata segnalazione retrograda (Wilson & Nicoll 2002).

Successivamente, la rimozione di AEA e 2-AG dallo spazio presinaptico avviene rapidamente attraverso un processo di ricaptazione (reuptake) selettivo che suggerisce un trasporto all'interno della cellula, mediato da un trasportatore di membrana (Beltramo et al. 1997; Piomelli et al. 1999) o per diffusione passiva degli endocannabinoidi attraverso la membrana. Una volta all'interno

della cellula, gli endocannabinoidi vengono rapidamente metabolizzati con la loro conseguente disattivazione. Il metabolismo di anandamide e 2-AG avviene principalmente per idrolisi da parte di un enzima denominato FAAH specifico per l'idrolisi delle ammidi degli acidi grassi (Cravatte et al. 1996, Hillard et al. 1995, Ueda et al. 1995) e per il solo 2-AG, anche da parte della monoacilglicerol-lipasi, MAGL (Dinh et al. 2002, Goparaju et al. 1999).

DIFFERENZE TRA ENDOCANNABINOIDI E ALTRI NEUROTRASMETTITORI

Il meccanismo con il quale gli endocannabinoidi agiscono prevede quindi la loro sintesi indotta da determinati eventi, l'attivazione locale di recettori cannabinoidi, seguita da una rapida degradazione.

L'attivazione dei recettori CB_1 con gli endocannabinoidi dunque, diminuisce il rilascio di altri neurotrasmettitori. Gli endocannabinoidi vengono sintetizzati quando persiste un'intensa attività neuronale. La localizzazione dei recettori CB_1 suggerisce che potrebbero partecipare in una sorta di meccanismo di inibizione feedback dove la produzione di endocannabinoidi nelle cellule post sinaptiche inibisce il rilascio di trasmettitori. Questo fenomeno, indicato come "plasticità mediata dagli endocannabinoidi" (Mackie 2008), è un meccanismo che serve sia ad attenuare che ad aumentare l'eccitabilità neuronale, a seconda che si tratti della riduzione del rilascio di un neurotrasmettitore eccitatorio (come ad esempio il glutammato) o di uno inibitorio (il GABA). Il maggior effetto dei recettori CB_1 infatti, è spesso quello di ridurre l'apertura dei canali presinaptici del calcio. Quando i canali del calcio vengono inibiti, la capacità del terminale presinaptico di rilasciare neurotrasmettitori (come dicevamo, principalmente glutammato o GABA) è compromessa. Quindi, quando un neurone postsinaptico è molto attivo, esso rilascia endocannabinoidi, i quali reprimono sia l'impulso inibitorio che eccitatorio sul neurone. I recettori cannabinoidi svolgono dunque una sorta di azione protettiva del Sistema Nervoso Centrale dalla sovrastimolazione o sovrainibizione esercitata da altri neurotrasmettitori.

La rapida induzione della sintesi di endocannabinoidi con la conseguente attivazione dei recettori e successiva degradazione degli stessi, suggerisce che questi composti agiscono nel cervello primariamente come neuromodulatori, piuttosto che come classici neurotrasmettitori (Trezza et al. 2008).

Riassumendo, le caratteristiche peculiari che i cannabinoidi endogeni presentano rispetto agli altri neurotrasmettitori, sono le seguenti:

1. Non vengono prodotti e immagazzinati nelle vescicole come la maggior parte dei neurotrasmettitori, ma vengono prodotti rapidamente "on-demand" (solo quando necessario) a partire dai loro precursori.
2. Sono piccoli e permeabili alla membrana; una volta sintetizzati, possono diffondersi rapidamente attraverso la membrana della loro cellula di origine per influenzare le cellule vicine.
3. Vengono rilasciati dai neuroni postsinaptici per agire sui terminali presinaptici. La comunicazione in questa direzione, dal "post" al "pre", è chiamata *segnalazione retrograda;* dunque gli endocannabinoidi vengono indicati come messaggeri retrogradi. Questo tipo di messaggeri offre una sorta di sistema di feedback per regolare le forme convenzionali di trasmissione sinaptica, che ovviamente vanno dal "pre" al "post".
4. Si legano selettivamente al tipo CB_1 dei recettori cannabinoidi, che è maggiormente localizzato su determinati terminali presinaptici.

IMPORTANZA DEL RUOLO DEI CANNABINOIDI ENDOGENI NELLO SVILUPPO CEREBRALE

Oltre al suo noto coinvolgimento in specifiche funzioni corporee, il sistema endocannabinoide ha un ruolo importante in processi fondamentali dello sviluppo. Il rilascio dei cannabinoidi endogeni controlla la plasticità sinaptica, ovvero, la capacità del sistema nervoso di modificare l'efficienza del funzionamento delle connessioni tra neuroni (sinapsi), di instaurarne di nuove e di eliminarne alcune, in molte aree cerebrali comprese la neocorteccia, l'ippocampo, il cervelletto, e i gangli della base. Il signaling endocannabinoide ha un ruolo fondamentale nelle sinapsi con un chiaro continuum d'azione dallo stabilirsi delle sinapsi nell'inizio del neurosviluppo alla funzione delle sinapsi nel cervello adulto (Harkany et al. 2008). Il sistema endocannabinoide, infatti, è presente nel Sistema Nervoso Centrale fin dalle prime fasi di sviluppo cerebrale, ed esso possiede un ruolo rilevante nell'organizzazione cerebrale durante la vita pre- e postnatale (Fernandez-Ruiz et al. 2000; Fride 2004).

Recenti evidenze indicano infatti, che gli endocannabinoidi intervengono durante il neurosviluppo. Sono coinvolti nel controllo della neurogenesi, nella proliferazione dei progenitori neurali, nella migrazione e nella specificazione fenotipica dei neuroni immaturi influenzando la formazione di complessi network neuronali (Figura 6).

I recettori CB_1 compaiono durante gli stadi più precoci dello sviluppo cerebrale (Begbie et al. 2004, Buckley et al. 1998, Romero et al. 1997) e sono localizzati nelle aree di materia bianca, cioè aree composte dagli assoni dei neuroni (che nel cervello adulto sono praticamente prive di recettori CB_1) e nelle zone di proliferazione cellulare (Berrendero 1999, Wang 2003, Romero et al. 1997). La localizzazione transitoria atipica dei recettori cannabinoidi CB_1 durante il periodo perinatale suggeri-

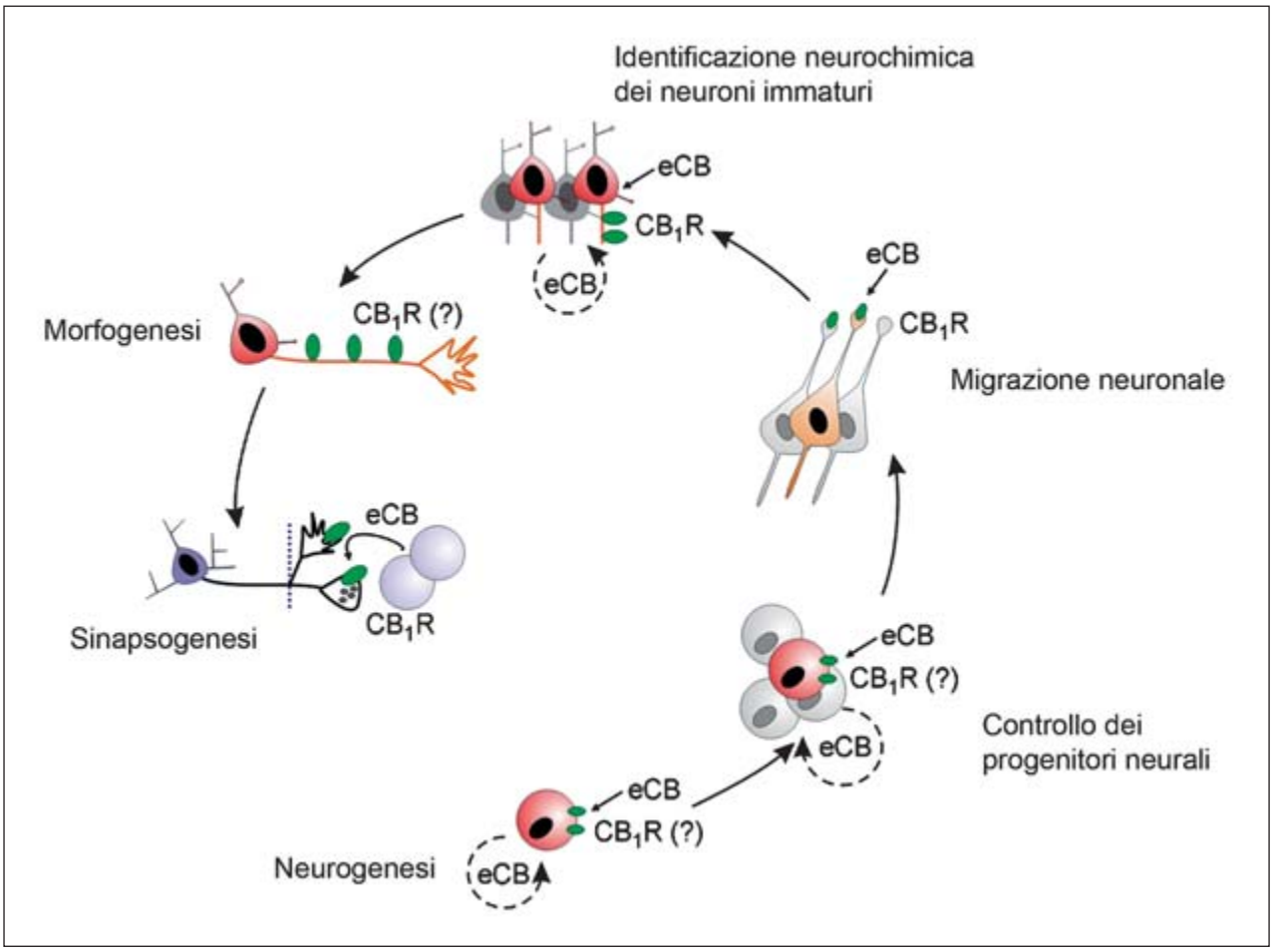

Figura 6. La specificazione neurale è controllata dagli endocannabinoidi che agiscono sui recettori cannabinoidi CB_1 (Harkany et al. 2008).
La specificazione neuronale è controllata dagli endocannabinoidi (eCBs) attraverso l'azione sui recettori CB_1 (CB_1Rs rappresentati dagli ovali verdi). Le frecce indicano il possibile coinvolgimento degli eCB nel processo di specificazione. Le frecce circolari invece si riferiscono ad un probabile meccanismo cellulare autonomo di regolazione del rilascio degli eCB. I punti interrogativi si riferiscono invece a dati che suggeriscono il possibile coinvolgimento di altri recettori sensibili ai cannabinoidi (CB_2R, GPR55) durante alcuni stadi dello sviluppo neuronale (Harkany et al. 2008).

sce uno specifico coinvolgimento del sistema endocannabinoide nello sviluppo cerebrale; esso sarebbe implicato in processi del neurosviluppo come la proliferazione, la migrazione, e la genesi delle sinapsi delle cellule nervose (Berghuis et al. 2005, 2007, Fernandez-Ruiz et al. 2000, Galve-Roperh et al. 2007, Harkany et al. 2008, Watson et al. 2008). Inoltre, la presenza dei recettori cannabinoidi CB_1 durante lo sviluppo cerebrale è stato associato ad effetti neuroprotettivi nella maturazione del SNC e delle sue funzioni (Fernandez-Ruiz et al. 2000, Fride 2004).

Recentemente è stato dimostrato che il sistema endocannabinoide aiuta lo stabilirsi di connessioni di assoni a lunga distanza (Mulder et al. 2008) e agisce come indicazione di orientamento degli assoni locali per gli interneuroni GABAergici nel cervello in fase di sviluppo (Berghuis et al. 2005, 2007).

La densità dei recettori CB_1 (Rodriguez de Fonseca et al. 1993, McLaughlin & Abood 1993) aumentano progressivamente durante lo sviluppo postnatale, con il picco poco prima dell'inizio della pubertà. I livelli del recettore cannabinoide CB_1, in seguito, diminuiscono fino a raggiungere i valori adulti (Rodriguez de Fonseca et al. 1993).

CONCLUSIONI

In conclusione, con il termine "sistema endocannabinoide" si intende un complesso insieme di ligandi, recettori, enzimi e trasportatori che svolgono molteplici funzioni nel sistema nervoso centrale e periferico, nonché in periferia. La specifica e peculiare azione di regolazione retrograda svolta da questo sistema è estremamente importante per il mantenimento di una equilibrata attivazione neuronale.

Infine, l'importante ruolo da esso svolto durante lo sviluppo neuronale, suggerisce chiaramente come una eventuale perturbazione del sistema cannabinoide endogeno, ad esempio attraverso l'utilizzo di fitocannabinoidi, possa influire in modo anche drammatico sul sistema nervoso durante lo sviluppo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. Prog Neurobiol. 1999; 58:315-348.
2. Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ. Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. Eur J Pharmacol. 2006;539:177-183.
3. Begbie J, Doherty P, Graham A (2004) Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo. J Anat 205:213-218.
4. Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D., 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science 277, 1094-1097.
5. Berghuis, P. et al. (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 19115-19120.
6. Berghuis P, Rajnicek AM, Morozov YM, Ross RA, Mulder J, Urbán GM, Monory K, Marsicano G, Matteoli M, Canty A, Irving AJ, Katona I, Yanagawa Y, Rakic P, Lutz B, Mackie K, Harkany T. Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity. Science. 2007 May 25;316 (5828):1212-6.
7. Berrendero .F, Sepe N., Ramos JA., Di Marzo V., Fernandez-Ruiz JJ. (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. Synapse 33:181-191.
8. Biegon A., Kerman I.A. (2001) Autoradiographic study of pre- and postnatal distribution of cannabinoid receptors in human brain. Neuroimage 14:1463-1468.
9. Buckley N.E., Hansson S., Harta G., Mezey E. (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. Neuroscience 82:1131-1149.
10. Chevaleyre, V., Takahashi, K.A., Castillo, P.E., 2006. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. Annu. Rev. Neurosci. 29, 37-76.
11. Correa F., Mestre L., Molina-Holgado E., et al. The role of cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. Mini Rev Med Chem. 2005;5:671-675.
12. Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature 384, 83-87.
13. De Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. Brain Res. 2006;1075:60-67.
14. De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. Br J Pharmacol. 2004;141:765-774.
15. Devane WA, Manus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science. 1992;258:1946-1949.
16. Di Marzo V, Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. Trends Neurosci. 1998;21:521-528.
17. Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 10819-10824.
18. Fernandez-Ruiz J., Berrendero F., Hernandez M.L., Ramos J.A. (2000) The endogenous cannabinoid system and brain development. Trends Neurosci. 23, 14-20.
19. Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol. Rev. 83, 1017-1066.
20. Fride E. The endocannabinoid-CB(1) receptor system in pre- and postnatal life. Eur J Pharmacol. 2004 Oct 1;500(1-3):289-97. Review.
21. Galve-Roperh I, Aguado T, Palazuelos J, Guzman M, 2007. The endocannabinoide system and neurogenesis in health and disease. Neuroscientist 13, 109-114.
22. Gerard C.M., Mollereau C., Vassart G., Parmentier M. (1991) Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. Biochem J 279(Pt 1):129-134.
23. Glass M., Dragnunow M., Faull R.L. (1997) Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. Neurosci 77:299-318.
24. Goparaju, S.K., Ueda, N., Taniguchi, K., Yamamoto, S., 1999. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. Biochem. Pharmacol. 57, 417-423.
25. Griffin G., Tao Q., Abood M.E. (2000) Cloning and pharmacological characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. J Pharmacol Exp Ther 292:886-894.
26. Guindon J, De Lean A, Beaulieu P. Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. Pain. 2006;121:85-93.
27. Guzmàn M. Cannabinoids: potential anticancer agents. Nature Reviews Cancer 3, 745-755 (2003)
28. Harkany T., Keimpema E., Barabàs K., Mulder J. (2008) Endocannabinoid functions controlling neuronal specification during brain development. Molecular and Cellular Endocrinology 2865 584-590.
29. Herkenham M, Lynn A, Little M, Johnson M, Melvin L, De Costa B, Rice K (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci USA 87:1932.
30. Hillard CJ, Wilkison DM, Edgemond WS, Campbell WB. Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. Biochim Biophys Acta. 1995 Aug 3;1257(3):249-56.
31. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev 2002;54(2):161-202.
32. Idris AI, van 't Hof RJ, Greig IR, et al. Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. Nat Med. 2005;11:774-779.
33. Lauckner J.E., Jensen J.B., Chen H.Y., Lu H.C., Hille B., Mackie K. (2008) GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. Proc Natl Acad Sci USA 105:2699-2704.

34. Mackie, K., 2006. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. Int. J. Obes. (Lond). 30 (Suppl. 1), S19-S23.
35. Mackie, K. Signaling via CNS Cannabinoid Receptors. Mol Cell Endocrinol. 2008 April 16; 286(1-2): S60-S65.
36. Mailleux P, Parmentier M, Vanderhaeghen JJ (1992) Distribution of caabinoid receptor messenger RNA in the human brain: an in situ hybridization histochemistry with oligonucleotides. Neurosci Lett 143:200-204.
37. Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346: 561-564.
38. McLaughlin CR, Abood ME. Developmental expression of cannabinoid receptor mRNA. Brain Res Dev Brain Res. 1993 Nov 19;76(1):75-8.
39. McPartland JM, Matias I, Di Marzo V, Glass M. Evolutionary origins of the endocannabinoid system. Gene. 2006;370:64-74.
40. Mikics E, Dombi T, Barsvari B, et al. The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. Behav Pharmacol. 2006;17:223-230.
41. Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzman M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. Proc Natl Acad Sci USA 105:8760-8765.
42. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature 365, 61-65.
43. Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. J Neurosci Res. 1998 Feb 1;51(3):391-402.
44. Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xiang-Qun Xie, Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. PNAS May 11, 1999 vol. 96 no. 10 5802-5807.
45. Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat. Rev. Neurosci. 4, 873-884.
46. Rodríguez de Fonseca F, Ramos JA, Bonnin A, Fernández-Ruiz JJ. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. Neuroreport. 1993 Feb;4(2):135-8.
47. Romero J, Garcia-Palomero E, Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1997) Atypical location of cannabinoid receptors in white matter areas during rat brain development. Synapse 26:317-323.
48. Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol. 2007 Dec;152(7):984-6.
49. Szabo, B., Schlicker, E., 2005. Effects of cannabinoids on neurotransmission. Handb. Exp. Pharmacol. 327-365.
50. Trezza V., Cuomo V., Vanderschuren L.J.M.J (2008) Cannabis and the developing brain: Insights from behaviour. European Journal of Pharmacology 585 441-452.
51. Ueda, N., Kurahashi, Y., Yamamoto, S., Tokunaga, T., 1995. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. J. Biol. Chem. 270, 23823-23827.
52. Van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. Neuromolecular Med. 2005;7:37-50.
53. Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science. 2005 Oct 14;310(5746):329-32.
54. Wang H, Dey SK, Maccarrone M. Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. Endocr Rev. 2006;27:427-448.
55. Wang X, Dow-Edwards D, Keller E, Hurd YL (2003) Preferential limbic expression of the cannabinoid receptor mRNA in the human fetal brain. Neuroscience 118:681-694.
56. Watson S,Chambers D, Hobbs C, Doherty P, Graham A. The cannabinoid receptor, CB1, is required for normal axonal growth and fasciculation. Molecular and Cellular Neuroscience. Volume 38, Issue 1, May 2008, Pages 89-97.
57. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid Signaling in the Brain. Science 26 April 2002: Vol. 296. no. 5568, pp. 678-682.