

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA in SCIENZA DEL FARMACO XVIII CICLO

Alessia Ligresti

***Endocannabinoidi e Fitocannabinoidi
nel Cancro***

Relatore: *Prof. Luciano Mayol*

Coordinatore: *Prof. Enrico Abignente*

Tutore: *Dott. Vincenzo Di Marzo*

Supervisore: *Dott.ssa Tiziana Bisogno*

Tesi per il Conseguimento del Titolo

A Salvatore

...tayw

Somewhere, something incredible is waiting to be known.

Blaise Pascal (1623-1662)

Indice

Indice	4
Abbreviazioni usate	8
Indice delle figure.....	11
Indice delle tabelle.....	14
Premessa.....	16
Introduzione.....	18
Cenni storici	19
Tassonomia e Morfologia.....	22
Composizione chimica	24
La scoperta del sistema endocannabinoide	27
Il sistema endocannabinoide: aspetti biochimici e molecolari.....	30
Gli inibitori del catabolismo dell’anandamide	40
L’anandamide ed il recettore dei vanilloidi.....	43
Effetti terapeutici.....	44
Le cellule tumorali e l’insorgenza del cancro	48
Cannabinoidi ed Endocannabinoidi nel Cancro	50
Meccanismi dell’azione antitumorale degli endocannabinoidi.....	53
Scopo della tesi.....	59
Materiali e Metodi	61
Biopsie.....	62
Determinazione dei livelli endogeni degli endocannabinoidi	62
Test di antiproliferazione cellulare.....	63
Differenziamento cellulare: test di attività della saccarasi.....	64
Determinazione della popolazione cellulare apoptotica.....	64
Analisi tumorogena: modelli in vivo per l’induzione di tumori su topi atimici.....	65

Reazione a catena della DNA polimerasi (RT- PCR)	66
Western Immunoblotting	67
Saggio di attività del recettore dei vanilloidi.....	68
Saggi sul catabolismo dell'anandamide: Uptake Cellulare e Idrolisi Enzimatica..	69
Saggi di binding.....	70
Risultati I	71
Espressione del sistema endocannabinoide e livelli endogeni di endocannabinoidi nel carcinoma coloretale.....	72
Effetto degli endocannabinoidi sulla proliferazione cellulare.....	76
Effetto degli inibitori del catabolismo sulla proliferazione cellulare delle CaCo-2	80
Effetto degli inibitori del catabolismo degli endocannabinoidi in un modello animale di tumore della tiroide.....	84
Risultati II.....	87
Effetto antiproliferativo su varie linee cellulari tumorali di fitocannabinoidi ed estratti di Cannabis	88
Studi sul meccanismo d'azione cellulare	92
Studi sul meccanismo d'azione molecolare	94
Effetto del CBD sullo stress ossidativo.....	97
Effetto antitumorale degli estratti di Cannabis in due modelli animali di tumore	101
Discussione.....	104
Conclusioni.....	117
Bibliografia.....	120
Pubblicazioni	142
Curriculum Vitae.....	147

Ringraziamenti	149
----------------------	-----

Abbreviazioni usate

AA = acido arachidonico

AA-5HT = arachidonoil 5-idrossi-triptamina; arachidonoil-serotonina

AC = adenilato ciclastasi

AEA = anandamide

2-AG = 2-arachidonoil-glicerolo

CBC = cannabiromene

CBD = cannabidiolo

CBD-rich= estratto di Cannabis arricchito in CBD

CBG = cannabigerolo

CBN = cannabinolo

COX-2 = ciclo-ossigenasi 2

DAG = diacilglicerolo

EC = endocannabinoidi

FAAH = fatty acid amide hydrolase

GAPDH = gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi

LIPOX = lipo-ossigenasi

MAGL= monoacilglicerololipasi

MAPK = proteina chinasi mitogeno-attivata

Met-F-AEA = 2-metil-fluoro-anandamide

NADA = N-arachidonoil-dopamina

NAPE = N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamina

NAr-lysoPE = N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamina

3-NPA = acido 3-nitropropionico

PA = acido fosfatidico

PE = fosfatidil-etanolamina

PLA = fosfolipasi tipo A

PLC = fosfolipasi tipo C

PLD = fosfolipasi tipo D

PMSF = fenil-metil-sulfonil-fluoruro

ROS = Reactive Oxygen Species

THC = tetraidrocannabinolo

THC-rich = estratto di Cannabis arricchito in THC

Indice delle figure

- Fig. 1 Antica dispensa universitaria.....21
- Fig. 2 anatomia e Tassonomia della Cannabis.....22
- Fig. 3 Strutture chimiche di alcuni cannabinoidi.....26
- Fig. 4 Strutture chimiche degli endocannabinoidi.....32
- Fig. 5 Principali vie biosintetiche dell'AEA.....33
- Fig. 6 Principali vie biosintetiche del 2-AG.....35
- Fig. 7 Principali vie metaboliche degli endocannabinoidi.....37
- Fig. 8 Le vie metaboliche ossidative.....39
- Fig.9 Principali meccanismi attraverso cui gli endocannabinoidi esercitano il loro effetto antitumorale.....58
- Fig. 10 Livelli endogeni di AEA e 2-AG in tessuti umani coloretali.....72
- Fig.11 Espressione di CB₁, CB₂ e FAAH in tessuti umani.....73
- Fig. 12 Espressione di CB₁, CB₂ e FAAH nelle CaCo-2 e nelle DLD-1.....74
- Fig. 13 Time course dell'attività saccarasica in funzione della crescita delle CaCo-2.....76
- Fig. 14 Effetto di alcuni agonisti dei recettori cannabici sulla proliferazione di CACo-2 indifferenziate.....79
- Fig. 15 Effetto degli antagonisti dei recettori cannabici sull'azione antiproliferativa di AEA, HU-210 e NADA.....80
- Fig. 16 Effetto di alcuni inibitori selettivi sul metabolismo e sulla proliferazione di CaCo-2 indifferenziate.....82
- Fig. 17 Effetto di alcuni inibitori selettivi del catabolismo sui livelli endogeni degli endocannabinoidi.....83
- Fig. 18 Effetto antitumorale di Met-F-AEA (AEA), AA-5HT, VDM11.....85

- Fig. 19 Effetto del VDM11 (5mg/kg) e di AA-5HT (5mg/kg) sui livelli endogeni di AEA, 2-AG, PEA.....86
- Fig. 20 Effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione delle MCF-7.....90
- Fig. 21 Effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione delle C6.....91
- Fig. 22 Effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione DU-145.....91
- Fig. 23 Attivazione delle Caspasi-3.....93
- Fig. 24 Effetto dei cannabinoidi sull'attivazione del TRPV1.....94
- Fig. 25 Effetto antiproliferativo del CBD sulle cellule MDA-MB-231 in presenza di antagonisti.....96
- Fig. 26 Effetto antiproliferativo del CBD sulle MDA-MB-231 in presenza di antiossidanti.....99
- Fig. 27 Effetto antiossidante del CBD in condizioni di stress ossidativo....100
- Fig. 28 Effetto antitumorale di CBD e CBD rich su tumori indotti in topi nudi con inoculo sottocutaneo di cellule KiMol.....102
- Fig. 29 Effetto antitumorale di THC e THC rich su tumori indotti in topi nudi con inoculo sottocutaneo di cellule KiMol.....103

Indice delle tabelle

- Tabella 1 Classificazione scientifica.....24
- Tabella 2 Livelli endogeni di AEA e 2-AG in CaCo-2 cell.....75
- Tabella 3 Effetto di alcuni (endo)cannabinoidi e di un inibitore della COX-2 sulla proliferazione cellulare di adenocarcinoma di colon.....77
- Tabella 4 Screening dei cannabinoidi sulla proliferazione di diverse linee cellulari di tumore.....89
- Tabella 5 Apoptosi.....92
- Tabella 6 Trascritti PCR.....95

Premessa

Il termine cancro, comunemente utilizzato per indicare un'unica patologia, individua un insieme di malattie con cause diverse, che colpiscono organi e tessuti differenti e che richiedono, quindi, soluzioni terapeutiche *ad hoc*. La neoplasia, caratteristica comune a tutti i tumori, suggerisce, però, di ricercare soluzioni trasversali alle diverse forme di cancro.

Il mio lavoro di Dottorato, partendo da tale presupposto, è stato incentrato sullo studio di molecole segnale, i ligandi endogeni dei recettori dei cannabinoidi, e di alcuni cannabinoidi di origine vegetale, con l'obiettivo di comprenderne l'effetto sullo sviluppo e sulla progressione di diversi tipi di tumore. In particolare è stato analizzato il coinvolgimento degli endocannabinoidi nello sviluppo del cancro coloretale, e sono stati valutati gli effetti di alcuni cannabinoidi da Cannabis su linee cellulari di diversa origine tumorale, esaminandone i possibili meccanismi d'azione.

Tale lavoro è stato svolto presso l'Endocannabinoid Research Group dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Pozzuoli (Napoli). Tutti i cannabinoidi e gli estratti derivati dalla Cannabis sono stati forniti dalla GW Pharmaceutical, Salisbury, United Kingdom.

Introduzione

Cenni storici

L'inizio dell'uso medicinale della *Cannabis* si perde nella notte dei tempi. Il *Pen T'sao Ching*, che è il più antico testo cinese sulle piante medicinali (3000 a.C.), la consiglia nelle situazioni caratterizzate da una diminuzione di *yin* (la parte femminile di tutte le cose), quale rimedio nel trattamento di: disordini femminili, gotta, reumatismo, malaria, stipsi e debolezza mentale. In epoche successive, le indicazioni terapeutiche furono estese anche alla cicatrizzazione delle ferite, all'eliminazione del pus e alla riduzione della febbre e dell'ansia. Testimonianze del suo uso si ritrovano anche in India dove, nel testo sacro *Atharvaveda* (1000 a.C.), la *Cannabis* è indicata per il trattamento di disturbi di varia natura quali dissenteria, inappetenza, per facilitare la digestione e “*per rendere corpo e mente più pronti e vivaci*”. Un recente studio dei Testi Sacri, riportato da Chris Bennett su *High Times* (una rivista americana specializzata in droghe), sembrerebbe indicare la *Cannabis* come il rimedio alla base di molti dei miracoli narrati nel Nuovo Testamento. Secondo tale studio, ufficialmente rinnegato dalle organizzazioni cattoliche, l'olio utilizzato da Cristo e dai suoi Apostoli sarebbe stato impregnato di estratti di marijuana. In epoche più recenti ritroviamo la *Cannabis* segnalata in testi assiri, egiziani, persiani e greco-romani. La *Materia medica* di Discoride (erbario scritto nel 70 d.C.), infatti, contiene la prima raffigurazione della pianta e ne raccomanda l'uso in caso di mal d'orecchi, edemi o itterizia; le stesse indicazioni venivano indicate anche da Galeno nel 100 d.C. Nel XII secolo, il clima di terrore sfociato nei tribunali dell'Inquisizione, colpì duramente la cultura e l'uso della *Cannabis* al punto tale che sia in Spagna che in Francia fu vietato ogni uso della pianta, anche quello medicinale. In tale clima si inserisce l'imputazione a Giovanna d'Arco che fu

accusata di usare ogni tipo di “*erba diabolica, compresa la Cannabis*”, per i suoi rituali di stregoneria. La repressione ecclesiastica non riuscì ad impedire la diffusione della canapa nel nord Europa dove, le estese coltivazioni in Romania, Cecoslovacchia e Ungheria da una parte, Irlanda e Inghilterra dall'altra, garantivano l'uso e la diffusione dei suoi derivati in tutto il mondo. La definitiva comparsa della Cannabis, in Europa, risale a circa 2500 anni fa quando il suo utilizzo si basava su ricette derivate dalla tradizione e dalla medicina popolare, anche se l'interesse dei medici europei si destò solo dopo l'occupazione napoleonica in Egitto (1798) poiché, al rientro delle truppe, cominciarono a diffondersi numerosi racconti sui suoi innumerevoli effetti benefici.

Nel corso del XIX secolo la medicina occidentale la adottò ufficialmente come farmaco per la sua efficacia antiemetica, analgesica e anticonvulsiva, perfino il medico ufficiale della Regina Vittoria la prescriveva alla sua paziente per il trattamento della dismenorrea. Ci fu, in quegli anni, un fiorire di studi scientifici sugli impieghi terapeutici e preparati a base di *Cannabis* cominciarono a trovarsi sugli scaffali della gran parte delle farmacie, in Europa come negli USA. Agli inizi del XX secolo, dapprima negli USA e a seguire in Europa, una serie di circostanze storico-politiche determinarono un'inversione di tendenza nei riguardi dell'entusiasmo che sino ad allora aveva accompagnato l'utilizzo della *Cannabis*. La diffusione dell'uso, a scopo ricreativo, tra gli afroamericani, messicani, musicisti jazz, assieme allo spostarsi degli interessi dell'industria farmaceutica verso i derivati dell'oppio come anticonvulsivi e antidolorifici e verso sostanze sintetiche quali aspirina e barbiturici, scatenò un'ossessiva campagna di stampa contro la *Cannabis* che portò alla progressiva messa al bando del suo uso, sino alla sua cancellazione, nel 1942, dalla U.S. Pharmacopeia (la *Marijuana Tax Act* impediva sia l'uso che la

coltivazione della canapa). In Italia l'uso medico della canapa fu citato per la prima volta dal medico Nicola Porta del manicomio di Aversa (Annali, vol.CLXVII, 1858), ma fu il Professor Raffaele Velieri, primario dell'Ospedale degli Incurabili a Napoli che la adoperò diffusamente e ne raccomandò l'uso medico a tal punto che nel XIX secolo alcuni ricercatori, tra i quali Carlo Erba, cominciarono, anche in Italia, alcuni studi pionieristici sulla *Cannabis*. In seguito, l'avvento del regime fascista portò alla messa al bando dell'hashish "*nemico della razza*" e "*droga da negri*", dando così l'avvio ad una campagna dispregiativa contro una sostanza che solo allora, nel nostro Paese, cominciava ad essere usata a scopo di ricerca.

Negli ultimi decenni del secolo scorso si è assistito ad un ritorno d'interesse del mondo scientifico nei confronti della *Cannabis*. Nel 1964 un gruppo di ricercatori israeliani è riuscito ad isolare e sintetizzare il delta-9-tetraidroacannabinolo (Δ^9 -THC), il più potente tra i numerosi principi attivi presenti nella *Cannabis* (Gaoni and Mechoulam, 1971). Più recentemente, nel 1988, alcuni ricercatori scoprirono la presenza nel corpo umano di un recettore di membrana capace di essere attivato dal THC (Devane et al., 1988). Tali scoperte hanno aperto nuovi orizzonti ad un possibile uso terapeutico della *Cannabis sativa*. (Fig. 1).



Tassonomia e Morfologia

La Canapa è una pianta erbacea a ciclo annuale il cui nome scientifico è *Cannabis sativa*. Fu classificata con questo nome già nella seconda metà del 1700 da Carlo Linneo, il celebre scienziato inventore del sistema di classificazione binario (**Tabella 1**). Può raggiungere i 2 metri di altezza, ha stelo dritto con foglie opposte formate da 5, 7, 9 fino a 11 punte. Presenta una lunga radice a fittone e un fusto eretto o ramificato, con escrescenze resinose, angolate e a volte cave (**Fig. 2**). Le foglie sono



Fig. 2: *Anatomia e Tassonomia della Cannabis Sativa.*

picciolate e provviste di stipole, ciascuna è palmata, composta da 5 a 13 foglioline lanceolate, a margine dentato-seghettato, con punte acuminate fino a 10 cm di lunghezza ed 1,5 di larghezza. Salvo rari casi di ermafroditismo, le piante sono dioiche e i fiori unisessuali crescono su individui di sesso diverso. I fiori negli individui maschili (staminiferi) sono disposti in pannocchie terminali, mentre

negli individui femminili (pistilliferi) sono disposti in agglomerati di infiorescenze compatte, ognuno mostra un calice membranaceo che avvolge strettamente un ovario supero ed uniloculare, sormontato da due stili e due stimmi. E' soprattutto in queste infiorescenze degli individui femminili che il più noto dei principi attivi della marijuana (il THC) è concentrato. La pianta germina in primavera e fiorisce in estate inoltrata. L'impollinazione è anemofila (si serve del trasporto tramite il vento). I

frutti compaiono in autunno come acheni duri e globosi che al loro interno trattengono un seme formato da un endosperma carnoso ed un embrione curvo.

Da un punto di vista botanico la Canapa si presenta però in molte varietà e vi è una controversia sulla sua classificazione tassonomica. Secondo la tassonomia ufficiale moderna, la *Cannabis* va inclusa nella famiglia delle Cannabaceae, insieme al luppolo, dopo essere stata inserita prima tra le Moracee e in seguito tra le Urticacee.

La classificazione di D. E. Janichewsky, che risale al 1924, prevede l'esistenza di tre differenti specie di piante: la *C. sativa*, la *C. indica* e la *C. ruderalis*. Esiste però una classificazione alternativa, proposta da Small e da Cronquist nel 1976, che sostiene l'esistenza di una sola specie, la *Canapa sativa*, che si presenta in due sottospecie. Entrambe le sottospecie avrebbero poi numerose varianti selvatiche e domestiche secondo il luogo e il tipo di coltivazione. A parte le controversie nominalistiche e dei tecnicismi tassonomici, in pratica accanto alla Canapa sativa tipica di America e Europa, ampiamente coltivata fino agli inizi del '900 e caratterizzata da una bassa concentrazione di THC, si deve ricordare soprattutto la Canapa indica. Quest'ultima cresce spontaneamente nei paesi del sud, raggiunge il metro ed è ricchissima di resina e di principio attivo (è da questa specie che si ottengono l'hashish e la marijuana utilizzati per scopi ricreativi).

Anche della Canapa indica esistono numerosissime varietà. Tali precisazioni sono necessarie perché dalla Canapa non si ricavano soltanto delle droghe, ma esistono e storicamente sono sempre esistiti numerosi e importanti altri derivati di questa pianta da cui si ottengono (in realtà si ottenevano abbondantemente in passato) tessuti, carta, alimenti per animali ed oli. Proprio a causa della differente destinazione dei suoi derivati da una parte per la produzione delle droghe e dall'altra per un uso tessile

e industriale della *Canapa sativa*, le due piante sono state spesso considerate come specie differenti.

Regno: Plantae
Divisione: Magnoliophyta
Classe: Magnoliopsida
Ordine: Urticales
Famiglia: Cannabaceae
Genere: Cannabis

Tabella 1: *Classificazione scientifica.*

Composizione chimica

La *Cannabis* contiene più di 400 composti chimici, 66 dei quali sono stati identificati come cannabinoidi. Originariamente, con il termine *cannabinoidi*, si indicavano tutti i fitocomposti della *Cannabis* e i loro metaboliti, ovvero tutte quelle molecole che possedevano la classica struttura a 21 atomi di C (Razdan, 1986). Tale definizione fu subito abbandonata perché troppo “farmacognostica” e fu adottata una terminologia che tenesse prevalentemente conto dell’aspetto farmacologico e della struttura chimica. Oggi con il termine *cannabinoidi* solitamente vengono indicati non solo i cannabinoidi da pianta, siano essi psicoattivi e non, ma anche tutti i ligandi dei recettori cannabici, cioè quelli di origine vegetale, ma anche le molecole endogene e alcune molecole di origine sintetica. Queste molecole vengono denominate, rispettivamente, fitocannabinoidi, endocannabinoidi e “cannabinoidi classici” (per distinguerli da molecole sintetiche, quali alcuni amminoalchilindoli, con struttura

non cannabinoide ma ancora in grado di attivare i recettori cannabici). La struttura chimica dei fitocannabinoidi può essere descritta come quella di un terpene unito ad un resorcinolo a sostituzione alchilica, oppure come quella di un sistema ad anello benzopiranic. Le due descrizioni implicano anche una nomenclatura differente, con la prima il principale cannabinoide viene definito come delta-1-THC mentre con la seconda diventa delta-9-THC (per entrambe, d'ora in poi, si utilizzerà il termine THC) (**Fig. 3**).

I fitocannabinoidi finora riscontrati si possono dividere in differenti “tipi” chimici (tra parentesi sono riportate l'abbreviazione e il numero di composti per tipo):

- Tipo cannabigerolo (CBG; 6)
- Tipo cannabicromene (CBC; 5)
- Tipo cannabidiolo (CBD; 7)
- Tipo delta-9-THC (D-9-THC; 9)
- Tipo cannabinolo (CBN; 1)

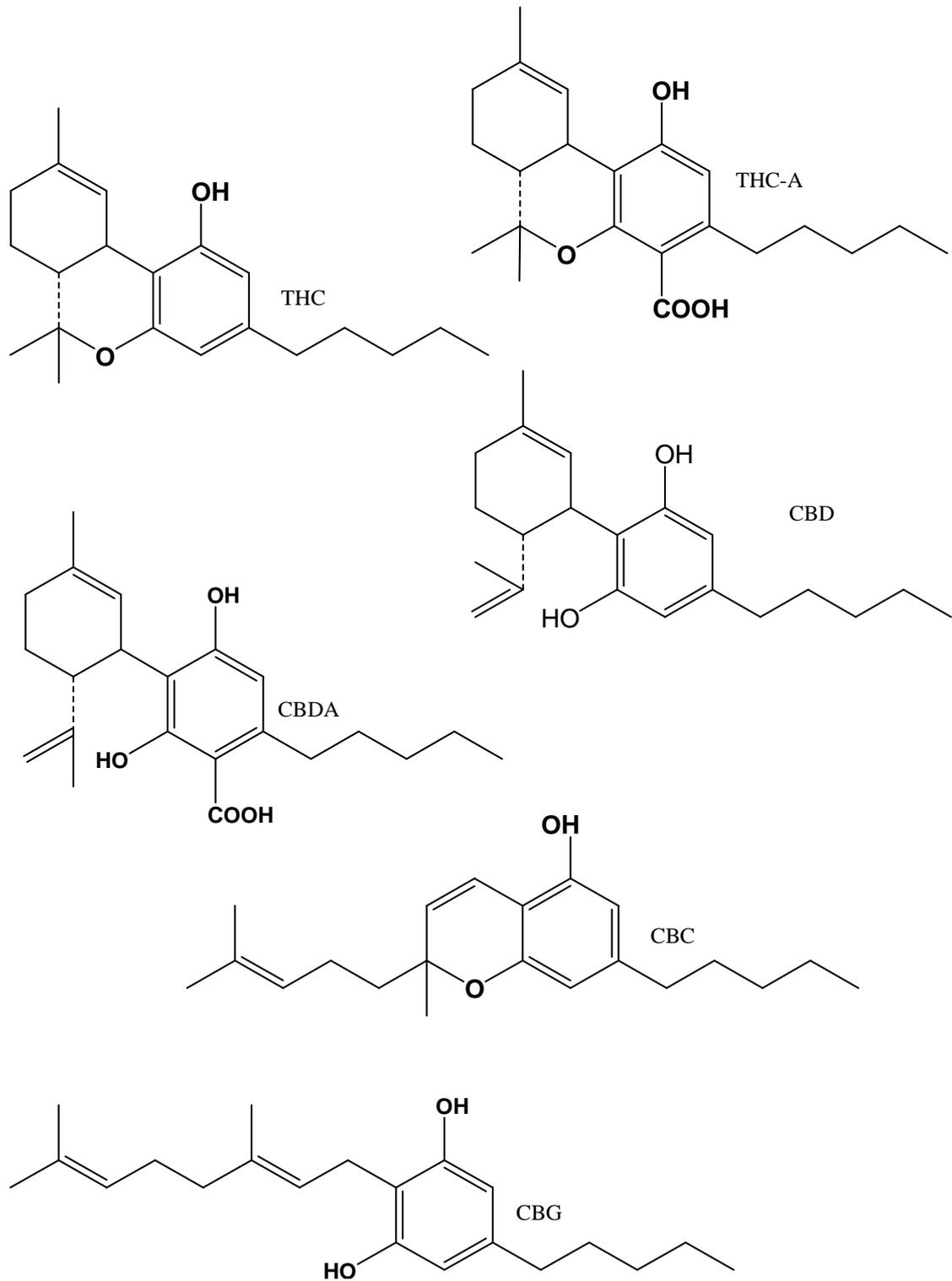


Fig. 3: *Strutture chimiche di alcuni cannabinoidi.*

La scoperta del sistema endocannabinoide

La caratterizzazione chimica del THC da parte di Gaoni e Mechoulam nel 1964 aveva consentito una serie di importanti chiarificazioni soprattutto riguardo il suo meccanismo d'azione. Inizialmente, infatti, si era erroneamente ritenuto che il THC, essendo una molecola lipofila, interagisse in maniera aspecifica con le membrane cellulari, anche se, la necessità di un determinato enantiomero e di ben precise caratteristiche strutturali per la sua attività, lasciava già intuire l'esistenza di specifici target recettoriali. La scoperta del recettore dei cannabinoidi fu un evento del tutto casuale perché avvenne nel corso di un accurato screening del DNA di ratto per individuare i geni dei recettori per le neurochinine. In quella occasione, infatti, fu rinvenuto un recettore "orfano di ligando", la cui distribuzione cerebrale coincideva con un noto ligando cannabinoide radiomarcato ($[^3\text{H}]\text{-CP-55.940}$). Il sospetto che si trattava del recettore per i cannabinoidi, fu confermato definitivamente nel 1988, quando, successive indagini decretarono che quel recettore isolato nel cervello di ratto, era effettivamente lo specifico recettore attraverso cui i cannabinoidi mediavano gli effetti farmacologici e comportamentali (Devane et al., 1988). Questo recettore fu battezzato CB_1 , perché, poco dopo, fu individuato un secondo recettore, CB_2 , che spiegava gli effetti immunosoppressivi che i derivati della cannabis presentavano nel sistema immunitario.

In seguito, i due sottotipi recettoriali furono meglio caratterizzati: il recettore CB_1 è stato clonato nel 1990 (Matsuda et al., 1990) mentre il recettore CB_2 è stato clonato nel 1993 (Munro et al., 1993). Sebbene, di recente, sia stata prospettata l'esistenza di un terzo tipo recettoriale (CB_3), tale ipotesi non è stata ancora dimostrata in maniera conclusiva (Fride et al., 2003). I due sottotipi recettoriali clonati (CB_1 e CB_2) appartengono alla famiglia dei recettori di membrana accoppiati a proteine G; come

tali, quindi, presentano un'unica catena polipeptidica che attraversa per sette volte la membrana plasmatica. La sequenza amminoacidica ha il terminale amminico, con i siti di glicosilazione, sul versante extracellulare ed il terminale carbossilico, con i siti di fosforilazione, sul versante intracellulare. Oltre ai sette domini transmembrana, sono presenti anche 3 loops intracellulari e 3 loops extracellulari. Recenti studi hanno rivelato che ligandi quali l'*N*-arachidonoiletanolamina (AEA, vedi sotto), raggiungono i siti di legame del recettore CB₁ in una conformazione "distesa", con la porzione etanolamminica a livello delle teste polari dei fosfolipidi di membrana e il suo gruppo metilico terminale all'interno del bilayer. Diffondendo lateralmente ad uno dei due strati della membrana, l'AEA interagisce con una tasca idrofobica formata dalle eliche 3 e 6 collocandosi vicino al residuo cisteinico sull'elica 6 che permette la successiva attivazione del recettore (Tian et al., 2005). I recettori dei cannabinoidi (CB₁ e CB₂) presentano un'omologia di struttura del 44% che arriva al 68% quando si considerano i soli domini transmembrana.

Entrambi i recettori sono accoppiati a proteine G del tipo G_{i/o}, essendo in grado di inibire l'adenilato ciclasi (AC) e di attivare le proteine chinasi mitogeno-attivate (MAPK) (Pertwee, 2002a). L'attivazione dei CB₁ è in grado anche di inibire i canali del Ca⁺⁺ voltaggio dipendente, sia di tipo N/Q (Mackie et al., 1992) che di tipo L (Gebremedhin et al., 1999), mentre ha effetto opposto sui canali del potassio di tipo A e del tipo *inwardly rectifying* (Mackie et al., 1995). L'attivazione del CB₁ può inoltre stimolare direttamente il rilascio di ossido nitrico (NO) (Stefano et al., 2000). In alcuni casi, l'attivazione del CB₁ stimola la fosfolipasi C, indicando quindi un suo accoppiamento con proteine del tipo G_q o G_s (Howlett, 2004).

Recentemente è stato riportata per il CB₁ una diversa ubicazione nella cellula. Secondo tale studio, una linea cellulare di carcinoma della mammella esprime il

recettore non solo a livello della membrana plasmatica, ma anche a livello dei lisosomi, tale espressione sembrerebbe legata alla presenza di alcuni domini lipidici, i lipid rafts (Sarnataro et al., 2005).

Per quel che riguarda la distribuzione recettoriale, bisogna ricordare che il recettore CB₁ presenta un'ampia distribuzione essendo abbondantemente espresso nel sistema nervoso (sia centrale che periferico), ma anche, ad es., nei tessuti riproduttivi (gonadi e testicoli), negli occhi, nei tessuti del tratto gastrointestinale, nel fegato, nel cuore, nei polmoni, nella vescica e nel surrene. A livello del sistema nervoso centrale, il CB₁ è molto abbondante soprattutto a livello dell'ippocampo, dei gangli della base, del cervelletto e del bulbo olfattivo dove la sua distribuzione è del tutto coerente con gli effetti del THC osservati sull'attività locomotoria, sulla coordinazione motoria, sulla postura, sulla memoria e sull'apprendimento. A livello del sistema nervoso periferico, il CB₁ è stato trovato nelle fibre periferiche sensoriali e autosomiche (negli interneuroni spinali della radice dorsale dei gangli, nei neuroni mienterici, nelle fibre pre-giunzionali della vescica e nelle fibre simpatiche dei gangli cervicali superiori) in perfetto accordo con alcuni degli effetti riportati sulla nocicezione e sulle funzioni del tratto vascolare e gastrointestinale (Farquhar-Smith et al., 2000; Pertwee et al., 1999). Il recettore CB₂ invece, almeno in condizioni fisiologiche, risulta essere molto più abbondante nel sistema immunitario (mastociti, cellule B, linfociti T) dove è implicato nel controllo della risposta immunitaria sia umorale che cellulare (Parolaro, 1999; Klein et al., 2003).

La rivelazione dell'esistenza di specifici recettori per il THC fu prontamente seguita dalla spasmodica ricerca dei ligandi endogeni per tali proteine (gli endocannabinoidi, EC).

Il sistema endocannabinoide: aspetti biochimici e molecolari

Alla scoperta del recettore CB₁ ha fatto seguito, nel 1992, l'isolamento, dal cervello di maiale, del primo metabolita endogeno in grado di legarsi selettivamente a tale proteina. Si trattava dell'ammide tra due elementi ubiquitari delle membrane cellulari animali quali l'acido arachidonico e l'etanolamina, tale molecola, l'*N*-arachidonoiletanolamina (AEA), fu chiamata anandamide dalla parola Sanscrita *ananda* (beatitudine, stato di grazia) (Devane et al., 1992). Mentre il ruolo delle etanolammidi degli acidi grassi nel cervello continuava ad essere approfondito (Hanus et al., 1993), un'altro tipo di molecola, appartenente alla classe degli intermedi metabolici noti come monoacilgliceroli, fu identificata nei tessuti periferici e proposta come ligando del recettore CB₂: il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG). AEA e 2-AG sono stati i primi due EC ad essere identificati e sono pertanto i ligandi endogeni meglio conosciuti. L'AEA è in grado di legare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi come un agonista parziale (Burkey et al., 1997; Glass et al., 1999); anche il 2-AG è in grado di attivare entrambi i sottotipi recettoriali comportandosi però come un agonista pieno (Mechoulam et al., 1995). Di recente sono stati individuati altri ligandi endogeni in grado di legare e di attivare i recettori cannabici: il 2-arachidonoilgliceriletere (2-AGE, noladin), un analogo etero del 2-AG che si comporta da agonista sia sul CB₁ che sul CB₂ con una maggiore affinità per il CB₁ (Hanus et al., 2001); la *O*-arachidonoiletanolamina (virodammina), una molecola dove l'acido arachidonico e l'etanolamina sono uniti da un legame di tipo estereo in maniera del tutto opposta a come avviene per l'anandamide e che si comporta come parziale agonista /antagonista sul CB₁ e agonista sul CB₂ (Porter et al., 2002); infine la *N*-arachidonoildopamina (NADA), l'ammide fra l'acido arachidonico e la dopamina che risulta essere 40 volte più selettiva per il CB₁ che

per il CB₂ (Bisogno et al., 2000) ed è in grado di attivare il recettore dei vanilloidi (TRPV1) (Huang et al., 2002). Un'altra molecola, congenere dell'anandamide, la *N*-palmitoiletanolamina (PEA) già nota come anti-infiammatorio, fu proposta come nuovo ligando per il CB₂ (Facci et al., 1995), ma questa ipotesi, in seguito, non ha trovato conferma. Infine, nel 1995 fu scoperta l'oleamide (cis-9-ottadecammide, OEA), un fattore di induzione del sonno (Cravatt et al., 1995), per la cui azione cannabimimetica ci sono discordanti dati riguardo al fatto se sia o meno mediata dai recettori dei cannabinoidi (Leggett et al., 2004). Si ritiene che queste molecole, intervenendo negativamente sul loro metabolismo, possano potenziare l'effetto degli EC attraverso un'azione *entourage* (Di Marzo et al., 1998; Ben-Shabat et al., 1998).

Il fatto che esistevano molecole endogene in grado di svolgere un ruolo fisiologico (**Fig. 4**), implicava necessariamente l'esistenza di vie biosintetiche regolabili, ovvero di specifici meccanismi molecolari in grado di sintetizzare tali sostanze negli opportuni modi, luoghi e tempi. Inoltre, doveva necessariamente esistere anche una via catabolica regolabile in grado di terminare il segnale al momento opportuno. Gli EC sono considerati dei neuromodulatori locali che, diversamente dagli altri neuromodulatori, non sono immagazzinati in vescicole secretorie, ma vengono prodotti *on demand* (su richiesta) dalle cellule, a partire da precursori di membrana per essere poi rilasciati nel versante extracellulare, analogamente ad altri eicosanoidi come le prostaglandine (PGs). Per gli EC è stata anche proposta una funzione come messaggeri retrogradi. Secondo tale ipotesi, una volta rilasciati dai terminali post-sinaptici nello spazio sinaptico a seguito di uno stimolo depolarizzante, gli EC agiscono sui recettori cannabici delle terminazione pre-sinaptiche inibendo il rilascio del neurotrasmettitore (Wilson et al., 2002).

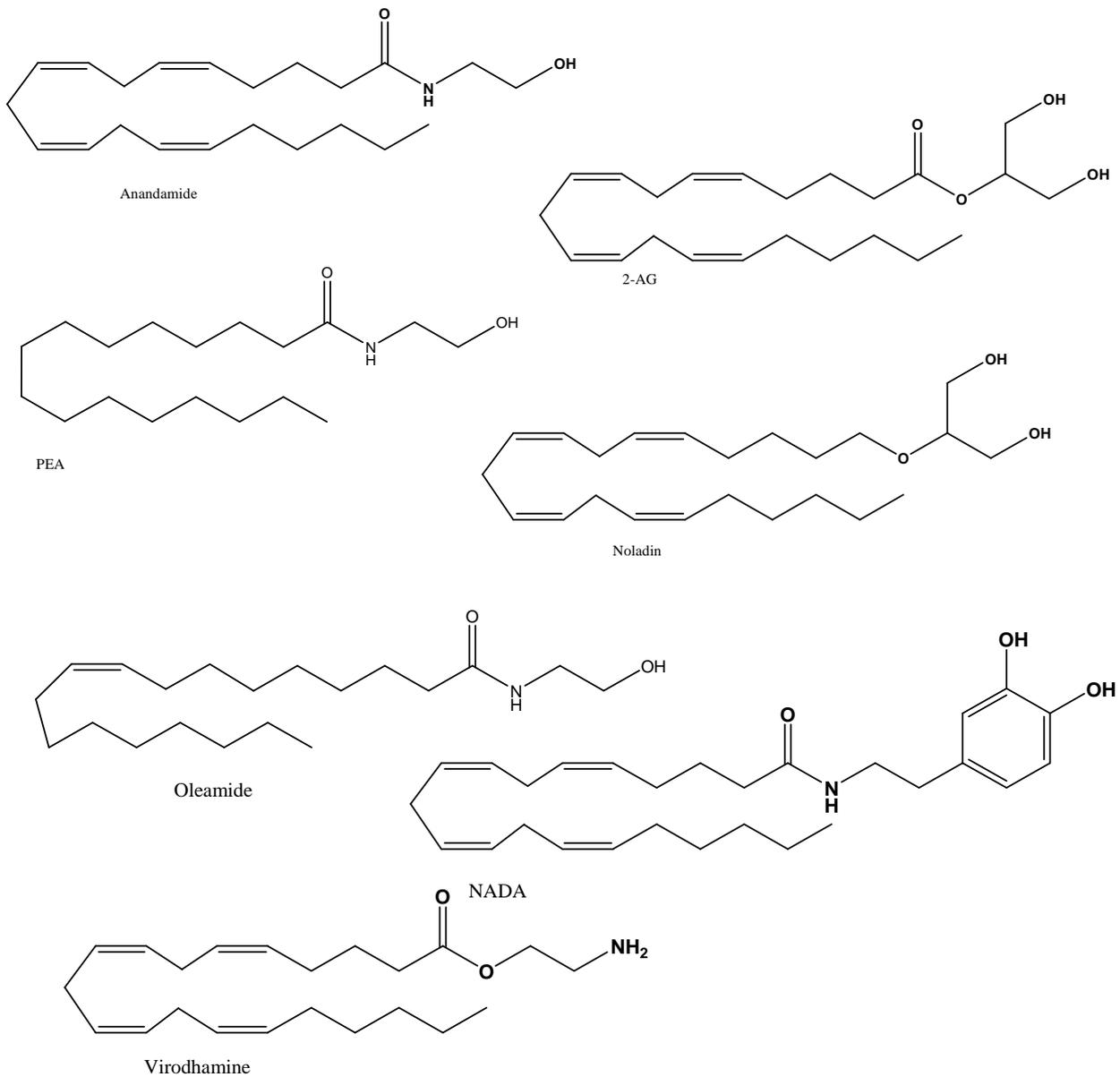
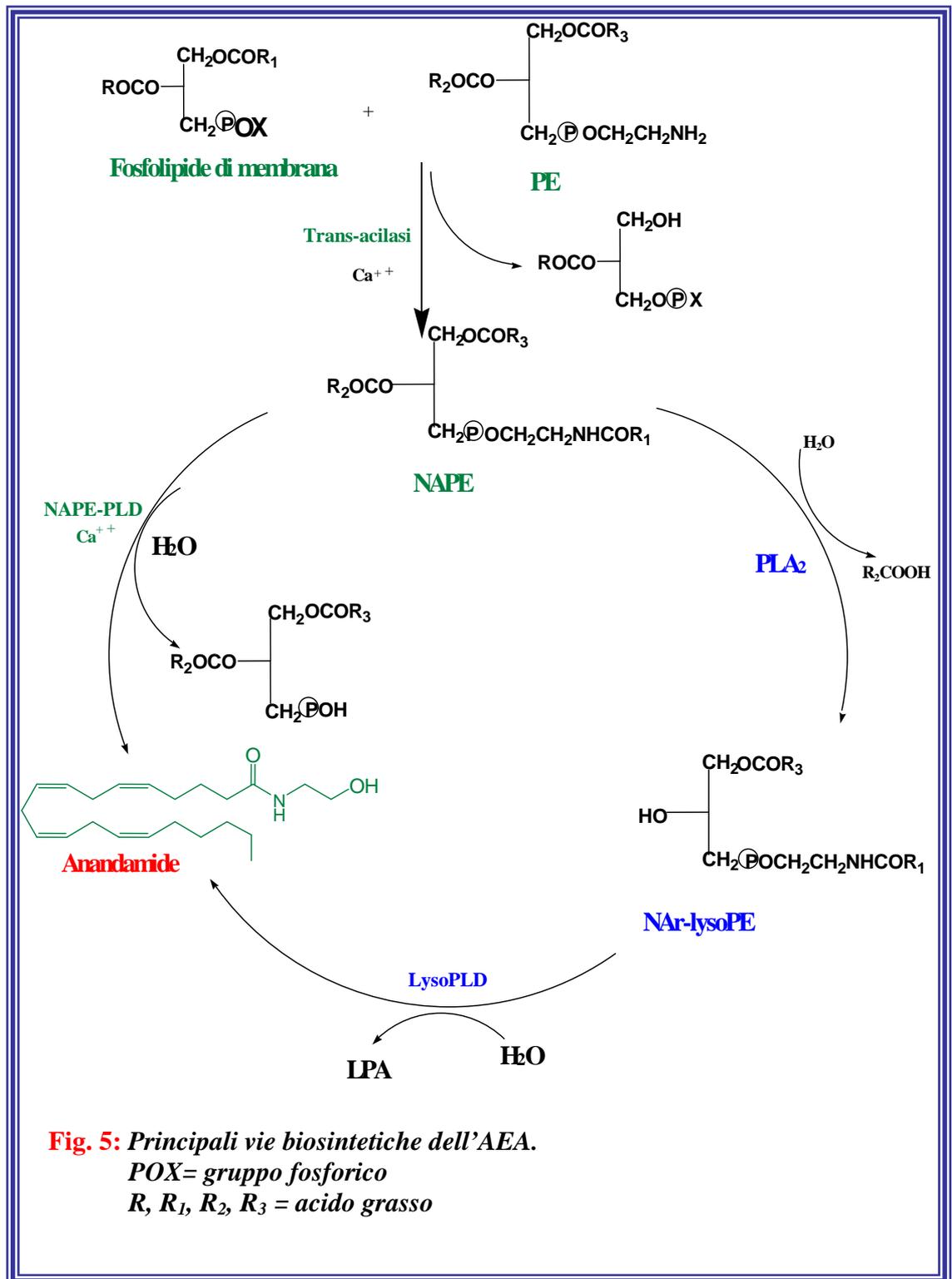


Fig. 4: *Strutture chimiche degli endocannabinoidi, dei due derivati degli acidi grassi ad azione cannabimimetica e della virodammina.*

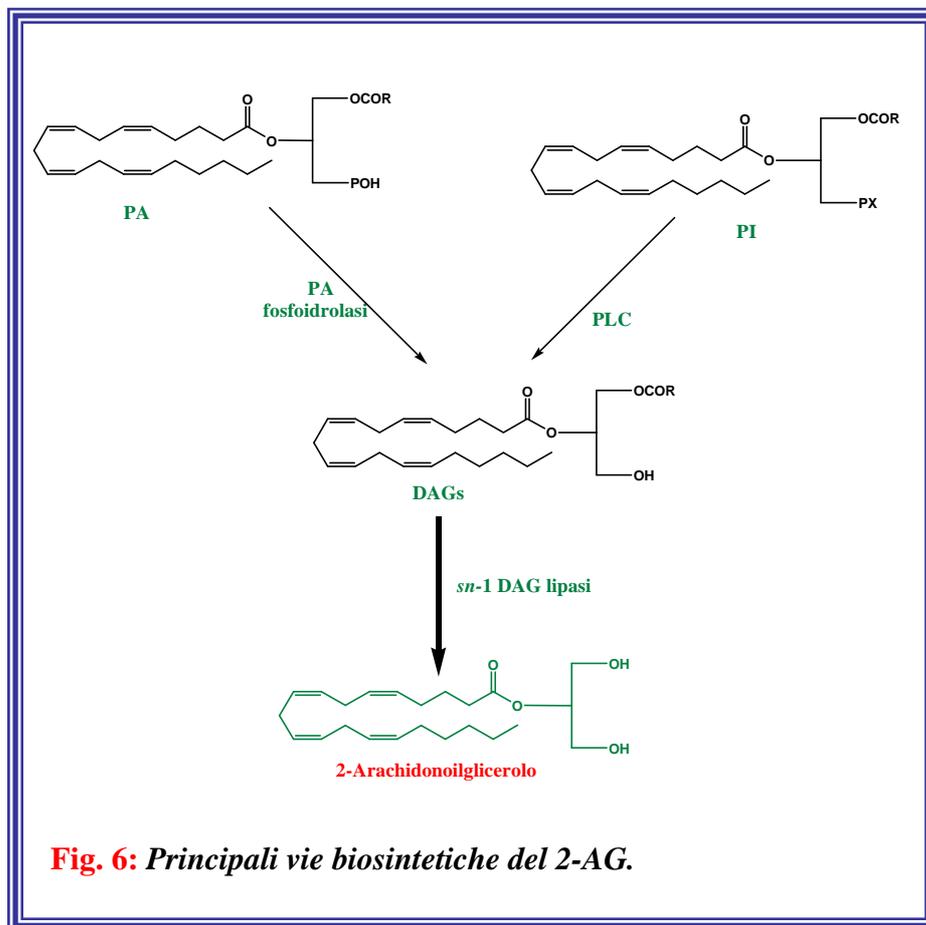
Le vie biosintetiche più studiate e quindi meglio conosciute sono certamente quelle che riguardano i primi due EC scoperti: AEA e 2-AG (Fig. 5 e Fig. 6).



L'AEA viene biosintetizzata attraverso l'idrolisi della corrispondente *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) per opera di una specifica fosfolipasi Ca^{++} dipendente di tipo D (NAPE-PLD) che mostra proprietà peculiari rispetto le altre

PLD note ed, infatti, appartiene alla famiglia delle zinco-metallo idrolasi delle β -lattamasi (Ueda et al., 2005). Il NAPE è a sua volta prodotto dall'azione catalitica di una specifica *trans*-acilasi Ca^{++} dipendente che catalizza il trasferimento del gruppo acile (l'acido arachidonico, AA) dalla posizione *sn*-1 di un fosfolipide di membrana (si noti che l'esterificazione di AA in posizione *sn*-1 di un fosfolipide non è molto frequente in natura), alla funzione amminica libera della fosfatidiletanolamina (PE) (Di Marzo et al., 1994). Di recente è stata suggerita una via biosintetica indipendente dalla NAPE-PLD (**Fig. 5**) e dipendente, invece, da un enzima ad attività fosfolipasica di tipo A_2 , identificato come gruppo IB di tipo secretorio (sPLA₂ IB) che idrolizzerebbe il NAPE rilasciando acidi grassi e *N*-arachidonil-lisoposfatidiletanolamina (NAr-lysoPE) dalla quale, a sua volta si libera l'AEA per opera di una specifica fosfolipasi, presumibilmente diversa dalla NAPE-PLD (Sun et al., 2004).

Il 2-AG è biosintetizzato attraverso l'idrolisi dei diacilgliceroli (DAGs) catalizzata da una DAG lipasi specifica per la posizione *sn*-1. Le molecole di DAG (che devono possedere una funzione di AA esterificata in posizione *sn*-2), a loro volta possono essere prodotte o dall'idrolisi di fosfoinositidi (PI) catalizzata da una specifica fosfolipasi di tipo C (PLC) selettiva Ca^{++} dipendente, oppure dall'idrolisi dell'acido fosfatidico (PA) catalizzata da una idrolasi PA specifica Ca^{++} dipendente (Di Marzo et al., 1996; Bisogno et al., 1999). Di recente sono stati clonati e caratterizzati 2 isoenzimi della DAG lipasi (DAGL α e DAGL β) responsabili dell'idrolisi selettiva del legame estereo presente in posizione *sn*-1 dei DAGs (Bisogno et al., 2003).

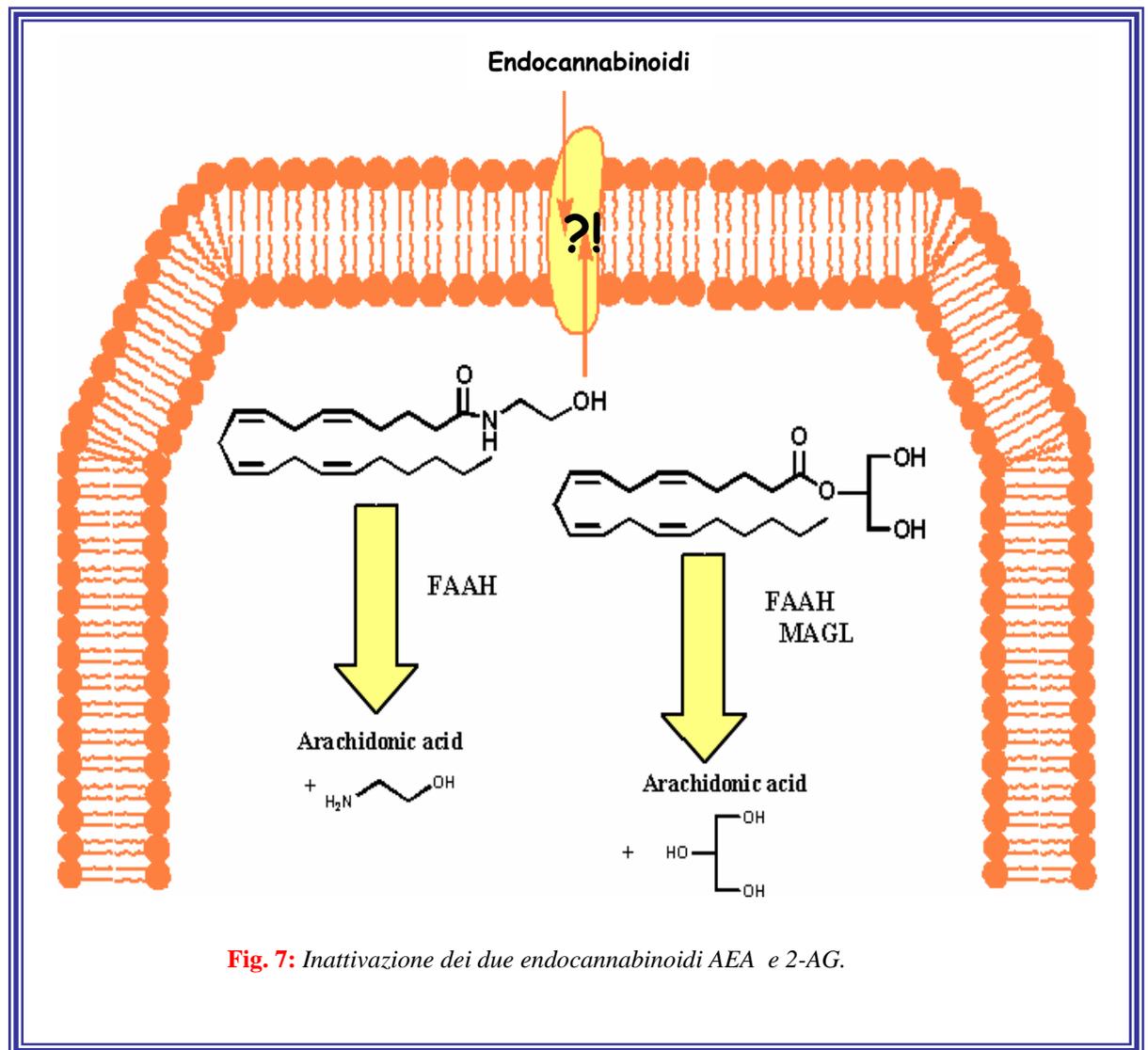


Una volta sintetizzati, gli EC vengono rilasciati all'esterno della cellula dove vanno a legarsi ai recettori presenti sulle cellule limitrofe o sulla stessa cellula che li ha prodotti, comportandosi come mediatori autocrini o paracrini. La loro natura liposolubile, infatti, non ne favorisce la diffusione nella matrice extracellulare o nel sangue. Lo spegnimento del segnale EC prevede, quindi, la ricaptazione da parte della cellula, l'idrolisi enzimatica e la riesterificazione dei prodotti ottenuti nei fosfolipidi di membrana (**Fig. 7**). Per quel che riguarda il re-uptake degli EC, questo trasporto sembrerebbe avvenire attraverso un meccanismo di diffusione facilitata guidata da uno specifico carrier di membrana che sarebbe in grado di lavorare in entrambe le direzioni (in entrata ed in uscita dalla cellula) secondo il gradiente di concentrazione degli EC attraverso la membrana plasmatica. L'esistenza di uno specifico trasportatore è ancora oggi dibattuta: non essendo stata ancora clonata tale proteina, la sua esistenza può essere documentata solo attraverso evidenze indirette

(Glaser et al., 2005). Altra ragione di discussione è la selettività di tale carrier; non è ancora ben chiaro, infatti, se il trasportatore sia specifico per l'AEA o se sia in grado di mediare anche l'uptake degli altri EC come suggerito da diversi autori (Bisogno et al., 2001; Fezza et al., 2002). Esperimenti effettuati con specifici inibitori del re-uptake dell'anandamide suggeriscono che lo stesso meccanismo è responsabile anche della ricaptazione del 2-AG. Una teoria sul trasportatore prevede un suo accoppiamento funzionale al CB₁ attraverso l'ossido d'azoto (NO). Secondo tale teoria l'attivazione del recettore CB₁ rilascerebbe NO, che, probabilmente attraverso la nitrosilazione di un residuo cisteinico, stimolerebbe il trasportatore a rimuovere AEA dal versante extracellulare (Maccarrone et al., 2002).

Dopo essere stati sequestrati dal versante extracellulare, gli EC, all'interno della cellula, sono soggetti ad un'idrolisi enzimatica. L'enzima maggiormente coinvolto nella degradazione degli EC (sia AEA e 2-AG) è una idrolasi specifica conosciuta come Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH), che è stata caratterizzata nel 1996 (Cravatt et al., 1996). La FAAH è una proteina integrale di membrana approssimativamente di 64kDa che lavora a pH alcalini (l'optimum è a pH 9.0), è formata da 597 amino acidi e presenta una sequenza amidasica altamente conservata, ricca di residui di glicina e serina. Studi di immunoistochimica ed ibridazione *in situ*, hanno confermato che l'espressione di questo enzima nelle diverse aree cerebrali è direttamente correlata alla densità recettoriale del CB₁ (Thomas et al., 1997). La struttura di questo enzima, determinata mediante studi di cristallografia a raggi X, ha permesso di identificare i siti di connessione con le membrane (Bracey et al., 2002). La FAAH, diversamente dalle altre amidasi, non utilizza la triade catalitica serina-istidina-aspartato, ma usa invece la triade serina-serina-lisina, dove la Ser-241 agisce da nucleofilo, la Ser-217 stabilizza la carica negativa e la Lys-142 funge da base

attiva (Patricelli et al., 2000). Il 2-AG può essere idrolizzato anche da un'altra classe di enzimi quali le monoacilglicerololipasi (MAGLs) che sono presenti sia a livello di membrana che a livello citosolico e che riconoscono come substrato anche altri monoacilgliceroli diversi dal 2-AG (Goparaju et al., 1999; Di Marzo et al., 1999). La MAGL è una proteina di 33kDa che appartiene alla famiglia delle idrolasi a serina che è espressa soprattutto in quelle zone del cervello dove i recettori CB₁ sono più presenti.



Recenti evidenze sperimentali confermano che l'AEA e il 2-AG possono essere substrato sia della cicloossigenasi 2 (COX-2) che di alcune lipoossigenasi (LIPOX), ovvero degli enzimi coinvolti nel metabolismo ossidativo dell'acido arachidonico (**Fig. 8**) (Kozak et al., 2004). La COX-2 converte l'AEA, in prostaglandina-endoperossido-etanolammide, un intermedio metabolico, che a sua volta viene convertito in prostaglandina-etanolammide (prostammide) (Kozak et al., 2002). Le LIPOX 12 e 15 convertono l'AEA rispettivamente in 12-idrossitetranoiletanolammide (12-HAEA) e 15-idrossitetranoiletanolammide (15-HAEA), ma solo la 12-HAEA mostra affinità per i recettori cannabici (Kozak et al., 2002). Il 2-AG invece è convertito in 15-idroperossieicosatetraenoicoglicerilestere (Moody et al., 2001).

Negli ultimi anni è stato notato che l'insorgenza di alcune patologie, la manifestazione di alcuni sintomi e il decorso di alcune malattie, sono in qualche modo legate ad alterazioni del tono EC. La scoperta del sistema EC e la delucidazione del suo funzionamento sono state, quindi, una pietra miliare nella ricerca in questo campo e rappresentano oggi un valido strumento per lo sviluppo di farmaci capaci di intervenire in situazioni di questo tipo.

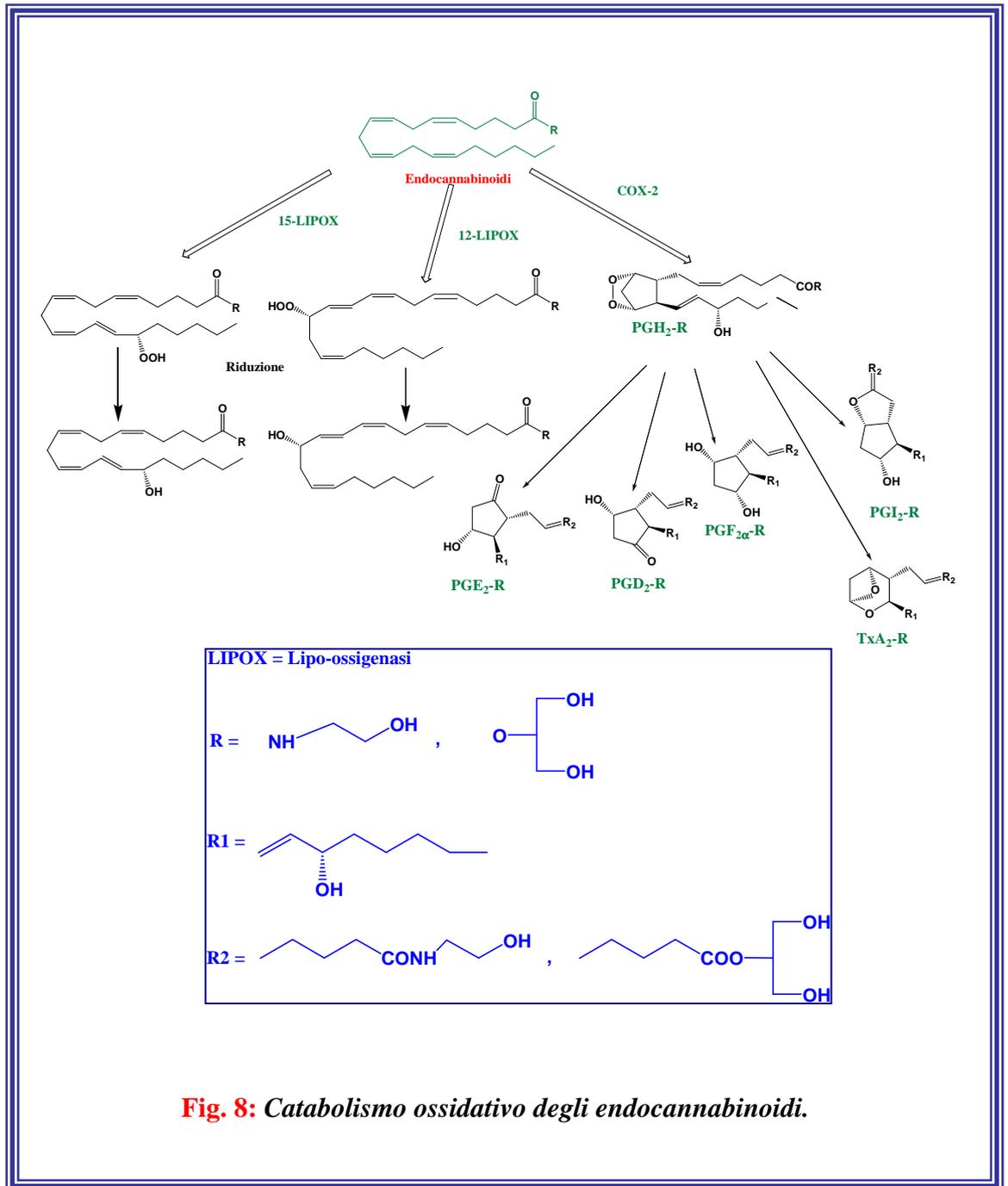


Fig. 8: *Catabolismo ossidativo degli endocannabinoidi.*

Gli inibitori del catabolismo dell'anandamide

La degradazione dell'anandamide è un meccanismo costituito essenzialmente da una sequenza di due eventi: il re-uptake cellulare e l'idrolisi enzimatica. Lo sviluppo di molecole capaci di agire selettivamente su questi eventi, permette di intervenire farmacologicamente in tutte quelle situazioni patologiche caratterizzate da un'alterazione del tono EC.

Il primo composto sintetizzato per impedire l'accumulo intracellulare di AEA è stato l'*N*-(4-idrossifenil)-arachidonoilammide (AM404) che mostrava valori di IC_{50} compresi fra 1-10 μ M nei neuroni e negli astrociti di ratto (Beltramo et al., 1997), con una bassa affinità per i recettori dei cannabinoidi, ma in grado di attivare il recettore dei vanilloidi TRPV1 (De Petrocellis et al., 2000) e di agire, presumibilmente fungendo da substrato competitore, come inibitore della FAAH (Fegley et al., 2004). In vivo, somministrato da solo, AM404 sviluppa una lenta ipocinesia, inoltre riduce la risposta comportamentale degli agonisti dopaminergici normalizzando l'attività motoria in ratti iperattivi ipertesi in un modello animale di DDAI (Disturbi da Deficit di Attenzione/Iperattività) (Beltramo et al., 2000). Recentemente AM404 è stato anche testato per la sua azione neuroprotettiva sia in vivo che in vitro (Karanian et al., 2005). Un altro inibitore, in seguito sintetizzato è stato il VDM11 (*N*-arachidonoil-4-idrossil-2-metilalanina) che, pur mostrando una potenza simile ad AM404 ($IC_{50}=11\mu$ M e 7.2μ M rispettivamente su C₆ e RBL-2H3) aveva un effetto trascurabile sul TRPV1 e mostrava una debole affinità sui recettori (CB₁-Ki= 5μ M; CB₂-Ki>> 5μ M) e sulla FAAH ($IC_{50}>50\mu$ M suN18TG2) (De Petrocellis et al., 2000). Il VDM11 è stato utilizzato in vivo su topi trattati con tossina colerica per attenuare l'accumulo dei fluidi intestinali (Izzo et al., 2003). Inoltre, l'uso del VDM11 ha contrastato le discinesie in un modello animale di Morbo di Parkinson riducendo

l'iperattività nei neuroni dopaminergici (Gubellini et al., 2002) e la spasticità in un modello murino di Sclerosi Multipla (Encefalite Allergica Sperimentale) (Baker et al., 2001). Fra gli inibitori del re-uptake va annoverato anche l'Arvanil (*N*-vanillil-arachidonoilammide), un analogo strutturale della capsaicina (il principio attivo del peperoncino rosso) che, oltre ad essere capace di inibire il trasporto cellulare dell'anandamide ($IC_{50}=3.6\mu M$), si comporta come agonista ibrido del recettore dei cannabinoidi CB_1 e del recettore dei vanilloidi (Melck et al., 1999a). Un inibitore selettivo del re-uptake è l' UCM-707, un furil-derivato dell'acido arachidonico che presenta un IC_{50} di $0.8\mu M$ sull'uptake e solo di $30\mu M$ sulla FAAH e non lega né i recettori cannabici né il TRPV1 (Lopez-Rodriguez et al., 2003). Questo inibitore è stato testato in vivo su alcuni modelli animali di malattie neurodegenerative dove si è mostrato capace: di alleviare i sintomi motori nel Morbo di Huntington, di ridurre la spasticità nella Sclerosi Multipla e di rallentare il processo neurodegenerativo nel Morbo di Parkinson (de Lago et al., 2005a). Gli unici inibitori del re-uptake sviluppati a partire dall'acido oleico piuttosto che da quello arachidonico, sono stati una serie di composti fra cui si distinguono OMDM1 e OMDM2, due enantiomeri del idrossibenzilderivato della *N*-oleoiletanolammide. Queste molecole sono potenti inibitori dell'uptake (K_i 2.4 e $3\mu M$, rispettivamente per OMDM1 e OMDM2) e sono altamente selettivi poiché non mostrano affinità sui recettori dei cannabinoidi (CB_1 - $K_i =5.0\mu M$; CB_2 - $K_i >5.0\mu M$), non attivano il TRPV1 e sono stabili all'idrolisi enzimatica nell'omogenato del cervello di ratto (Ortar et al., 2003). L'attività farmacologica di questi inibitori è stata, in seguito, analizzata in un modello virale di Sclerosi Multipla dove si sono mostrati efficaci nell'alleviare i sintomi motori (Mestre et al., 2005), sul ratto, inoltre, è stato anche valutato sia il loro effetto netto

sulla locomozione e sulla percezione del dolore che la loro influenza sull'attività di AEA in questi due processi (de Lago et al., 2004).

Per quel che riguarda l'idrolisi enzimatica dell'anandamide, dopo la caratterizzazione enzimatica della FAAH, sono stati descritti una serie di inibitori sintetici. La maggior parte di queste molecole, come gli inibitori reversibili appartenenti alla classe dei trifluoro-metil-chetoni (Boger et al., 1999; Koutek et al., 1994; Patterson et al., 1996) oppure l'arachidonoil-dizometil-chetone (De Petrocellis et al., 1997; Edgmond et al., 1998) o ancora l'inibitore irreversibile metil-arachidonoil-metil-fosfonato (MAFP) (De Petrocellis et al., 1997; Deutsch et al., 1997), non sono selettivi per la FAAH, ma anzi o legano il CB₁, o inibiscono lo PLA₂ citosolica o inibiscono la 5-LIPOX. Altre molecole sintetizzate con lo scopo di inibire la FAAH sono state l'arachidonoiletilenglicole (AEG) che si comporta come inibitore competitivo, e l'arachidonoilserotonina (AA-5-HT) che mostra, invece, la classica cinetica dell'inibitore misto. Fra le due molecole, AA-5HT si distingue per potenza essendo in grado di inibire la FAAH sia su RBL-2H3 che su N18TG₂ senza nessun effetto sull'uptake o attivazione dei recettori cannabinici (Bisogno et al., 1998). La AA-5HT è stata utilizzata come tools farmacologico, *inter alia*, in uno studio condotto sul possibile coinvolgimento di questo enzima nella regolazione della motilità intestinale (Capasso et al., 2005).

Una nuova classe di inibitori FAAH è stata recentemente caratterizzata, si tratta di esteri dell'acido alchilcarbammico, fra cui si distingue l'URB597 con un IC₅₀ di 4.6nM su cervello di ratto e di 0.5nM su neuroni intatti. URB597 non solo si è mostrato un potente inibitore della FAAH, ma anche un composto selettivo non mostrando nessuna affinità verso i recettori dei cannabinoidi, l'uptake e la MAGL (Tarzia et al., 2003). In un recente studio è stato interessante osservare come

URB597, aumentando i livelli di EC nella sostanza grigia periacqueduttale, sia in grado di influenzare la via discendente nocicettiva attraverso un meccanismo che, in dipendenza dei tempi e delle dosi usate, può essere mediato sia da CB₁ che dal recettore TRPV1 dei vanilloidi (Maione et al., 2005). E' stato riportato anche che URB597 è capace di ridurre il processo infiammatorio in un modello animale di edema da carragenina (Holt et al., 2005).

L'anandamide ed il recettore dei vanilloidi

La similarità strutturale dell'anandamide con la capsaicina, il principio attivo del *Capsicum annuum* (peperoncino rosso), suggeriva che per queste due molecole esisteva un identico target cellulare. Tenuto conto che la capsaicina è il ligando naturale di una particolare famiglia di canali ionici (transient receptor potential channel, TRP) e che effetti cannabinoide-simili furono osservati in topi knock-out per il gene del recettore CB₁ (Di Marzo et al., 2002a), fu facile confermare che anche l'AEA, ma non il 2-AG, era in grado di attivare il recettore dei vanilloidi TRPV1 (Melck et al., 1999a; Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000). Il recettore TRPV1 è una proteina costituita da 838 amminoacidi nel ratto (839 nell'uomo), che appartiene alla famiglia dei canali ionici TRP e genera nella membrana un canale non selettivo per i cationi. Ha una massa di 95kDa e presenta 6 domini transmembrana a β -foglietto dove, tra la quinta e la sesta regione transmembrana si distingue il loop del poro (Jordt et al., 2002). Il segmento idrofilico N-terminale contiene una regione ricca di prolina cui fanno seguito tre domini ripetuti di anchirina, mentre non si distinguono motivi particolari nel segmento C-terminale. L'intera sequenza presenta tre siti di fosforilazione (Caterina et al., 1997). In condizioni di riposo tale canale è chiuso e, quando attivato, permette l'ingresso attraverso la membrana di cationi

mono- e bivalenti, prevalentemente ioni calcio. I recettori TRPV1 sono ampiamente distribuiti nei neuroni bipolari dei gangli delle corna dorsali midollari (dorsal root ganglion, DRG) su tutta la loro lunghezza (Guo et al., 1999) dove mediano la risposta agli stimoli nocicettivi indotti dal calore, dai protoni, da alcune tossine vegetali e dall'anandamide e da altri metaboliti degli acidi grassi, prodotti negli stati di infiammazione. L'ingresso di ioni attraverso questi canali genera, inizialmente, un potenziale d'azione avvertito come dolore e successivamente evoca uno stato refrattario, tradizionalmente riferito come desensibilizzazione, nel quale il neurone precedentemente stimolato non risponde ad ulteriori stimoli (Di Marzo et al., 2002b). Quindi, sostanze che mantengono il recettore TRPV1 in uno stato chiuso sono analgesiche, mentre fattori che promuovono lo stato aperto sono nocicettivi. Recentemente è stato riportato che i recettori TRPV1 sono presenti sui neuroni dopaminergici della substantia nigra pars compacta (Marinelli et al., 2003). La maggior parte dei neuroni che esprimono i recettori TRPV1 presenta anche i recettori CB₁. L'anandamide è un agonista di entrambi i recettori, mediante i quali esercita effetti contrastanti: antinocicettivi attraverso i recettori per i cannabinoidi ed iperalgesici attraverso quelli per i vanilloidi. E' interessante notare come il sito di legame dell'anandamide è intracellulare per il TRPV1 ed extra-cellulare per il CB₁, e quindi è presumibile ipotizzare che l'effetto netto di questo EC risulta fortemente influenzato dall'attività del carrier di membrana (Di Marzo et al., 2001a).

Effetti terapeutici

Le proprietà terapeutiche della *Cannabis* sono state negli ultimi tempi sempre più spesso documentate scientificamente attraverso studi sia preclinici che clinici (Di Marzo et al., 2005). E' noto che i derivati della *Cannabis* hanno effetti sedativi e

rilassanti; a basse dosi possono dare sensazioni di leggera euforia, reattività, aumento dell'eccitabilità, leggerezza e aumento dell'appetito. A dosi alte sono state riscontrate forti alterazioni sensoriali e percettive con sensazioni di isolamento, passività, demotivazione, ansia, tachicardia, nausea, attacchi di panico e paranoia con conseguenze sulle capacità di comprensione, di memoria e dei tempi di reazione. Della Cannabis sono, però soprattutto noti numerosi effetti terapeutici ascrivibili al suo principale componente psicoattivo, il THC, anche se sembra plausibile pensare che gli effetti della pianta siano mediati anche dagli altri fitocannabinoidi (la *Cannabis* contiene più di 60 tipi di cannabinoidi diversi).

Il primo studio clinico che riportava l'efficacia dei cannabinoidi sintetici come antidepressivi e nel trattamento dei sintomi da crisi di astinenza da alcool e da oppioidi risale alla fine degli anni 70, anche se tali dati non furono confermati nelle valutazioni cliniche susseguenti (Bhargava, 1978). Una delle più note azioni farmacologiche del THC sul cervello è quella di ridurre la sensibilità al dolore, per questo è molto utile come analgesico nei confronti di disturbi, come emicrania ricorrente o dolori mestruali, ma soprattutto, presentando anche un'azione antinfiammatoria è utile anche in altri tipi di dolori come quelli dovuti ai reumatismi (Cox et al., 2004; Mechoulam et al, 2000; Pertwee, 2001). I cannabinoidi sono in grado di decontrarre la muscolatura, infatti, sui muscoli presentano un effetto miorilassante e antispastico. Il primo studio sull'effetto benefico del THC sugli spasmi muscolari della sclerosi multipla risale alla fine degli anni 70 (Check et al., 1979), di recente, invece è stato dimostrato anche il coinvolgimento del sistema EC nel controllo della spasticità in alcuni modelli animali di sclerosi multipla (Baker et al., 2001; Smith et al., 2002; Mestre et al., 2005, Pertwee, 2002b). Tuttora sono in corso diversi trials clinici per valutare l'efficacia di alcune forme commerciali del

THC (Marinol®, Sativex®, Tetranabinex®, Nabidiolex®, Cannador) negli spasmi e nel dolore della sclerosi multipla (Russo, 2005). L'abbondanza degli EC e dei recettori CB₁ in quelle regioni dei gangli della base (globo pallido e sostanza nigra) deputati al movimento hanno spinto i ricercatori a scoprire se gli EC erano coinvolti nella regolazione del movimento e, di conseguenza, a sfruttare tale coinvolgimento nelle patologie correlate. In un modello animale del Morbo di Parkinson è stato osservato un aumento dei livelli di EC nella riduzione del movimento in ratti trattati con reserpina, un modello animale del Morbo di Parkinson (Di Marzo et al., 2000); in un altro lavoro è stato, invece, dimostrato il possibile coinvolgimento degli EC nell'insorgenza della discinesia, un fastidioso effetto collaterale della terapia con levodopa (van der Stelt et al., 2005). Gli EC sono coinvolti anche nella malattia di Alzheimer, sono state riportate, infatti, delle alterazioni nel sistema EC in tessuti affetti da tale morbo (Pazos et al., 2004) ed inoltre, di recente, è stato scoperto che i cannabinoidi sono in grado di contrastare gli effetti del peptide amiloide beta (ritenuto responsabile della neurodegenerazione legata al morbo di Alzheimer) (Milton et al., 2002 e 2005). Sempre nell'ambito delle malattie neuro degenerative, sono stati condotti studi sul Morbo di Huntington ed è stata osservata una riduzione dei recettori CB₁ nel globo pallido e nel caudato-putamen in un modello animale generato mediante iniezione di acido 3-nitropropionico (3-NPA) (Lastres-Becker et al., 2002). Lo stesso gruppo di ricercatori ha realizzato, in seguito, un lavoro che dimostra l'efficacia terapeutica del THC anche in un modello animale di Huntington generato mediante iniezione di malonato (Lastres-Becker et al., 2003). Altri studi sono stati condotti su pazienti psicotici affetti da schizofrenia, dove è stato osservato che il THC aggrava la sintomatologia schizofrenica (D'Souza et al., 2005) suggerendo che alla base di tale disturbo possa esserci un malfunzionamento del

sistema EC. L'associazione di quest'ultimo con i circuiti cerebrali dopaminergici è stata ampiamente investigata sia da un punto di vista anatomico, che biochimico e farmacologico (Rodriguez de Fonseca et al., 2001) e a conferma di ciò, recentemente è stato riportato uno studio nel quale si dimostra un'alterazione del sistema EC in pazienti schizofrenici, non solo nel sistema nervoso centrale, ma anche nel sangue (De Marchi et al., 2003). Il sistema cannabinoide è presente anche negli occhi. Uno studio condotto su tessuti oculari umani ha dimostrato che in occhi derivanti da pazienti affetti da glaucoma, i livelli degli EC diminuiscono drammaticamente soprattutto nei corpi ciliari (i tessuti maggiormente deputati alla regolazione della pressione intraoculare), suggerendo un coinvolgimento del sistema EC anche in tale disturbo (Chen et al., 2005). Alcune ricerche farmacologiche hanno indicato che i cannabinoidi possono essere utili nel trattamento del glaucoma a causa della loro capacità di diminuire la pressione intraoculare (Flach, 2002). A tale scopo sono stati sintetizzati, infatti, una serie di analoghi sintetici (Buchwald et al., 2002). E' noto che la marijuana, in alcune situazioni, causa la tosse, mentre in altre è in grado di inibire un broncospasmo. L'anandamide, infatti, è presente nei tessuti polmonari dove i suoi effetti sono mediati dai recettori dei cannabinoidi. Uno studio condotto su porcellini d'india e ratti, ha confermato che l'AEA esercita un effetto duplice sulla risposta bronchiale: se i muscoli nei polmoni sono costretti da un irritante, gli EC rilassano la muscolatura liscia inibendo fortemente la tosse; se le vie aeree sono rilassate, l'anandamide causa uno spasmo di tosse (Calignano et al., 2000). I cannabinoidi, inoltre, stimolano l'appetito agendo attraverso l'attivazione dei recettori CB₁, tale osservazione ha suggerito, quindi, l'utilizzo di antagonisti CB₁ nel trattamento dell'obesità. Si prevede, infatti, la prossima commercializzazione di un antagonista selettivo dei recettori CB₁ (Rimonabant, Acomplia®) con tale indicazione. In uno

studio condotto su topi geneticamente modificati (deficienti per il CB₁), è stato dimostrato che gli EC intervengono nel metabolismo dei grassi agendo a livello della lipogenesi epatica (Osei-Hyiaman et al., 2005). Gli EC sono coinvolti anche in alcuni disordini alimentari poiché i loro livelli nel sangue risultano aumentare nell'anoressia nervosa (Monteleone et al., 2005). E' stato, infine, dimostrato che una malnutrizione nella gestazione determina una diminuzione dei livelli ipotalamici di AEA nel neonato confermando che gli EC giocano un ruolo cruciale anche nello sviluppo neonatale (Matias et al., 2003).

Le cellule tumorali e l'insorgenza del cancro

Il cancro è la manifestazione di un'aberrazione di un normale comportamento cellulare: la proliferazione. In maniera del tutto occasionale, infatti, i raffinati meccanismi di controllo che regolano la moltiplicazione cellulare sono seriamente compromessi. Per tale motivo, una cellula dell'organismo comincia a replicarsi in maniera sregolata devastando l'ospite: le cellule tumorali, crescendo, competono con le cellule dei tessuti normali per l'approvvigionamento energetico. Se la progenie eredita la predisposizione a dividersi in modo indipendente dai meccanismi di regolazione, si forma un clone di cellule capaci di moltiplicarsi indefinitamente che danno vita alla massa tumorale. Il cancro, quindi, è causato da mutazioni che avvengono a carico del DNA, ma non può essere considerata una "malattia genetica". L'induzione del cancro è, infatti, dipendente da mutazioni del DNA a carico delle cellule somatiche, mentre le malattie genetiche sono causate esclusivamente da mutazioni del DNA della linea germinale. Molte forme di cancro sono state associate alla mutazione di un particolare gene (il gene ras), ma questa mutazione non è mai stata identificata nel DNA di cellule umane normali. Il gene ras

mutante deve, quindi, essere il risultato di una mutazione genetica delle cellule somatiche da cui ha avuto origine il tumore. Un gene di questo tipo, che codifica per una proteina capace di trasformare le cellule in coltura o di indurre il cancro negli animali, è indicato come oncogene; di contro, un gene che codifica per una proteina capace di contrastare il tumore, è indicato come antioncogene. Recenti indagini hanno suggerito che la trasformazione neoplastica non è caratterizzata da un'unica mutazione, ma è un processo multistep caratterizzato da una successione seriale di mutazioni genetiche. In particolare, tale sequela di mutazioni è facilmente distinguibile nel caso di cancro del colon dove ogni mutazione è morfologicamente ben distinta (polipi, adenomi benigni e carcinomi). I polipi sono delle formazioni precancerose che si sviluppano all'interno della parete del colon. La maggior parte di queste cellule presenta delle mutazioni del gene APC sul cromosoma 5 (APC è un antioncogene che codifica per una specifica proteina che, a sua volta, inibisce l'attività del gene myc, un gene che codifica per un fattore di trascrizione). Il passaggio allo stadio successivo (tumore benigno) è caratterizzato da una nuova mutazione sul cromosoma 12 che porta all'attivazione dell'oncogene k-ras. Le successive mutazioni che avvengono interessano l'antioncogene DCC (in questa fase si sviluppa l'adenoma) e l'antioncogene p53 (in questa fase si sviluppa il carcinoma). I diversi tipi di cancro vengono classificati in base al tipo di tessuto da cui deriva la prima cellula cancerosa. I sarcomi originano da tessuti connettivi quali ossa, cartilagini, nervi, vasi sanguigni, muscoli e tessuto adiposo, i carcinomi originano da tessuti epiteliali quali cute, mucose che rivestono le cavità interne, tessuti ghiandolari (ghiandola mammaria e prostata), le leucemie originano da organi emopoietici e i linfomi originano dal sistema linfatico. La maggior parte dei tumori non rimane confinata nel sito di origine, ma, attraverso il circolo ematico, colonizza nuove aree

di proliferazione. Questo fenomeno di diffusione è conosciuto come metastasi. Per l'accrescimento dei tumori è necessaria la formazione di nuovi vasi sanguigni che apporta nutrimento alla massa tumorale e consente lo scambio gassoso. Questo processo è conosciuto come angiogenesi. Molte cellule tumorali sono in grado di secernere fattori di crescita che stimolano l'angiogenesi quali: il fattore di crescita basico dei fibroblasti (basic fibroblast growth factor, bFGF), il fattore di crescita trasformante α (TGF α) ed il fattore di crescita delle cellule endoteliali-vascolari (VEGF). Solo in rari casi le cause necessarie e sufficienti per lo sviluppo di un tumore sono ereditarie; nella stragrande maggioranza dei tumori, infatti, le alterazioni dei geni che sono responsabili della malattia sono provocate dalla prolungata esposizione ad agenti cancerogeni, siano essi di origine chimica, fisica o virale. Tuttavia anche alcuni fattori ambientali possono contribuire alla formazione di alcune mutazioni.

Cannabinoidi ed Endocannabinoidi nel Cancro

Per lungo tempo, i cannabinoidi sono stati considerati, per la loro efficacia nel cancro, come farmaci lenitivi ma non curativi. Tuttavia, perpetuare solo tale utilizzo potrebbe essere restrittivo giacché recenti studi hanno riesaminato la possibilità di utilizzare queste molecole come veri e propri farmaci antitumorali. Le prime evidenze sperimentali che documentano l'effetto antitumorale dei cannabinoidi, risalgono ai primi anni '70, quando sia i recettori cannabici che gli EC erano ancora sconosciuti. In tali studi fu dimostrato che i cannabinoidi erano in grado di inibire sia la crescita dell'adenocarcinoma polmonare di Lewis che di un tipo di leucemia indotta da virus (Munson et al., 1975). Sorprendentemente, pur essendo promettenti, per molti anni questi dati non furono approfonditi da successive investigazioni. I

primi studi clinici furono eseguiti nel trattamento dell'emesi in seguito a chemioterapia, nella stimolazione dell'appetito nei pazienti affetti da AIDS, nel trattamento dell'analgesia nel dolore cronico e nel miglioramento dell'umore nei pazienti soggetti a radioterapia (Lane et al., 1991; Beal et al., 1994; Noyes et al., 1975; Clark et al., 1970).

Un fastidioso senso di nausea e frequenti conati di vomito sono, infatti, effetti collaterali che spesso si manifestano durante le terapie chemioterapiche. Talvolta questi effetti indesiderati sono così devastanti da non essere tollerati dai pazienti che interrompono la cura a dispetto della persistenza della malattia. I cannabinoidi sono ottimi antiemetici in modelli animali di vomito. Questo effetto è dovuto sia al blocco del rilascio di acetilcolina nel tratto digestivo, che ad un'azione diretta sul centro del vomito, visto che i recettori CB₁ sono presenti sui terminali colinergici dei plessi mienterici dello stomaco, del duodeno e del colon (Di Carlo et al., 2003), nonché nei centri sovraspinali che controllano la nausea. I cannabinoidi sono stati utilizzati anche per prevenire la perdita di appetito e di peso, che, nel cancro inducono la cachessia. I cannabinoidi stimolano l'appetito ed aumentano l'assunzione di cibo negli animali soprattutto se somministrati a basse dosi, quando si mantiene bassa anche l'incidenza degli effetti avversi (Berry et al., 2002). Un aspetto negativo che sempre accompagna la patologia tumorale è il dolore che ha un impatto negativo sulla qualità della vita dei pazienti soprattutto quelli in fase metastatica o in stadio avanzato. Il dolore cronico nel cancro ha una componente nocicettiva che si origina da una reazione infiammatoria sul sito interessato e una componente neuropatica che si origina da un danno al sistema nervoso. Per tale motivi, il trattamento di questo tipo di dolore dovrebbe coinvolgere sia i nervi periferici, che il midollo spinale e il cervello (Mantyh et al., 2002). I cannabinoidi sono antinocicettivi poiché inibiscono

la neurotrasmissione nocicettiva nel cervello (talamo, materia grigia e medulla), nel midollo spinale (corna dorsali) e nelle terminazioni periferiche (gangli dorsali) principalmente attraverso l'attivazione del CB₁ (Pertwee, 2001). E' anche possibile che questo effetto sia dovuto alla inibizione del rilascio di alcuni mediatori del dolore o dell'infiammazione attraverso l'attivazione di alcuni recettori CB₂ periferici (Walker et al., 2002; Calignano et al., 1998). Infine, un altro potenziale utilizzo dei cannabinoidi nel cancro è legato alla loro capacità di migliorare l'umore e di ridurre il senso di ansia e la depressione, manifestazioni emotive molto frequenti nei pazienti affetti da questo male (Walsh et al., 2003).

Una possibile strategia terapeutica da adottare per un utilizzo dei cannabinoidi come chemioterapici è quella di agire sul sistema EC per ritardare o addirittura per arrestare la crescita tumorale. Questa tendenza si basa sulla sempre più accreditata ipotesi che gli EC siano molecole segnale che svolgono un ruolo protettivo soprattutto nelle prime fasi di sviluppo di un tumore. In un recente studio, infatti, sono stati correlati i livelli di AEA, di altre *N*-acil-etanolammine e dei loro precursori biosintetici in diversi tumori di origine umana e nei tessuti sani circostanti. Nella maggior parte dei casi i tessuti cancerogeni contenevano livelli sostanzialmente più alti di questi lipidi rispetto ai tessuti benigni circostanti (Schmid et al., 2002). A riprova di ciò, diverse linee tumorali hanno mostrato possedere le seguenti peculiarità: la capacità di sintetizzare uno o più EC, la presenza dei recettori cannabici CB₁ e/o CB₂ e la presenza delle proteine deputate all'inattivazione degli EC; confermando il possibile ruolo di questo sistema nel controllo della proliferazione cellulare. In accordo con tale ipotesi, è stato dimostrato anche che l'AEA ed il 2-AG esogeni inibiscono la proliferazione delle cellule umane di carcinoma della mammella e del cancro della prostata attraverso un meccanismo

legato all'attivazione del CB₁ ed alla soppressione dell'espressione dei recettori per alcuni importanti fattori di crescita tumorali come il recettore della prolattina e il recettore *trk* per l'NGF, nerve growth factor (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 2000). Altre evidenze sono state, in seguito, riportate sull'azione inibitoria dei cannabinoidi sulla crescita di linee cellulari di glioma e sulla riduzione, in vivo, del volume di tale tumore (Sanchez et al., 1998; Galve-Roperh et al., 2000), nonché di epitelomi della tiroide (Bifulco et al., 2001). Sempre in vivo, è stato osservato che la somministrazione intra-tumorale di THC può ridurre la crescita di gliomi attraverso l'attivazione del CB₂ (Sanchez et al., 2001) così come può bloccare (sempre attraverso l'attivazione del CB₂) la proliferazione cellulare di linfomi e mastocitomi (McKallip et al., 2002). Studi più recenti hanno incentrato l'attenzione sull'effetto inibitorio della stimolazione dei CB₁ sulla crescita dei tumori e sullo sviluppo di metastasi suggerendo un coinvolgimento degli EC anche nell'angiogenesi e nella formazione di metastasi (Portella et al., 2003). In un altro studio è stato dimostrato come la somministrazione locale di un cannabinoide non psico-attivo inibisca l'angiogenesi di un glioma maligno agendo attraverso l'inibizione della migrazione delle cellule vascolari dell'endotelio e dell'espressione della matrice metallo-proteica necessaria per la crescita tumorale (Blazquez et al., 2003). L'inibizione dell'angiogenesi e della crescita cellulare attraverso l'attivazione dei recettori cannabici è stata dimostrata anche nel cancro della pelle (Casanova et al., 2003).

Meccanismi dell'azione antitumorale degli endocannabinoidi

L'effetto antitumorale dei cannabinoidi (di sintesi, naturali o vegetali), sembra essere dovuto a meccanismi cellulari di vario tipo. Molti degli effetti antitumorali sono ascrivibili all'attivazione dei recettori dei cannabinoidi (sia CB₁ che CB₂), molti altri

dipendono dall'attivazione del recettore TRPV1 dei vanilloidi, ma vi sono anche casi in cui l'effetto antitumorale non sembra essere mediato da nessuno di questi recettori. Evidenze sperimentali riportano che, attraverso un meccanismo CB₁-mediato, gli EC inibiscono la proliferazione di cellule del carcinoma della mammella e della prostata attraverso la soppressione dell'espressione del recettore *Trk* e della prolattina ovvero dei recettori di importanti fattori di crescita per questi tipi tumorali (Melck et al., 1999b; 2000). Tale effetto era dovuto all'attivazione di Raf1-MEK-ERK. Il CB₁, infatti, è in grado di arrestare il ciclo cellulare nella fase G₀/G₁-S. L'attivazione della proteina G_i, infatti, diminuisce i livelli di cAMP con ripercussione sulla proteina chinasi A (PKA). L'inibizione della PKA previene, quindi, la sua azione su altre chinasi che giocano dei ruoli fondamentali nel controllo della crescita e del differenziamento di una cellula (MAPK, ERK, c-Jun N-terminale e p38MAPK). Le conseguenze dell'attivazione del CB₁ sulle ERK sono, però eterogenee. Infatti, in cellule di feocromocitoma di ratto PC12, è stato riportato che l'attivazione del CB₁ determina un'inibizione delle ERK attraverso la riduzione delle vie di segnale Rap1/B-Raf (Rueda et al., 2002). L'attivazione del CB₁ è in grado di stimolare anche la fosfatidil-inositol-3chinasi/proteina chinasi B (PI3K/PKB), e attraverso questa via causa la fosforilazione e, quindi, inibisce la translocazione nucleare di alcuni fattori di trascrizione (Forkhead Transcription Factor, FTF) impedendo l'espressione di alcune proteine pro-apoptotiche (Gomez de Pulgar et al., 2002a). L'attivazione del CB₁ è anche in grado di diminuire l'attività della proteina p21, il prodotto proteico dell'oncogene *ras*. Recentemente, infatti è stato riportato che la Met-F-AEA, un analogo metabolicamente stabile dell'anandamide, era in grado di inibire la crescita in vitro di cellule epiteliali (epitelioma tiroideo) trasformate con k-ras ed, in vivo, in tumori indotti dall'impianto sottocutaneo di queste cellule su topi atimici, attraverso

la soppressione CB₁-mediata dell'attività della p21 (Bifulco et al., 2001). Sono in corso, al momento, interessanti studi sul ruolo della prenilazione sull'attività di questo oncogene nell'organizzazione del citoscheletro, ma anche nella regolazione della proliferazione e dell'apoptosi (Bifulco, 2005). L'espressione dell'oncogene *ras* è stata correlata anche all'induzione di un potente fattore paracrino stimolatore dell'angiogenesi, il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) (Rak et al., 2000). Il fatto che la Met-F-AEA sia in grado di bloccare l'attività di p21 (Bifulco et al., 2001) e che gli EC possono inibire l'espressione di alcuni fattori di crescita e/o dei loro recettori, lasciava pensare che la stimolazione dei CB₁ potesse inibire anche l'espressione del VEGF. Tale ipotesi fu investigata e confermata, in seguito, in una linea cellulare di epiteloma della tiroide (Portella et al., 2003). Un altro meccanismo antitumorale esercitato attraverso il CB₁ prevede l'aumento dei livelli intracellulari di ceramide, uno sfingolipide ubiquitario che svolge un importante ruolo nel controllo del destino cellulare. L'attivazione del CB₁ è in grado di produrre due picchi distinti di ceramide. La generazione di ceramide a breve termine, coinvolge l'idrolisi della sfingomieline attraverso l'attivazione della sfingomielinasi. Per questo tipo di liberazione della ceramide dai fosfolipidi di membrana, il recettore CB₁ si accoppia non ad una proteina G, ma ad una diversa proteina adattatrice, la FAN (Factor Associated with Neutral Sphingomyelinase activation). La generazione di ceramide a lungo termine dipende, invece, dalla sua produzione de novo attraverso la stimolazione della palmitoiltransferasi. (Velasco et al., 2005).

L'attivazione dei recettori CB₂ invece generalmente è collegata con l'induzione dell'apoptosi. L'apoptosi è un programma di suicidio cellulare finemente regolato in cui effettori specifici quali le caspasi (enzimi proteolitici del tipo cisteina-proteasi), provvedono al clivaggio del materiale genetico. Un importante organo nell'apoptosi

è il mitocondrio che, attraverso la liberazione del citocromo c nel citoplasma, contribuisce ad attivare le caspasi. Il meccanismo attraverso cui gli EC possono indurre apoptosi attraverso i recettori CB₂ o TRPV1 rimane ancora controverso e sembra dipendere molto dalle condizioni sperimentali. Tuttavia, un recente studio condotto in vitro su cellule del carcinoma della cervice, sembrerebbe indicare che l'apoptosi operata dall'anandamide sia mediata esclusivamente dal recettore TRPV1 e che, anzi, l'attivazione dei recettori cannabici da parte di AEA abbia un ruolo protettivo sulla proliferazione di queste cellule (Contassot et al., 2004).

L'apoptosi cellulare può essere indotta anche da uno stress ossidativo. Lo stress ossidativo è il risultato dello squilibrio fra le specie antiossidanti (AOX) e i ROS (Reactive Oxygen Species). In condizioni fisiologiche, le cellule sono in grado di bilanciare queste due specie mantenendo un equilibrio redox. Una deplezione delle naturali difese antiossidanti o un accumulo di ROS determinano, quindi, uno stress ossidativo (Scandalios, 2002). L'azione dei ROS si manifesta attraverso la modulazione di alcuni fattori di trascrizione che può avvenire in due modi diversi: la diretta interazione con dei *motif* del DNA o l'attivazione di MAPK che intervengono successivamente sul DNA (Scandalios, 2002).

In un recente studio è stato verificato se l'attivazione di p53 (un modulatore dell'apoptosi) era, in qualche modo, correlata agli aumentati livelli di ROS nel cancro e se l'aumento dei livelli di ROS induceva un'apoptosi p53-dipendente. Per tale motivo, una linea cellulare di mastociti di ratto (RSMC) fu transfettata stabilmente con p53 e furono discriminate le cellule sensibili da quelle resistenti all'apoptosi p53-mediata. I risultati di tale analisi confermavano questa correlazione apoptosi-ROS: infatti, solo le cellule sensibili producevano un consistente numero di ROS e l'uso di antiossidanti era in grado sia di inibire l'apoptosi che di bloccare la

produzione dei ROS (Jhonson et al., 1996). In un lavoro più recente è stato, invece, studiato il coinvolgimento di alcune isoforme di p21 (Ki-Ras e Ha-Ras) con la produzione di specie ossidanti. E' stata valutata, infatti, la risposta di cellule epiteliali (HUVEC) transfettate con Ki-Ras ed Ha-Ras ad uno stimolo "stressante" quale l'esposizione al perossido di idrogeno (H_2O_2). Sorprendentemente, le due isoforme hanno reagito in maniera diversa allo stress ossidativo indotto da H_2O_2 . Infatti, mentre le HUVEC/Ha-Ras attivavano la Superossido Dismutasi (SOD), l'enzima che blocca la produzione dei ROS; le HUVEC/Ki-Ras attivavano la NADPH ossidasi, l'enzima che favorisce la produzione dei ROS (Cuda et al., 2002).

Un'altra situazione di stress cellulare può essere determinata dalla deprivazione di siero dal mezzo cellulare. Il siero, infatti, contiene anche degli antiossidanti che contribuiscono a mantenere l'equilibrio redox nelle cellule. Recentemente è stato dimostrato che i cannabinoidi sono in grado di proteggere le cellule dallo stress ossidativo causato da una deplezione di siero attraverso un effetto antiossidante. La riduzione dei ROS operata dai cannabinoidi non sembrava dipendere dall'attivazione dei recettori cannabici (Chen et al., 2000).

I cannabinoidi, quindi, possono inibire la crescita di un tumore attraverso diversi meccanismi: 1) l'arresto del ciclo cellulare attraverso l'inibizione dell'espressione di importanti fattori di crescita o dell'attività (meccanismi generalmente CB_1 -mediati); 2) l'induzione dell'apoptosi (meccanismo in genere CB_2 e/o TRPV1-mediato) che può seguire o meno l'aumento dei livelli di ceramide nella cellula (meccanismi CB_1 e/o CB_2 -mediati); infine 3) meccanismi che apparentemente non coinvolgono né recettori cannabici né TRPV1 (**Fig. 9**).

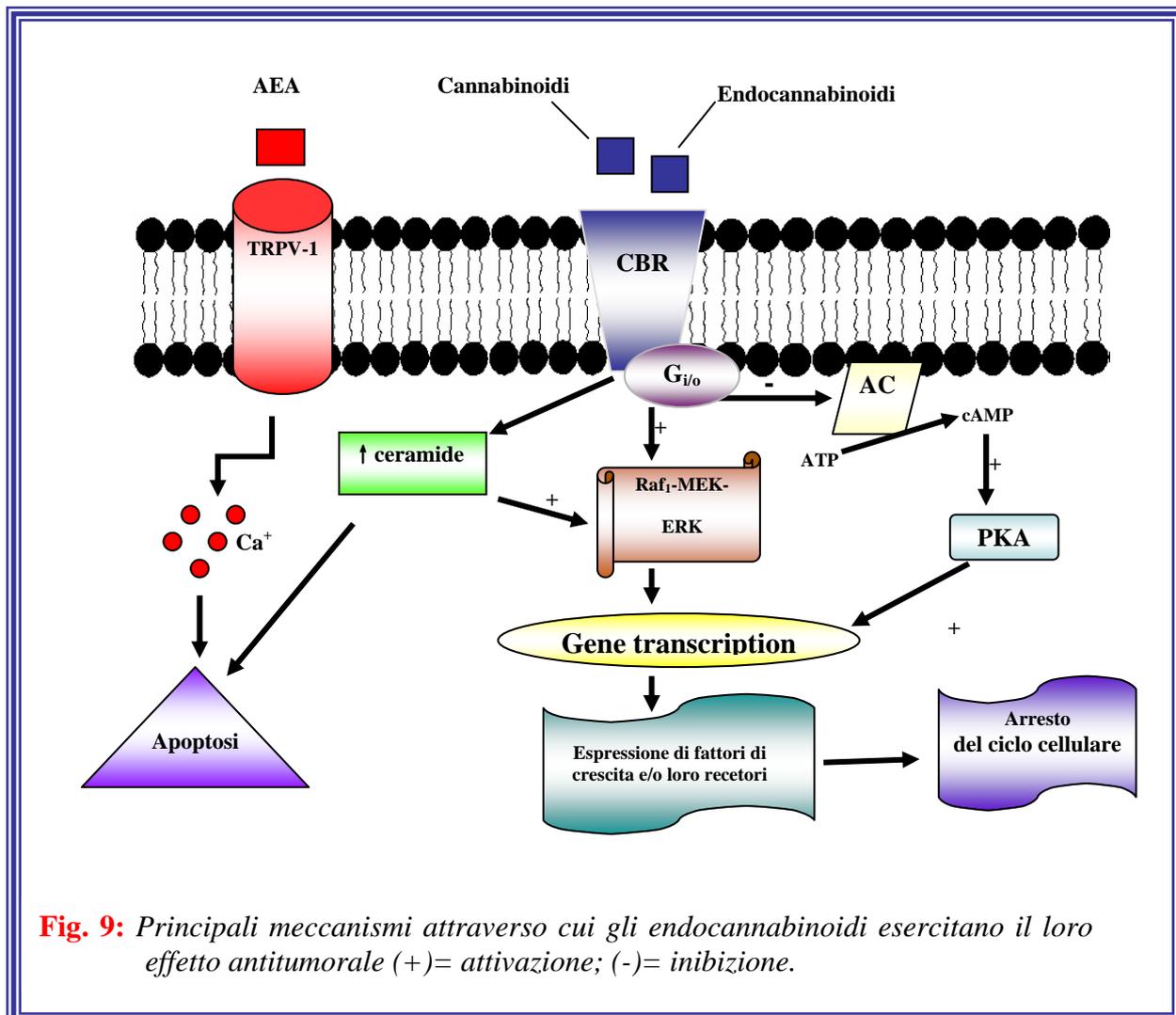


Fig. 9: *Principali meccanismi attraverso cui gli endocannabinoidi esercitano il loro effetto antitumorale (+)= attivazione; (-)= inibizione.*

E' in tale scenario che il presente lavoro di tesi si vuole inserire, con lo sforzo di comprendere i meccanismi cellulari e/o molecolari che sono alla base dei benefici effetti che i cannabinoidi manifestano nelle diverse forme cancerogene. La comprensione di questi fenomeni, oltre ad avere un'ovvia ricaduta farmacologica, potrebbe aprire nuove prospettive sulle conoscenze dei meccanismi endogeni di controllo dello sviluppo tumorale favorendo l'utilizzo come anti-tumorali dei cannabinoidi, da soli o in associazione con agenti chemioterapici convenzionali.

Scopo della tesi

Scopo di questa tesi è stato di studiare il coinvolgimento del sistema EC nel controllo dello sviluppo del cancro coloretale; in seguito sono stati anche analizzati gli effetti di alcuni fitocannabinoidi, nonché di estratti di *Cannabis*, su linee cellulari di diversa origine tumorale, analizzandone i possibili meccanismi d'azione. Per una migliore comprensione e lettura del testo, nel presente lavoro di tesi, i risultati ottenuti sullo studio del carcinoma del colon saranno presentati separatamente da quelli ottenuti con i fitocannabinoidi.

Durante la prima fase degli studi è stata focalizzata l'attenzione sul ruolo svolto dal sistema EC nello sviluppo del carcinoma coloretale verificandone l'espressione e l'andamento durante la trasformazione neoplastica in tessuti umani sottoposti a colonscopia. Successive investigazioni sono state condotte *in vitro* su linee cellulari umane di adenocarcinoma di colon sulle quali, oltre a misurare i livelli di EC, è stato valutato anche l'effetto sulla proliferazione cellulare, sia su cellule differenziate (enterociti) che su cellule non differenziate, di alcuni inibitori selettivi del metabolismo degli EC. Tali inibitori selettivi sono stati poi anche saggiati in un modello sperimentale di tumore *in vivo*.

Nella seconda fase del lavoro sono state valutate le proprietà antitumorali di una serie di estratti di *Cannabis* e di fitocannabinoidi sia *in vitro*, attraverso lo screening di diverse linee cellulari tumorali, che *in vivo*, attraverso l'utilizzo di topi atimici, esaminando, in ogni caso, i possibili meccanismi cellulari e/o molecolari d'azione. Lo studio condotto ha permesso inoltre di confrontare gli effetti degli estratti arricchiti rispetto a quello mostrato dai singoli composti purificati e, quindi, di valutare un possibile vantaggio nell'utilizzo dell'estratto rispetto al singolo prodotto purificato.

Materiali e Metodi

Biopsie

I campioni di biopsia sono stati ottenuti contestualmente alla colonscopia, l'esame più attendibile per lo studio dei polipi e dei piccoli tumori del colon. Nove pazienti (età media 64.5 ± 10 anni, 3 maschi, 6 femmine) affetti da carcinoma del colon hanno subito l'asportazione di un campione di tessuto tumorale e un campione di tessuto sano limitrofo. Dodici pazienti (età media 59.9 ± 14 anni, 10 maschi, 2 femmine) affetti da polipi adenomatosi hanno subito l'asportazione di un campione di tessuto adenomatoso e un campione di tessuto sano limitrofo. Dai tessuti prelevati è stato rimosso un piccolo pezzo (circa 15-20 mg, peso umido) che è stato in seguito adoperato per l'analisi quantitativa dei livelli endogeni dei cannabinoidi; la rimanente parte è stata posta in formalina per consentire l'analisi istologica. Su ogni campione sono stati analizzati i seguenti parametri istologici: valutazione del grado di differenziazione del carcinoma, indice mitotico, area e pleiomorfismo nucleare.

Determinazione dei livelli endogeni degli endocannabinoidi

I tessuti in esame e/o le cellule sono state omogenate con CHCl_3 / MeOH/ Tris-HCl 50mM pH 7,4 (2:1:1 v/v) in presenza dei seguenti standard interni: 5pmol d_8 -AEA e 50pmol d_8 -2-AG (Cayman Chemicals, Michigan, USA). I lipidi contenuti nella fase organica sono stati purificati su colonna di silice mediante open-bed chromatography. Per questo tipo di purificazione, la colonna è stata impaccata con una sospensione di silice in CHCl_3 (in rapporto di massa 50:1 riferito al peso dell'estratto organico). Il campione è stato caricato e sono state fatte eluire miscele di solventi a polarità crescente: due letti di CHCl_3 /MeOH in rapporto 99:1 la cui frazione era costituita principalmente da steroli; due letti di CHCl_3 /MeOH in rapporto 9:1 contenente le *N*-aciletanolammine ed i monoacilgliceroli; infine, due

letti di $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ in rapporto 1:1, contenente composti appartenenti alla famiglia delle *N*-acil-fosfatidil-etanolammine (NAPEs), ivi compreso il NArPE, precursore biosintetico dell'AEA. Tutte le frazioni sono state raccolte, l'eccesso di solvente è stato allontanato e le frazioni contenenti AEA e 2-AG sono state analizzate mediante cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata a spettrometria di massa (LC-APCI-MS). Le analisi sono state condotte utilizzando un apparecchio Shimadzu per HPLC (LC-10ADVP) accoppiato ad un quadripolo MS (Shimadzu, LCMS-2010) attraverso un'interfaccia APCI (Shimadzu) e una colonna HPLC Phenomenex (C-18, 150mm, 5 μm , 4.6 mm) a fase inversa. La fase mobile, costituita da una miscela di metanolo/acqua/acido acetico (85/15/0.1), attraversava la colonna ad una velocità di 1ml/min. La determinazione dello spettro di massa è avvenuta secondo il monitoraggio di ioni selezionati (SIM). Gli ioni selezionati corrispondevano ai valori massa/carica (m/z) di 348 e 356 (ioni molecolari dell'AEA non deuterata e deuterata), 379 e 384 (ioni molecolari del 2-AG non deuterato e deuterato). Il tempo di ritenzione dell'AEA era di 10 minuti, mentre quello del 2-AG era di 13 minuti. Il rapporto delle aree tra il composto endogeno, non deuterato, e quello deuterato, ha permesso di determinare quantitativamente i livelli dell'AEA e del 2-AG. La determinazione dei livelli di AEA e 2-AG è stata ottenuta per diluizione isotopica degli standard interni e le pmol di EC ottenute sono state normalizzate per milligrammi di estratto lipidico o di tessuto umido. L'analisi statistica dei dati è stata valutata mediante test ANOVA seguito da test di Bonferroni.

Test di antiproliferazione cellulare

Per determinare l'effetto antiproliferativo delle molecole di nostro interesse, le diverse linee cellulari (mantenute in cultura seguendo le indicazioni della ditta fornitrice, DSMZ, Germania) sono state piastrate in multi-well da sei pozzetti

(Falcon, Milano) ad una densità di circa 5×10^4 cell/pozzetto e lasciate aderire per almeno quattro ore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 . I composti in esame sono stati quindi aggiunti al mezzo di cultura quattro ore dopo la semina e sono stati opportunamente inclusi ad ogni cambio del mezzo per i successivi quattro giorni. La vitalità cellulare è stata determinata mediante colorazione con Crystal Violet (Sigma, Milano).

Differenziamento cellulare: test di attività della saccarasi

Lo studio sul ruolo svolto dal sistema EC nello sviluppo del carcinoma coloretale ha previsto l'utilizzo di due linee cellulari di carcinoma del colon (CaCo-2 e DLD-1). Le CaCo-2 costituiscono un valido strumento per lo studio in vitro di questo tumore, poiché sono in grado di differenziare spontaneamente in enterociti dopo aver raggiunto la confluenza. A conferma del differenziamento cellulare, è stato condotto un time-course e sono stati misurati i livelli di attività della Saccarasi (l'enzima maggiormente deputato alla idrolisi dei disaccaridi negli enterociti) dopo 6-8-10-12-14-16gg di cultura. Il saggio di attività della Saccarasi è stato condotto seguendo le indicazioni precedentemente riportate (Dahlquist, 1964).

Determinazione della popolazione cellulare apoptotica

Le diverse linee cellulari sono state incubate con i composti in esame per 24-48h a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 . Al termine delle incubazioni il mezzo cellulare è stato separato e le cellule sono state lavate in PBS e fissate con 70% Etanolo freddo (EtOH, 0°C). L'analisi citofluorimetrica è stata condotta allontanando EtOH mediante due lavaggi con PBS ed incubando le cellule per tutta la notte a 4°C con PBS in presenza di $50 \mu\text{g/mL}$ di Ioduro di Propidio (Calbiochem, S.Diego, CA) e $10 \mu\text{g/mL}$ di Ribonuclease A, Deoxyribonuclease-free (Calbiochem, S.Diego, CA).

Al termine dell'incubazione le cellule sono state analizzate mediante citofluorimetria utilizzando un apparecchio FACScan (Becton Dickinson and Co., Mountain View, CA).

Analisi tumorogena: modelli in vivo per l'induzione di tumori su topi atimici

La sperimentazione animale descritta nel presente lavoro di tesi è stata condotta secondo la regolamentazione Italiana in materia di protezione degli animali utilizzati ai fini sperimentali o ad altri fini scientifici. Per lo studio in vivo sulle proprietà antitumorali degli inibitori del metabolismo degli EC, sono stati utilizzati topi nudi atimici di circa 6 settimane (Charles Rivers, Wilmington, MA). Una sospensione cellulare di 0.2ml (5×10^5 cells) di FRTL-5 (cellule epiteliali di tiroide), trasformate col virus del sarcoma Kirsten-Moloney (KiMol) è stata inoculata nel lato dorsale destro dei topi (n=200) al fine di favorire lo sviluppo di tumori indifferenziati. Tre giorni dopo l'iniezione, i topi sono stati randomizzati e divisi in gruppi di 20 animali ognuno. Nella stessa regione di inoculazione sono stati somministrati un analogo stabile dell'AEA (2-Metil-2'-F-Anandamide, Met-F-AEA) o il 2-AG (5mg/kg), mentre per via sottocutanea sono stati somministrati gli inibitori del metabolismo (VDM-11 o Arachidonoilserotonina, AA-5HT; 5mg/kg o Arvanil 10mg/kg), e un antagonista selettivo del CB₁ (SR141716A, 0.7mg/kg). Dopo venti giorni è stata analizzata la massa tumorale: il diametro è stato misurato con un calibro ed il volume è stato calcolato applicando la formula dell'ellissoide rotazionale $V = A \times B^2/2$ (dove A= diametro assiale, B= diametro rotazionale).

Per lo studio in vivo sulle proprietà antitumorali degli estratti di Cannabis e di alcuni suoi derivati naturali, sono stati utilizzati topi nudi atimici di circa 6 settimane (Charles Rivers, Wilmington, MA). Una sospensione cellulare di 0.2ml (5×10^5 cells)

di FRTL-5 (cellule epiteliali di tiroide), trasformate col virus del sarcoma Kirsten-Moloney (KiMol) è stata inoculata nel lato dorsale destro dei topi (n=6) al fine di favorire lo sviluppo di tumori indifferenziati. Dopo circa due settimane, quando la formazione tumorale è evidente, i composti in esame (5mg/kg per CBD e THC; 6.5mg/kg per CBD-rich e THC-rich) sono stati somministrati agli animali via intratumore due volte a settimana per un periodo di almeno cinque settimane. Al termine del trattamento, gli animali sono stati sacrificati ed è stata misurata la riduzione della massa tumorale. Il CBD (5mg/kg) ed il suo estratto arricchito (6.5mg/kg) sono stati testati anche in un differente modello sperimentale, per questo tipo di esperimenti, infatti, l'inoculo veniva effettuato con una sospensione di 0.2ml (5×10^5 cells) di MDA-MB-231, anziché con KiMol.

Reazione a catena della DNA polimerasi (RT-PCR)

L'espressione degli RNA messaggeri per la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), la ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), la FAAH ed i recettori CB₁ e CB₂ sono stati determinati mediante la tecnica della reazione a catena della DNA polimerasi (RT-PCR). Per l'innesco della reazione sono stati utilizzati i seguenti primer oligonucleotidici:

GAPDH: 5'-CCCTTCATTGACCTCAACTACATGGT-3' (nt 208-233; senso)

5'-GAGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (nt655-677;antisenso)

COX-2: 5'-TGGGAAGCCTTCTCTAACCTCTCCT-3' (nt125-132;senso)

5'-CTTTGACTGTGGAGGATACATCTC-3' (nt 246-254; antisenso)

FAAH: 5'-GTGGTGCT(G/A)ACCCCCATGCTGG-3' (nt469-475;senso)

5'-TCCACCTCCC GCATGAACCGCAGACA-3' (nt561-569; antisenso)

CB₁: 5'-GATGTCTTTGGGAAGATGAACAAGC-3' (nt365-373;senso)

5'-AGACGTGTCTGTGGACACAGACATGG-3' (nt460-468; antisenso)

CB₂: 5'-TTTCCCACTGATCCCCAATG-3' (nt182-188;senso)

5'-AGTTGATGAGGCACAGCATG-3' (nt 285-291; antisenso)

La reazione è stata condotta eseguendo 35 cicli per CB₁, CB₂, FAAH e COX-2 e 28 cicli per GADPH.

Western Immunoblotting

Le linee cellulari in esame sono state omogeneizzate in Dounce con lysis buffer (1mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM Na-*orthovanadate*, 1mM Na-fluorurate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% Triton, 0.25% Na-desoxycholate, 1mM di Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF), 1mg/ml inibitori delle serine proteasi), incubate a 4°C per 30 minuti e centrifugate a 10000xg (20 minuti- 4°C). La concentrazione proteica del supernatante è stata valutata mediante il saggio Bradford. Il supernatante è stato miscelato (4:1 v/v) con il tampone (300mM Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerolo, 500mM ditionitrotolo, 0.05% Bromophenol Blue, 10% SDS) e bollito per 5 minuti prima di essere caricato su un gel di 0.75 mm di spessore. Per la migrazione delle proteine è stata eseguita una corsa elettroforetica (100V- 10mA per 2.5 ore) e le proteine sono state trasferite con Immobilon Protein Transfer a 30mA per tutta la notte a 4°C. La membrana di nitrocellulosa è stata preincubata in tampone (10mMTris-HCl pH 8, 150mM NaCl) al 5% di Non-fat dry milk (Biorad) per 30 minuti per bloccare i legami non specifici, successivamente è stata incubata per un'ora con lo specifico anticorpo primario, lavata (3 volte per 10 minuti) in tampone (10mMTris-HCl pH 8, 150mM NaCl) allo 0.05% di Tween-20 ed infine è stata incubata per un'ora con l'anticorpo secondario coniugato con una perossidasi vegetale (perossidasi di radichchio nero). Dopo un successivo lavaggio (3 volte per 10 minuti), il segnale luminescente è stato analizzato mediante Immun-Star Detection Kit (Biorad). La luce emessa è stata rilevata esponendo il blot ad una lastra

fotografica. Nel caso della determinazione immunoistochimica della Caspasi-3 è stata effettuata anche una stima quantitativa delle bande ottenute. Per l'analisi densitometrica è stato utilizzato il Kodak 1D software (Eastman Kodak Company, New Haven, CT).

Saggio di attività del recettore dei vanilloidi

Questo saggio è in grado di misurare l'ingresso di Ca^{++} in cellule HEK293 (human embryonic kidney) transfettate stabilmente con il recettore umano TRPV1. Le cellule (10×10^5 cell/well) sono state piastrate in multi-well da 6 pozzetti e ambientate in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 a 37°C . Dopo 24h, le cellule sono state incubate per 2h a temperatura ambiente con $500\mu\text{l}$ di una soluzione contenente $4\mu\text{M}$ di Flu-3-meti-estere (Fluo3-AM; Invitrogen, Milano) e Pluronic F-127 (Invitrogen, Milano) allo 0.04%. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate due volte con tampone Tyrode (145 mM NaCl, 2.5mM KCl, 1.5mM CaCl_2 , 1.2mM MgCl_2 , 10mM HEPES, 10mM D-glucosio) a pH 7.4 e risospese, dopo blanda tripsinizzazione in 2ml dello stesso tampone. Le cellule sono state quindi poste in cuvette di quarzo, in continua agitazione, per l'analisi spettrofluorimetrica. Per le letture allo spettrofluorimetro sono state utilizzate le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione del fluoroforo (Fluo3-AM presenta un massimo di assorbimento a 488nm con emissione a 540nm). Come valore di riferimento, per ogni esperimento, oltre alle sostanze da testare, è stata effettuata una lettura in presenza di Ionomicina $4\mu\text{M}$, uno ionoforo del Ca^{++} . L'attività dei composti in esame è stata, infine riportata come percento dell'effetto massimo ottenuto con la ionomicina.

Saggi sul catabolismo dell'anandamide: Uptake Cellulare e Idrolisi

Enzimatica

Per valutare il loro effetto sul metabolismo, le sostanze in esame sono state saggiate per la loro capacità di inibire sia il re-uptake cellulare che l'idrolisi enzimatica dell'anandamide. Per il saggio di uptake, le cellule in esame (CaCo-2 o RBL-2H3) sono state piastrate in multi-well da 6 pozzetti (9×10^5 cell/well) ed incubate, in presenza ed in assenza dei composti in esame a diverse concentrazioni, per 5 minuti sia a 37°C che a 0°C con [14 C]-AEA (2.5 μ M, 10000cpm, 5nCi/nmol) in mezzo senza siero. L'AEA residua nel mezzo di incubazione è stata estratta con 2 volumi di CHCl₃-MeOH (2:1 v/v) e la radioattività associata alla fase organica è stata contata con un β counter (Beckman Coulter, LS 6500 Scintillation Counters, Milano). Tale radioattività è stata utilizzata come misura della quantità di AEA non assimilata dalle cellule. Tenuto conto che a basse temperature (0°C) il flusso di anandamide che entra nelle cellule è dovuto essenzialmente ad un trasporto passivo, l'uptake specifico è stato calcolato sottraendo la radioattività ottenuta a 0°C da quella ottenuta a 37°C (temperatura alla quale l'anandamide entra nelle cellule sia per trasporto passivo, ma soprattutto ad opera dello specifico carrier di membrana). Per minimizzare l'adesione della AEA alla plastica, è stato determinato il legame aspecifico utilizzando 100 μ M di AEA in assenza di cellule; tale valore non è mai risultato superiore al 40%. L'effetto inibitorio dei campioni sull'uptake è stato riportato come K_i (costante di inibizione) calcolata secondo l'equazione di Cheng-Prusoff.

Per il saggio di idrolisi, le cellule in esame (Caco-2 o N18TG2) sono state omogenate in Tris-HCl pH 7.4 e centrifugate per 5min a 800g per allontanare il debree, il surnatante è stato successivamente centrifugato per 30min a 10000g in modo da ottenere la frazione cellulare contenente le membrane (la FAAH è un enzima di

membrana). Le membrane sono state incubate, in presenza ed in assenza dei composti in esame a diverse concentrazioni, per 30 minuti a 37°C con [¹⁴C]-AEA (5µM, 20000 cpm, 5nCi/nmol) in Tris-HCl 50 mM pH=9. La reazione è stata bloccata mediante aggiunta di 2 volumi di CHCl₃-MeOH (1:1 v/v) e la radioattività associata alla fase acquosa (contenente [¹⁴C]-Etanolamina prodotta per idrolisi) è stata contata con un β counter (Beckman Coulter, LS 6500 Scintillation Counters, Milano). L'effetto inibitorio dei campioni sull'idrolisi è stato riportato come K_i (costante di inibizione) calcolata secondo l'equazione di Cheng-Prusoff.

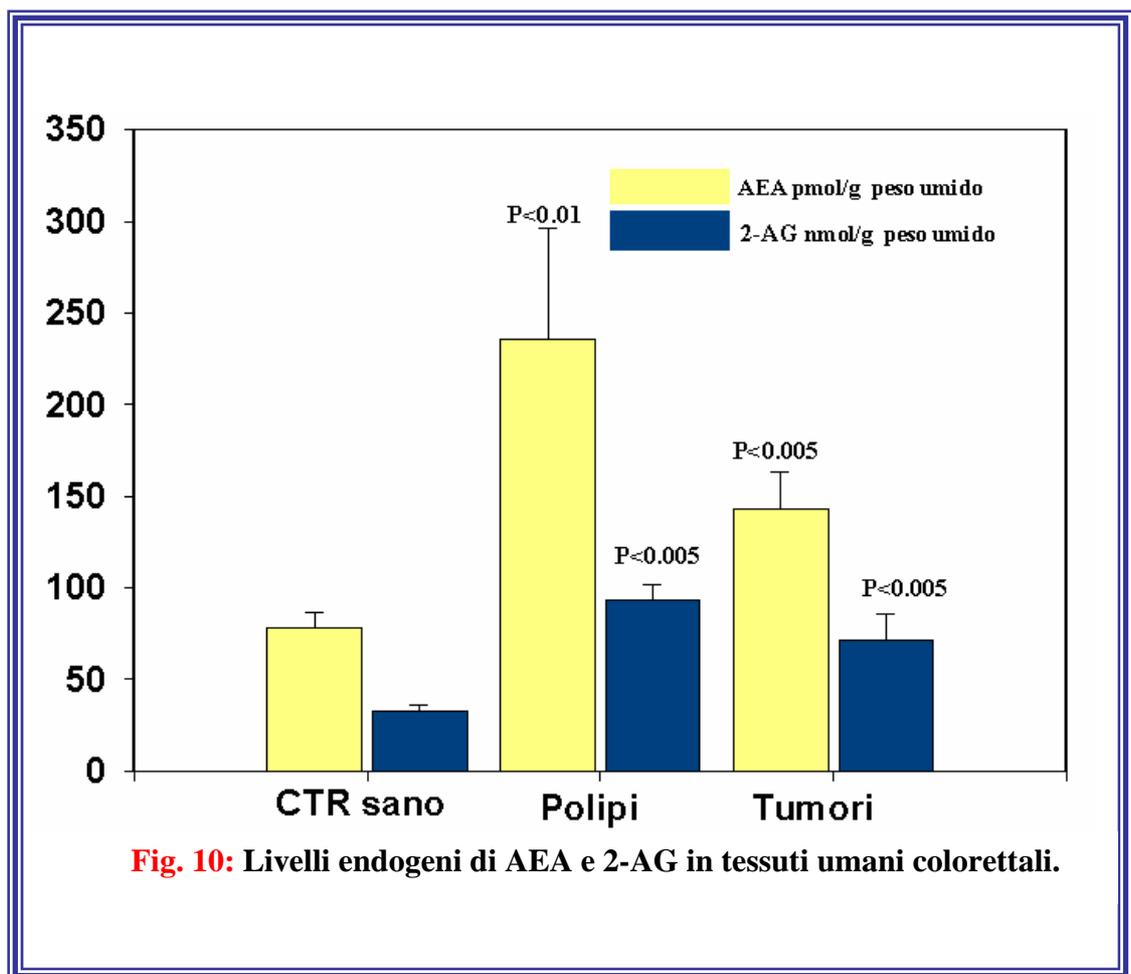
Saggi di binding

Per verificare l'affinità dei composti in esame sul recettore CB₁ sono stati condotti saggi di binding su membrane ottenute da cervelli di ratto maschio (Charles River, Wilmington, MA) in presenza di un inibitore delle proteasi seriniche (100µM, PMSF). Brevemente, i cervelli sono stati omogenati in Tris-HCl pH 7.4 (omogenizzatore a torretta Ultraturax e omogenizzatore glass-dounce) ed in seguito centrifugati (10000g x 30min x 2 volte) per ottenere la frazione cellulare contenente le membrane che è stata incubata (0.4mg/campione), in presenza dei campioni in esame, per 90 minuti a 37°C con [³H]- SR141716A (0.4 nM; 55 Ci/mmol; Amersham). Il binding specifico è stato calcolato per spiazzamento omologo con 1µM SR141716A (84%). La reazione è stata bloccata per diluizione a freddo, i complessi sono stati separati mediante filtrazione (Millipore Filtration System) e la radioattività ad essi associata è stata contata mediante β counter (Beckman Coulter, LS 6500 Scintillation Counters, Milano). I dati sono stati riportati come K_i (costante di dissociazione all'equilibrio), calcolate dal valore di IC₅₀ (concentrazione che esercita il 50% di spiazzamento) utilizzando l'equazione di Cheng-Prusoff.

Risultati I

Espressione del sistema endocannabinoide e livelli endogeni di endocannabinoidi nel carcinoma coloretale

Come anticipato in precedenza nella sezione “Materiali e Metodi”, mediante tecniche di spettrometria di massa, è stato possibile misurare i livelli endogeni degli EC (AEA e 2-AG) nei campioni intestinali ottenuti a seguito di biopsia, e attraverso RT-PCR è stato anche possibile stimare l’espressione dei trascritti di mRNA sia per i recettori dei cannabinoidi che per la FAAH. L’analisi effettuata sui diversi tessuti in esame ha evidenziato un aumento dei livelli di EC nei tessuti trasformati (polipo adenomatoso e carcinoma coloretale) rispetto a quelli non trasformati (mucosa sana) (**Fig. 10**).



Nonostante non sia possibile, per ovvie ragioni, confrontare i livelli di EC fra tessuti adenomatosi e tessuti carcinomatosi derivanti dallo stesso set di pazienti, è interessante notare come ci sia un forte decremento nei livelli di 2-AG e soprattutto di AEA (rispettivamente dalle due alle tre volte inferiori) nel carcinoma rispetto ai polipi adenomatosi, ognuno in paragone con il proprio controllo (mucosa sana circostante). Le variazioni dei livelli di EC riscontrate nei tessuti in esame non erano accompagnate da variazioni nella espressione né dei loro target recettoriali, né dell'enzima principalmente responsabile della loro inattivazione, visto che, quando sono stati analizzati, mediante RT-PCR, i livelli di espressione sia dei recettori cannabinici che della FAAH, non sono state osservate differenze significative fra i tessuti normali e quelli trasformati (**Fig. 11**).

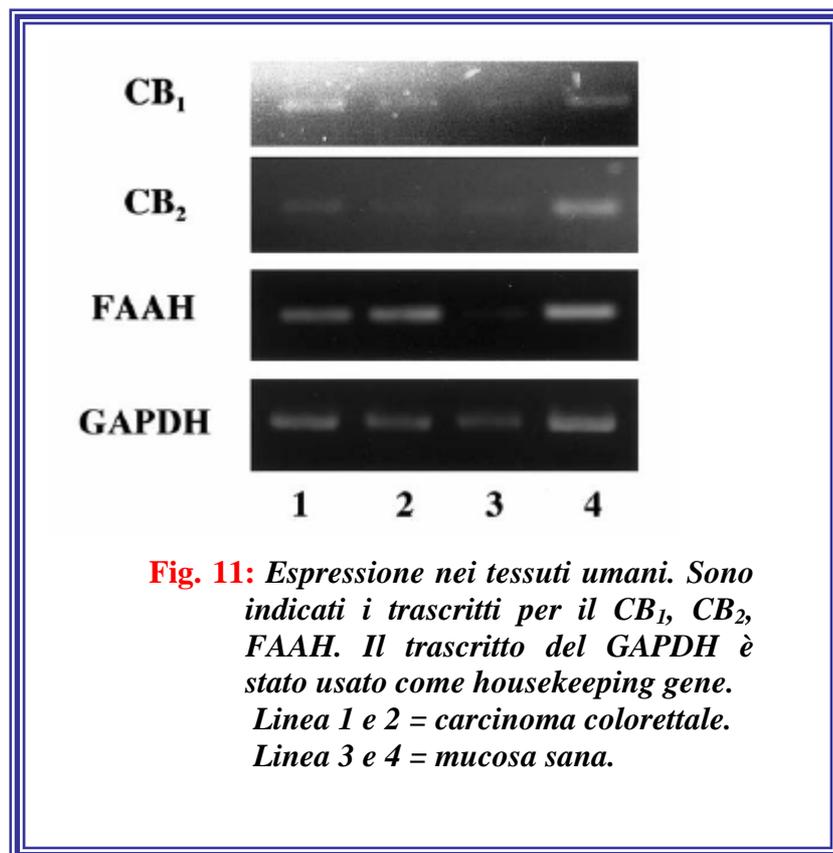
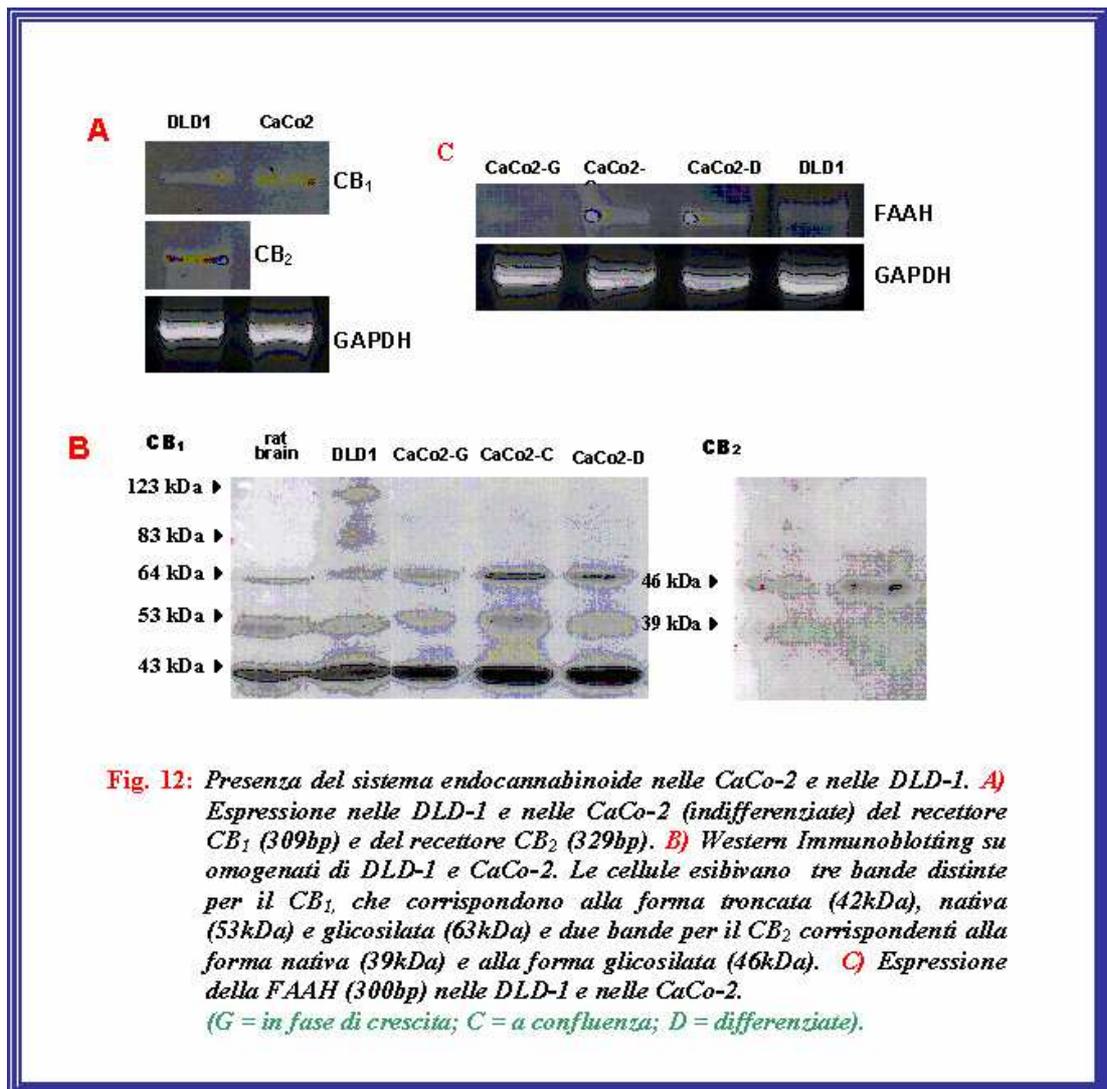


Fig. 11: *Espressione nei tessuti umani. Sono indicati i trascritti per il CB₁, CB₂, FAAH. Il trascritto del GAPDH è stato usato come housekeeping gene. Linea 1 e 2 = carcinoma coloretale. Linea 3 e 4 = mucosa sana.*



La verifica della presenza del sistema EC è stata eseguita anche sulle due linee cellulari di carcinoma del colon (Caco-2 e DLD-1) utilizzate per gli studi in vitro. Il risultato della RT-PCR ha evidenziato che entrambe le linee cellulari esprimono il recettore CB₁ anche se la banda di espressione delle DLD-1 appare meno intensa di quella mostrata per le CaCo-2 (**Fig. 12A**). Su quest'ultima linea cellulare, il Western Immunoblotting non solo ha confermato la presenza del CB₁ mostrando chiaramente le tre bande corrispondenti alle tre forme del recettore (troncata, nativa e glicosilata), ma ha anche evidenziato che i livelli del recettore si mantengono inalterati nel corso del differenziamento cellulare (**Fig. 12B**). L'analisi RT-PCR ha inoltre evidenziato una differenza più marcata fra le due linee cellulari in esame; infatti, le CaCo-2 non

sembrerebbero esprimere il recettore CB₂, mentre le DLD-1 presentano chiaramente la banda corrispondente (**Fig. 12A**). In merito all'espressione della FAAH è stato notato, con interesse, che entrambe le linee cellulari presentano gli mRNA per questa idrolasi, ma, nel caso delle CaCo-2 si osserva un aumento significativo della espressione durante tutto il differenziamento cellulare (**Fig. 12C**). L'analisi di spettrometria di massa eseguita su cellule (CaCo-2) indifferenziate in presenza ed in assenza di noti inibitori del metabolismo quali VDM11 (inibitore del re-uptake cellulare di AEA) e AA-5HT (inibitore della FAAH), ha rivelato che queste cellule contengono livelli apprezzabili sia di AEA che di 2-AG (**Tab. 2**). In perfetto accordo con l'aumento nell'espressione della FAAH, riscontrato mediante RT-PCR durante il differenziamento, l'analisi LC-MS ha confermato una riduzione dei livelli di AEA e 2-AG nelle cellule differenziate (**Tab. 2**).

	AEA pmol/g tessuto	2-AG pmol/g tessuto
CaCo-2 D	10.8 ± 3.0	107.1 ± 3.5
CaCo-2 G	41.0 ± 7.6	208.0 ± 45.1
VDM11	70.0 ± 2.6	400.0 ± 121.0
AA-5HT	107.6 ± 36.9	405.0 ± 130.5

Tabella 2: Sono mostrati gli effetti del trattamento di 24h con veicolo (MeOH, 0.1%), VDM11 (10µM) e AA-5HT (10µM). I dati sono riportati come pmol/g tessuto umido ed esprimono la media ± es (n = 3).

CaCo-2 **D** = differenziate

CaCo-2 **G** = in fase di crescita

Effetto degli endocannabinoidi sulla proliferazione cellulare

Le cellule CaCo-2 costituiscono un ottimo modello per lo studio del cancro del colon, in quanto sono in grado di differenziare spontaneamente in enterociti, cioè in cellule meno maligne, una volta raggiunta la confluenza. Prima di valutare l'effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione cellulare delle CaCo-2, è stato necessario distinguere con esattezza le varie fasi del differenziamento. Per tale motivo è stato condotto un time-course per misurare i livelli di attività della saccarasi (un marker tipico degli enterociti) che ha permesso di identificare nel 12° giorno l'inizio del differenziamento cellulare (**Fig.13**).

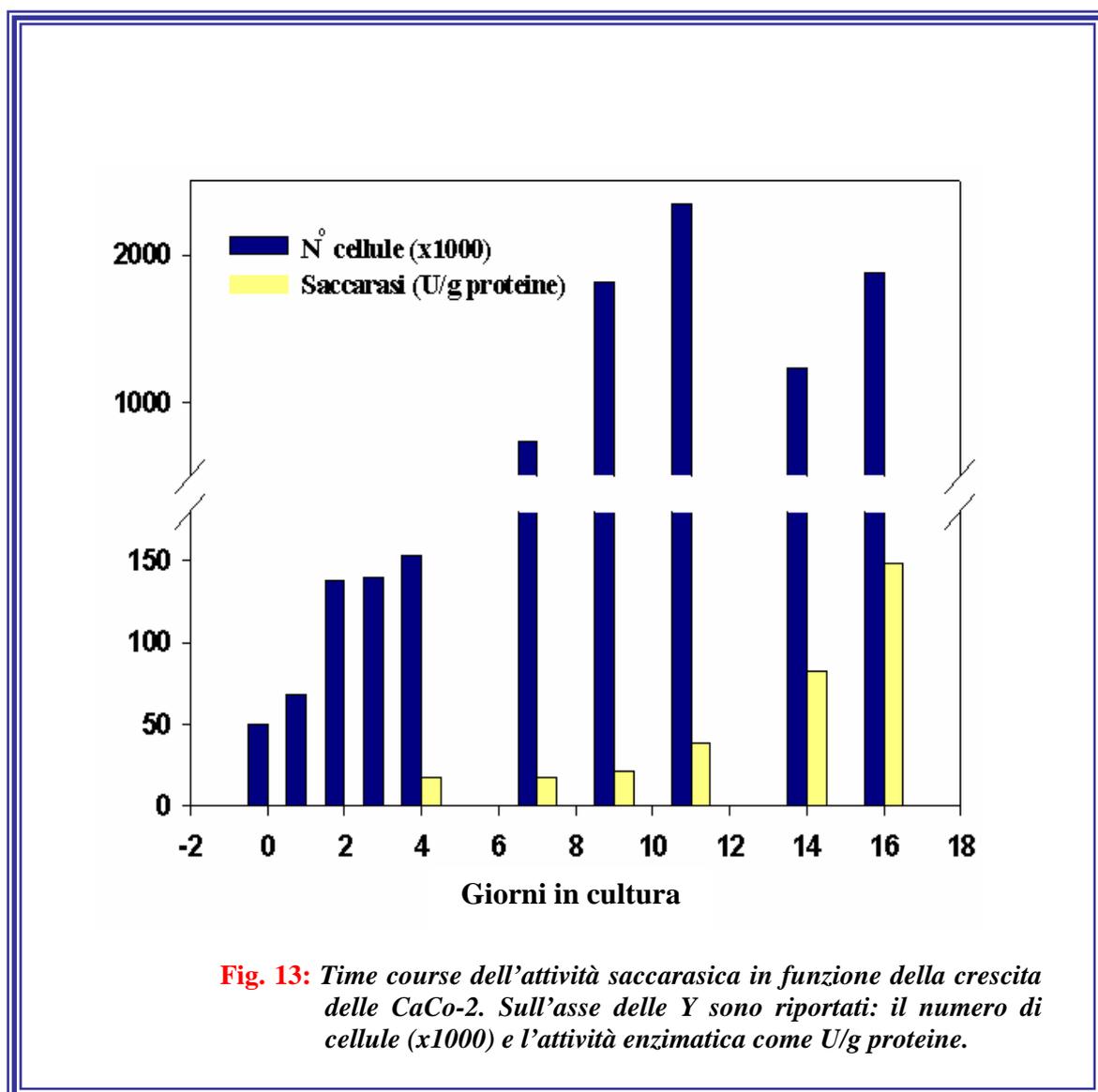


Fig. 13: *Time course dell'attività saccarasica in funzione della crescita delle CaCo-2. Sull'asse delle Y sono riportati: il numero di cellule (x1000) e l'attività enzimatica come U/g proteine.*

	DLD-1	CaCo-2 G	CaCo-2 D
AEA 2.5μM	40.2 ± 5.4	73.0 ± 3.1	4.0 ± 2.2
2AG 1μM	25 ± 3.1	58.4 ± 1.5	NT
2-AG 2.5μM	40.7 ± 3.8	76.2 ± 0.1	NT
HU210 0.1μM	0.2 ± 1.5	81.7 ± 1.9	9.4 ± 2.8
HU210 1μM	42.9 ± 3.5	NT	NT
HU210 1μM + SR₁	20.2 ± 2.2	NT	NT
HU210 1μM + SR₂	11.3 ± 4.2	NT	NT
BML190 1μM	33.5 ± 3.1	9.3 ± 4.5	NT
BML190 1μM + SR₂	9.5 ± 4.1	NT	NT
Indometacina 25μM	78.0 ± 0.9	89.7 ± 2.8	NT
Indometacina 25μM + 2-AG 1μM	NT	70.4 ± 3.8	NT
Indometacina 25μM + 2-AG 2.5μM	NT	82.3 ± 2.1	NT
Indometacina 25μM + SR₁	38.5 ± 3.1	NT	NT

Tabella 3: *Effetto sulla proliferazione di cellule di carcinoma del colon. I dati sono espressi come % di inibizione della proliferazione cellulare. SR₁=SR141716A; SR₂=SR144528; NT=non testato.*

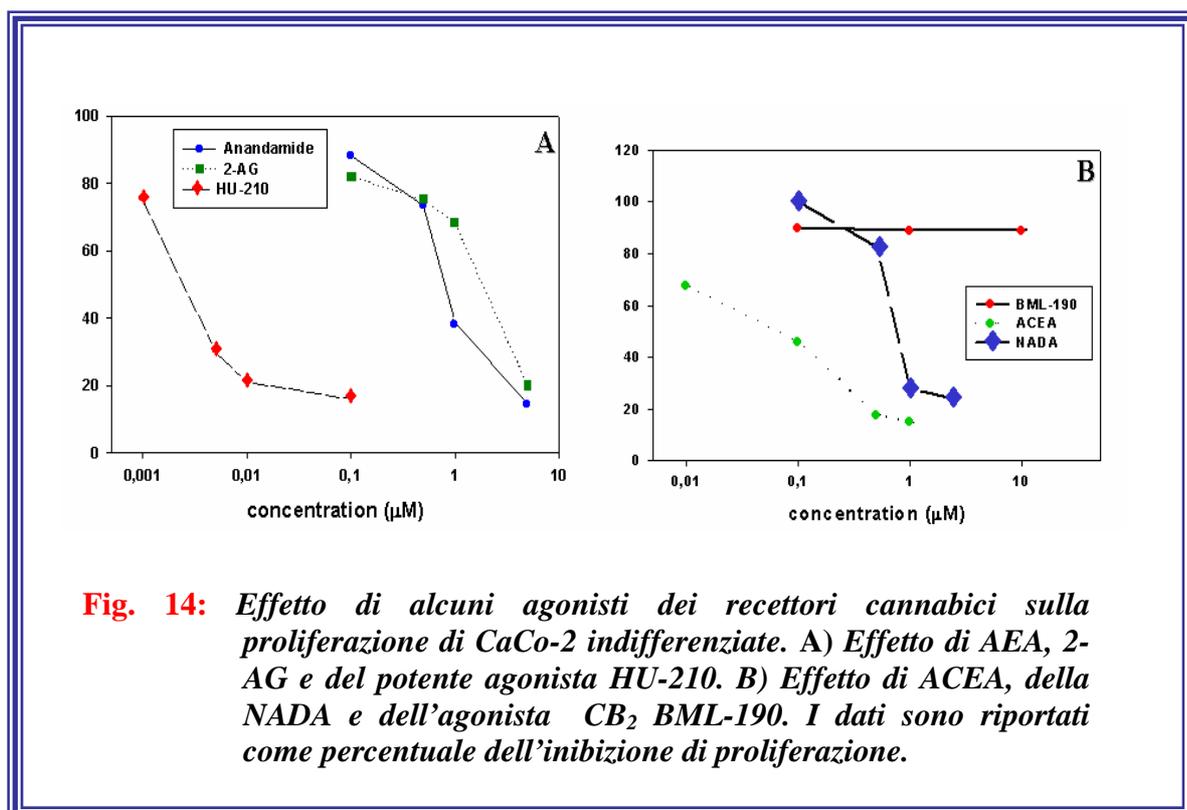
CaCo-2 G = in fase di crescita

CaCo-2 D = differenziate

Sia AEA che 2-AG inibivano la proliferazione delle CaCo-2 indifferenziate con valori di IC_{50} rispettivamente di $1\ \mu\text{M}$ e $2.5\ \mu\text{M}$ (**Tab. 3**). Gli stessi EC, testati sino ad una concentrazione di $5\ \mu\text{M}$, non mostravano alcuna tossicità (misurata secondo il metodo del Trypan blue) e nessun effetto induttivo sull'apoptosi (verificato mediante FACScan). Ancor più interessante è stato l'effetto di HU-210 (potente agonista CB_1) che ha inibito la crescita delle CaCo-2 indifferenziate con una potenza decisamente maggiore mostrando valori di IC_{50} di 50nM (**Tab. 3** e **Fig.14A**). Per verificare se l'effetto antiproliferativo osservato era mediato dall'attivazione dei recettori dei cannabinoidi, sono stati testati anche altri composti (ACEA, NADA e BML-190) con diversa affinità per i recettori CB_1 e CB_2 , infatti, ACEA e NADA (più selettivi verso il CB_1) erano in grado di inibire la crescita delle CaCo-2 indifferenziate, ma BML-190 (più selettivo verso il CB_2) era inattivo (**Fig.14B**) lasciando intuire che l'effetto antiproliferativo era dovuto ad un coinvolgimento diretto del recettore CB_1 . Tale ipotesi è stata, in seguito, confermata anche mediante l'uso di antagonisti selettivi, infatti l'effetto di AEA, HU-210 e NADA veniva revertito dallo specifico antagonista CB_1 (SR141716A, $0.2\ \mu\text{M}$) mentre lo stesso effetto rimaneva inalterato in presenza dello specifico antagonista CB_2 (SR144528, $0.2\ \mu\text{M}$) (**Fig. 15**). Anche un inibitore selettivo della COX-2, l'indometacina, era in grado di inibire la proliferazione cellulare, sia delle CaCo-2 indifferenziate che delle DLD-1 (**Tab. 3**). L'effetto antiproliferativo osservato sulle cellule indifferenziate non era sinergico con quello mostrato dal 2-AG, ma occlusivo suggerendo che i due composti dividevano lo stesso meccanismo d'azione. L'effetto riportato sulle DLD-1, invece, era revertito dall'antagonista selettivo del CB_1 .

L'Efficacia di questi composti precipitava drasticamente quando si utilizzavano le cellule differenziate, infatti queste sostanze non mostrano nessun effetto sulla proliferazione degli enterociti (**Tab. 3**).

L'effetto di AEA, 2-AG, HU-210 e BML-190, in presenza ed in assenza degli antagonisti CB₁ e/o CB₂, è stato analizzato anche sulla proliferazione delle DLD-1 (cellule di adenocarcinoma di colon che non sono soggette a differenziamento). In questa linea cellulare, sebbene con un'efficacia minore rispetto a quella osservata nelle CaCo-2, l'inibizione della crescita sembrava essere dovuta all'attivazione di entrambi i recettori cannabinici essendo l'effetto di HU-210 revertito sia da SR141716A che da SR144528, due antagonisti selettivi rispettivamente per il recettore CB₁ e CB₂ (**Tab. 3**).



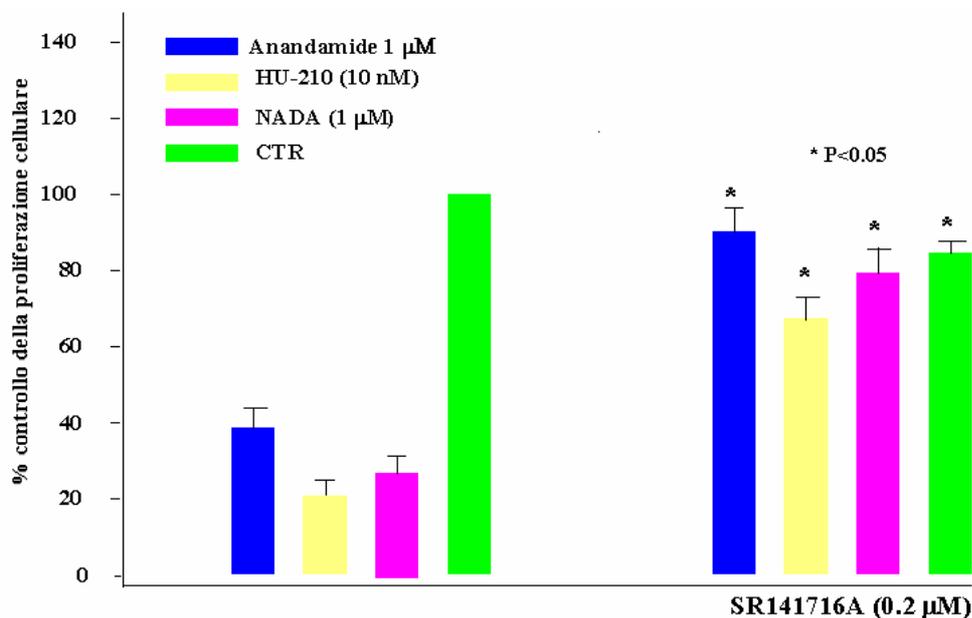


Fig. 15: *Effetto degli antagonisti dei recettori cannabinici sull'azione antiproliferativa di AEA, HU-210 e NADA.*

Effetto degli inibitori del catabolismo sulla proliferazione cellulare delle CaCo-2

Lo studio, condotto in vitro, sulla proliferazione sia delle CaCo-2 che delle DLD-1, aveva evidenziato che gli EC erano in grado di inibire la loro proliferazione essenzialmente attraverso l'attivazione dei recettori cannabinici. Il successivo passo verso la comprensione del ruolo svolto dagli EC nello sviluppo di questo tumore è stato quello di verificare, quindi, la presenza dei sistemi metabolici degli EC per poter in seguito analizzare l'effetto degli inibitori del metabolismo proprio sulla proliferazione cellulare. Questa ultima analisi è stata condotta utilizzando

esclusivamente le CaCo-2 indifferenziate, avendo, queste cellule, mostrato i risultati più promettenti.

Membrane ottenute da CaCo-2 indifferenziate sono state in grado di idrolizzare [¹⁴C] AEA (5μM, 20000 cpm, 5nCi/nmol) a pH alcalino (pH 9.5) esibendo un'attività enzimatica pari a 93.6 ± 11.4 pmol/mg prot/min e tale attività enzimatica veniva inibita in maniera concentrazione dipendente dalla AA-5HT (IC₅₀ ~ 9μM). Cellule intatte, invece, erano in grado di ricaptare [¹⁴C]AEA (2.5μM, 10000 cpm, 5nCi/nmol) dal mezzo di incubazione in maniera saturabile e dipendente dalla temperatura (67.0 ± 3.2 pmol/min/10⁶cells ovvero 111.7 ± 5.3 pmol/min/mg prot); tale trasporto veniva bloccato in maniera concentrazione dipendente dal VDM11 (IC₅₀ 3 μM).

Gli inibitori dell'idrolisi e dell'uptake (rispettivamente, AA-5HT e VDM11) sono stati quindi saggiati sulla proliferazione cellulare dove si sono svelati in grado di inibire la crescita delle CaCo-2 indifferenziate; l'effetto antiproliferativo ottenuto rispecchiava perfettamente l'azione dei due inibitori sull'idrolisi e sul trasporto intracellulare come si evince dalla sovrapposibilità delle due curve (**Fig. 16A e B**), ed era accompagnato da un aumento di livelli di AEA e 2-AG nelle cellule (**Fig. 17**). Infine, a conferma definitiva del fatto che gli inibitori agivano sulla proliferazione provocando un aumento dei livelli endogeni degli EC che a loro volta attivavano i recettori cannabici, è stata ottenuta una reversione dell'effetto antiproliferativo quando questi composti sono stati somministrati insieme con SR141716A (0.2 μM) (**Fig. 16A e B**).

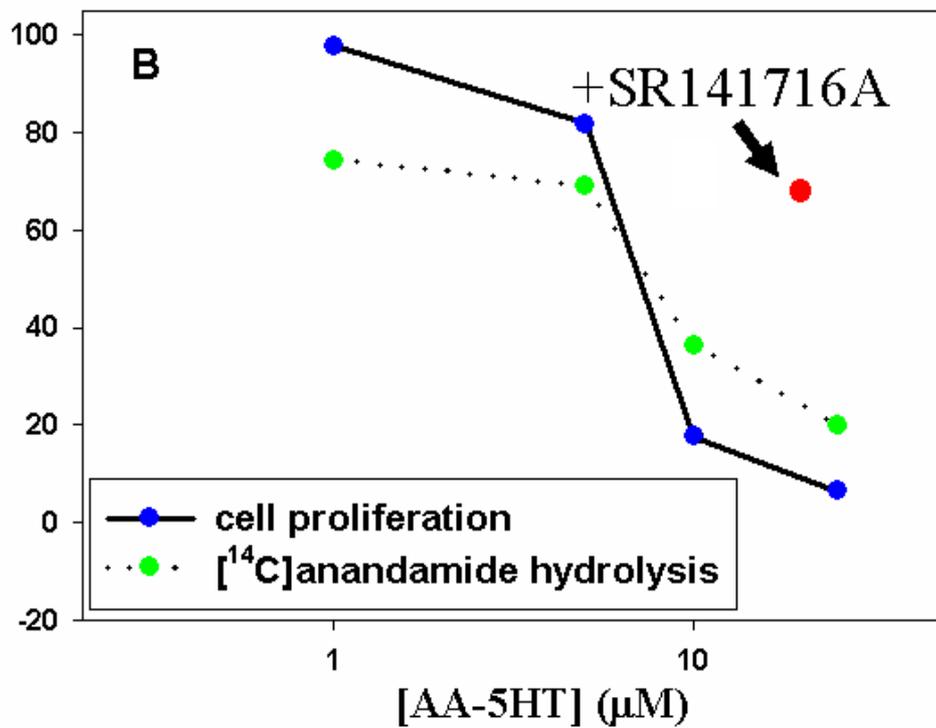
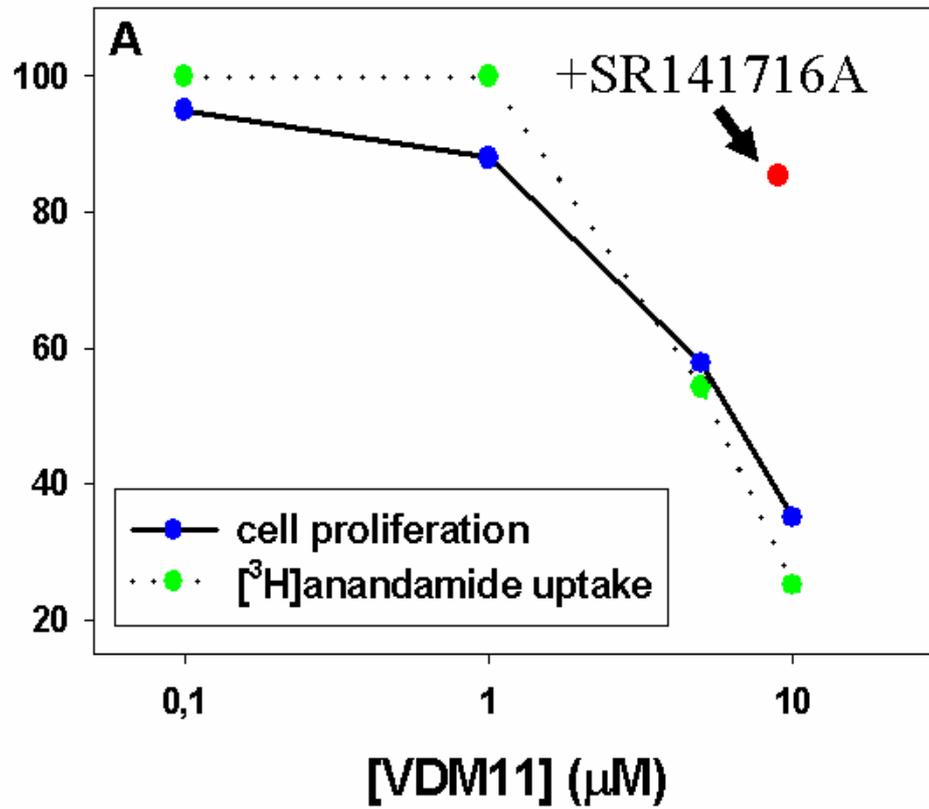


Fig. 16: Effetto di VDM11 (A) e di AA-5HT (B) sulla proliferazione di CaCo-2 indifferenziate. I dati sono riportati come percentuale di inibizione della proliferazione.

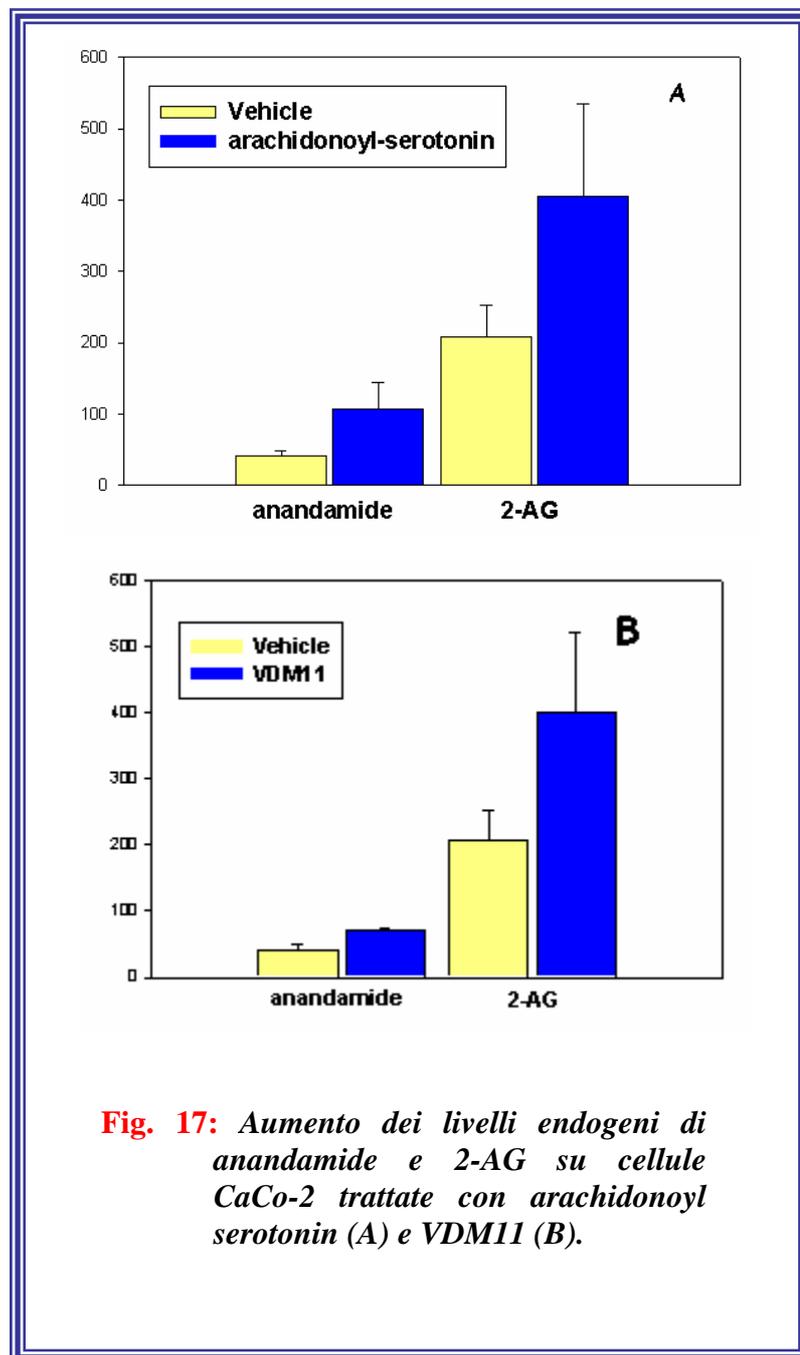


Fig. 17: Aumento dei livelli endogeni di anandamide e 2-AG su cellule CaCo-2 trattate con arachidonoyl serotonin (A) e VDM11 (B).

Effetto degli inibitori del catabolismo degli endocannabinoidi in un modello animale di tumore della tiroide

Alla luce dei risultati ottenuti sui tessuti e sulle linee cellulari, in considerazione del fatto che i livelli degli EC sono così pronunciati nei tessuti tumorali e che questi mediatori sono in grado di inibire tonicamente la proliferazione di cellule tumorali, si poteva ipotizzare che gli inibitori del metabolismo degli EC erano capaci di bloccare la crescita tumorale anche in vivo. A tale scopo sia Met-F-AEA che VDM11 e AA-5HT (tutti alla dose di 5mg/Kg) sono stati testati su un modello sperimentale di epiteloma della tiroide. La prima somministrazione aveva luogo sul dorso di topi atimici, durante l'inoculo della sospensione di cellule tumorali (KiMol), mentre le somministrazioni successive avevano luogo per via intra-tumorale due volte a settimana per l'intera durata dell'esperimento (5 settimane). I topi trattati esclusivamente con il veicolo svilupparono sottocute un tumore della taglia di 5-6 mm³, mentre quelli trattati con i composti in esame mostravano un notevole rimpicciolimento della massa tumorale (**Fig. 18**). Per confermare che, anche in vivo, l'effetto inibente era dovuto ad un aumento dei livelli endogeni degli EC nei tessuti tumorali, al termine dell'esperimento, gli animali venivano sacrificati, e sulle masse tumorali erano misurati i livelli endogeni di 2-AG, AEA e PEA mediante l'utilizzo di tecniche di spettrometria di massa (LC-MS). L'analisi ha rivelato che il VDM11 era in grado di aumentare i livelli di 2-AG, ma non di AEA, mentre la AA-5HT si mostrava capace di innalzare i livelli sia di 2-AG che di AEA che di PEA (**Fig. 19**). Il mancato aumento dei livelli di AEA da parte del VDM11 può trovare la sua spiegazione nella maggiore affinità che in vitro questo composto mostra per l'uptake di AEA vs 2-AG; probabilmente sarebbero state necessarie dosi maggiori (> 5mg/Kg) per inibire in vivo il re-uptake cellulare di AEA completamente e quindi

per osservare un innalzamento dei suoi livelli. Di contro, l'inibizione della FAAH per opera dell'AA-5HT era in grado di aumentare, oltre ad AEA, anche i livelli di 2-AG, e in parte anche quelli di PEA, anche se quest'ultima viene idrolizzata specificamente attraverso una diversa idrolasi (la NAAA, *N*-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase) e molto meno mediante la FAAH (Tsuboi et al., 2005).

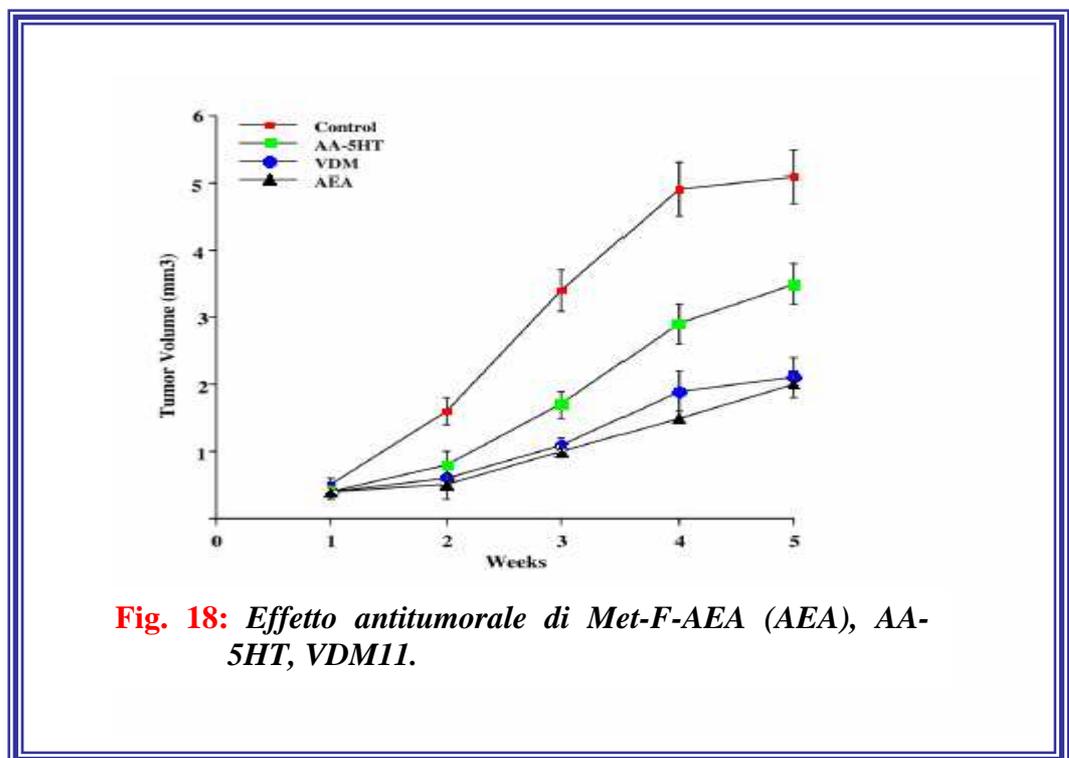


Fig. 18: *Effetto antitumorale di Met-F-AEA (AEA), AA-5HT, VDM11.*

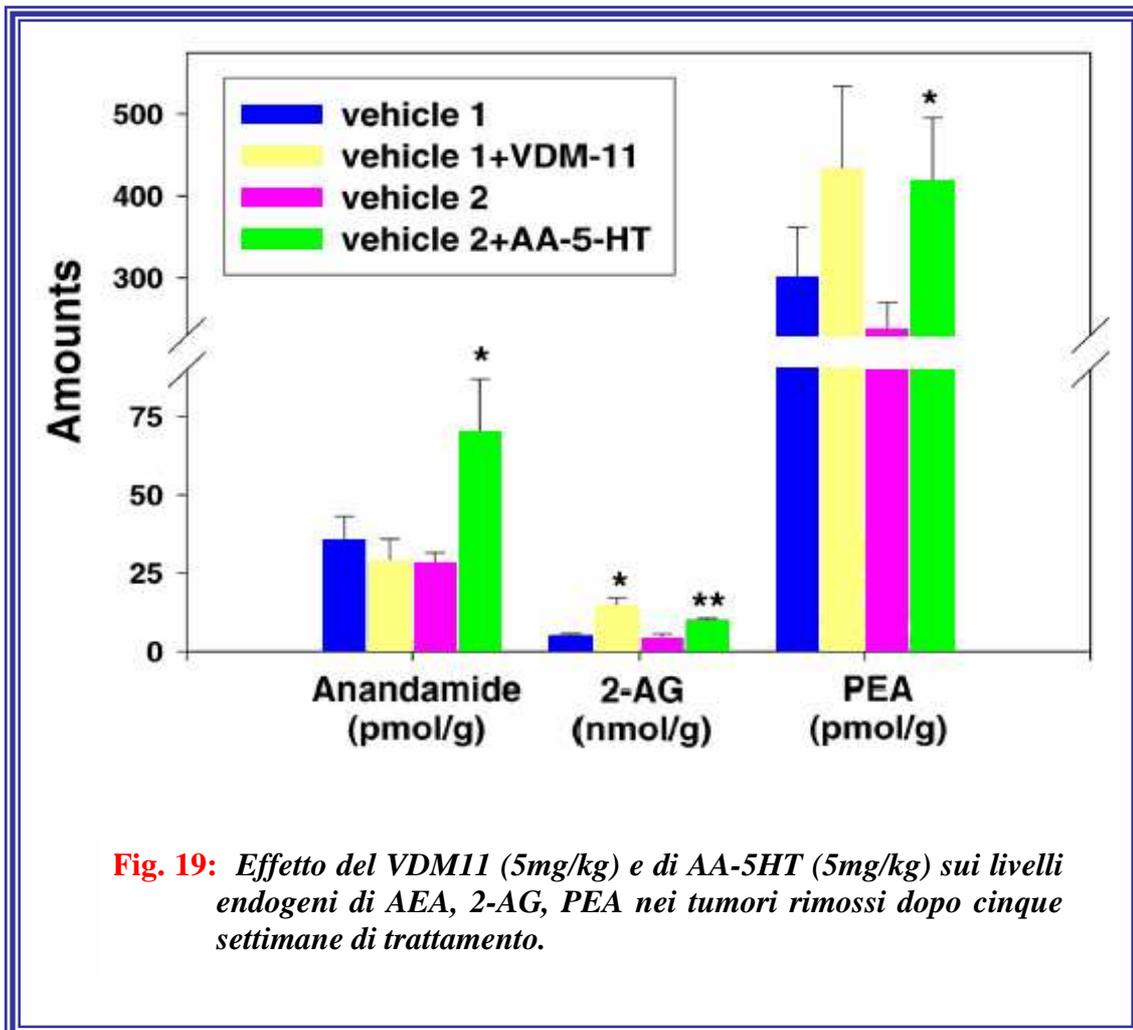


Fig. 19: *Effetto del VDM11 (5mg/kg) e di AA-5HT (5mg/kg) sui livelli endogeni di AEA, 2-AG, PEA nei tumori rimossi dopo cinque settimane di trattamento.*

Risultati II

Effetto antiproliferativo su varie linee cellulari tumorali di fitocannabinoidi ed estratti di Cannabis

Nella seconda parte del mio lavoro di Dottorato mi sono interessata di studiare le proprietà antitumorali di alcuni cannabinoidi di origine naturale. Lo scopo era quello di verificare se, oltre al THC, anche altri fitocannabinoidi potessero mostrare gli stessi effetti antitumorali e se l'utilizzo di estratti arricchiti risultasse più vantaggioso dell'uso del singolo cannabinoide purificato. I cannabinoidi selezionati sono stati: il THC e l'acido corrispondente (THC-A), il cannabidiolo (CBD) e l'acido corrispondente (CBD-A), il cannabigerolo (CBG) ed il cannabicromene (CBC); mentre gli estratti di *Cannabis* utilizzati erano arricchiti in CBD o in THC (CBD-rich, THC-rich). Diversi autori concordano nell'asserire che la diversa potenza dimostrata da questi composti è spesso attribuibile alla linea cellulare in esame e per tale motivo, quindi, è stata verificata l'eventualità di una possibile tessuto-specificità da parte delle sostanze in esame. A tale scopo sono state selezionate otto linee cellulari originate da tumori di diverse specie, tessuti e tipologie. Le linee cellulari utilizzate durante lo studio sono state le seguenti:

- MCF-7 (Tumore: carcinoma della mammella, Origine: uomo)
- MDA-MB-231 (Tumore: carcinoma della mammella, Origine: uomo)
- DU-145 (Tumore: carcinoma della prostata, Origine: uomo)
- KiMol (Tumore: cellule della tiroide trasformate con virus del sarcoma Kirsten-Moloney, Origine: ratto)
- CaCo-2 (Tumore: adenocarcinoma del colon, Origine: uomo)
- RBL-2H3 (Tumore: leucemia, Origine: ratto)
- AGS (Tumore: adeno-carcinoma gastrico, Origine: uomo)
- C₆ (Tumore: glioma, Origine: ratto)

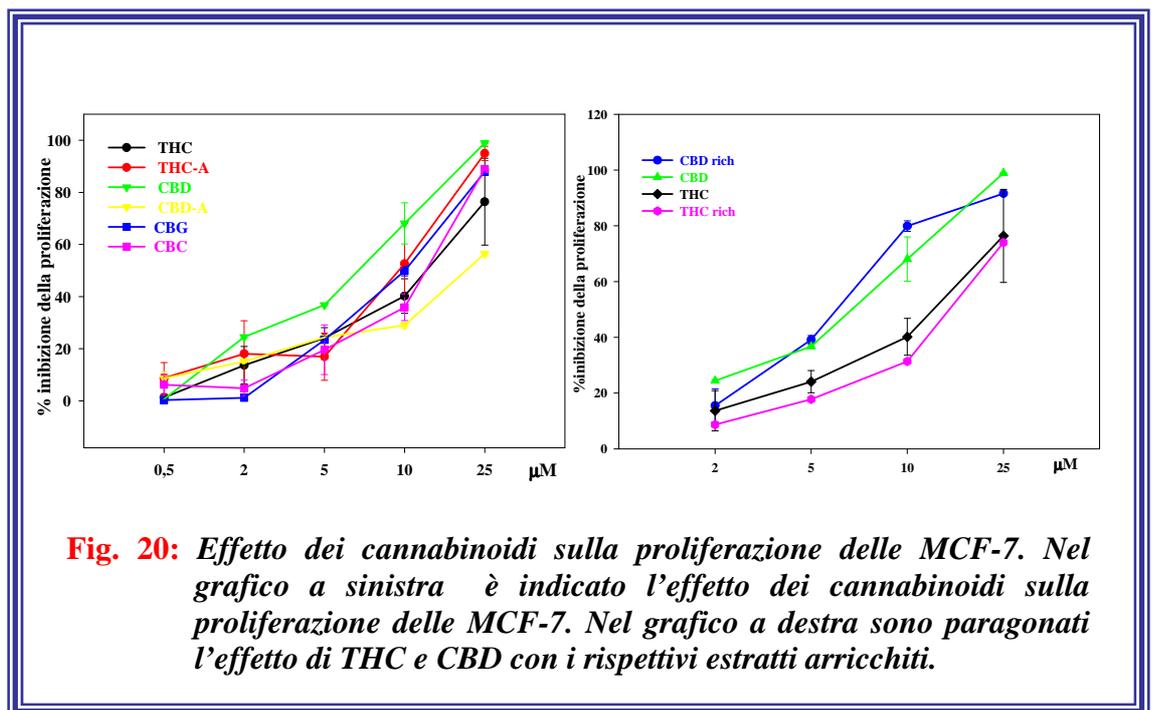
Fra tutti i composti testati sulle diverse linee cellulari, il CBD si è mostrato sempre il cannabinoide più potente nell'inibire la proliferazione cellulare, indicando quindi una mancanza di specificità. L'effetto del CBD appariva dipendente dalla struttura siccome l'acido corrispondente (CBD-A) risultava, in tutti i casi considerati, il cannabinoide meno potente mentre il CBG era sempre il secondo composto per potenza, di solito seguito dal CBC (**Tab. 4**).

	CaCo-2 IC ₅₀ (μM)	MDA-MB-231 IC ₅₀ (μM)	RBL-2H3 IC ₅₀ (μM)	AGS IC ₅₀ (μM)
THC	16.5 ± 0.2	24.3 ± 4.2	15.8 ± 3.7	19.3 ± 1.5
THC-A	21.5 ± 1.4	18.2 ± 5.3	10.0 ± 3.4	25
CBD	7.5 ± 0.5	10.6 ± 1.8	6.3 ± 1.5	7.5 ± 1.3
CBD-A	>25	>25	>25	>25
CBG	9.0 ± 1.4	16.2 ± 2.1	9.0 ± 0.7	8.2 ± 0.7
CBC	12.0 ± 2.4	20.4 ± 2.6	15.8 ± 4.2	18.3 ± 3.0
THC rich	16.0 ± 0.5	25.2 ± 3.3	14.6 ± 3.1	22.0 ± 2.0
CBD rich	12.3 ± 1.2	14.1 ± 1.6	7.0 ± 0.6	10.0 ± 1.9

Tabella 4: *Effetto di alcuni fitocannabinoidi e degli estratti arricchiti sulla proliferazione cellulare. I dati rappresentano IC₅₀ ± es (n=3).*

In seguito sono stati valutati gli effetti dei due estratti arricchiti sull'intera selezione di linee cellulari e in alcuni casi risultava evidente che l'utilizzo del CBD-rich fosse più vantaggioso del CBD. Già sulle cellule MCF-7 (**Fig. 20**), l'estratto di CBD mostrava una maggiore attività anti-proliferativa (IC₅₀ CBD = 8.2μM vs. IC₅₀ CBD-rich = 6.0μM), ma è sulle cellule C₆ di glioma che si osservava la differenza più marcata (CBD-rich IC₅₀ = 4.7μM, CBD IC₅₀ = 8.5μM) (**Fig. 21**).

Solo in un caso, quando è stato analizzato l'effetto sulla proliferazione delle cellule di carcinoma prostatico DU-145, i cannabinoidi stimolavano la crescita delle cellule e presentavano un effetto inibente solo alla più alta concentrazione utilizzata (25 μ M) (Fig. 22). Questo comportamento non era insolito, soprattutto per il THC che di recente, proprio sulle cellule di carcinoma prostatico è stato riportato incoraggiare la proliferazione cellulare (Sanchez et al., 2003). Sorprendentemente, il CBD-rich, pur non mostrando un'elevata potenza nell'inibire la proliferazione delle DU-145, non esibiva un'azione pro-proliferativa, neanche alla più bassa concentrazione testata (2 μ M) (Fig. 22).



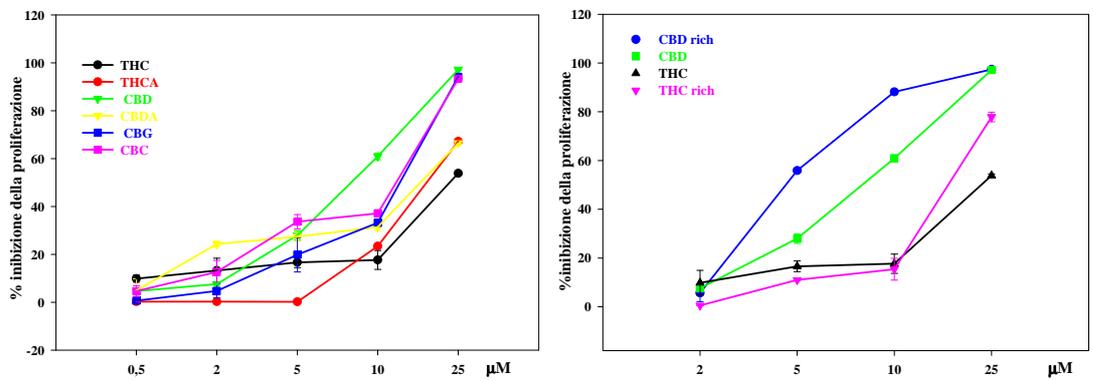


Fig. 21: *Effetto dei cannabinoidi sulle C₆. Nel grafico a sinistra è indicato l'effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione delle C₆. Nel grafico a destra sono paragonati l'effetto di THC e CBD con i rispettivi estratti arricchiti.*

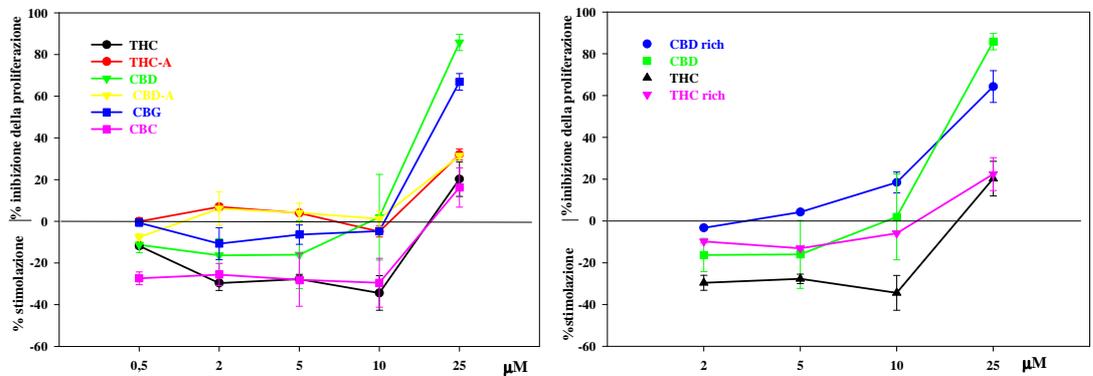


Fig. 22: *Effetto dei cannabinoidi sulle DU-145. Nel grafico a sinistra è indicato l'effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione delle DU-145. Nel grafico a destra sono paragonati l'effetto di THC e CBD con i rispettivi estratti.*

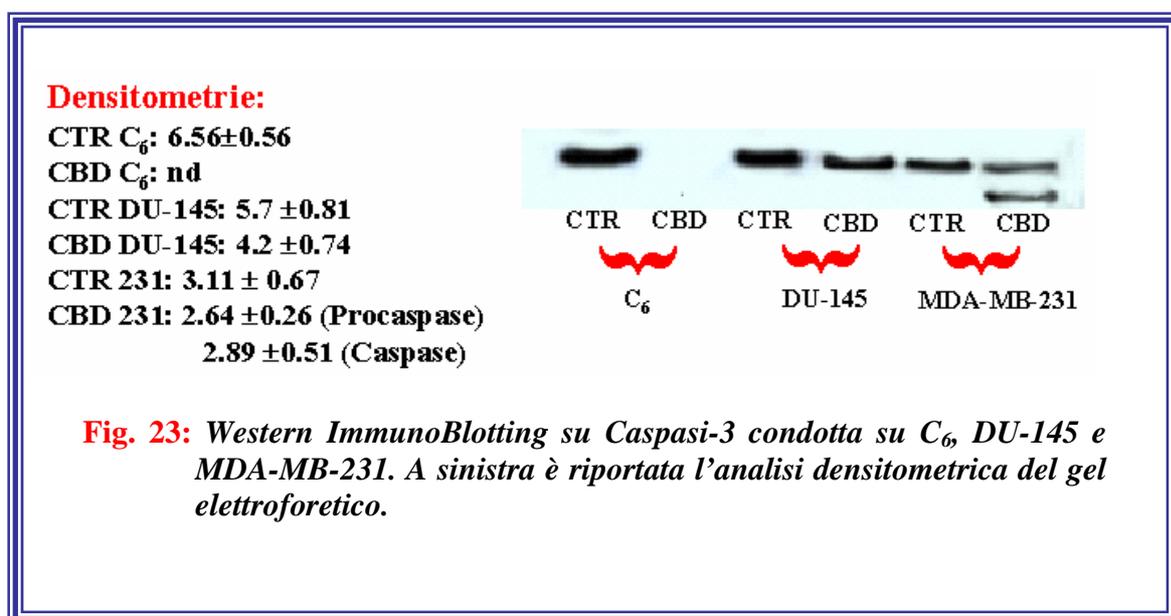
Studi sul meccanismo d'azione cellulare

Una volta stabilita la maggiore efficacia del CBD rispetto agli altri fitocannabinoidi utilizzati, il passo successivo è stato quello di individuare il possibile meccanismo d'azione attraverso cui il CBD esercitava la sua azione anti-tumorale. In genere, l'effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione cellulare è attribuito all'attivazione del recettore CB₁ (su cellule tumorali del tipo "ormone-sensibile"), mentre l'induzione del fenomeno apoptotico è attribuita all'attivazione dei recettori TRPV1 e/o CB₂ (in cellule tumorali del tipo "non-ormone-sensibile"). Per tale motivo è stato verificato, su tutte le linee cellulari, se il CBD era in grado di indurre l'apoptosi. In accordo con le precedenti ipotesi, il CBD esercitava un semplice effetto anti-proliferativo sulle cellule DU-145 e sulle MCF-7 (due linee cellulari del tipo "ormone-sensibile") come dimostrava il dato sull'arresto del ciclo cellulare (**Tab. 5**).

	Arresto ciclo cellulare G₁-S	Apoptosi	Mortalità
AGS	10%	-	-
DU-145	41%	< 2%	-
MCF-7	42%	-	-
C₆	15-57%	9%	45-67%
KiMol	32-75%	12-15%	0-22%
CaCo-2	-	-	18%
RBL-2H3	-	-	70%
MDA-MB-231	-	12%	-

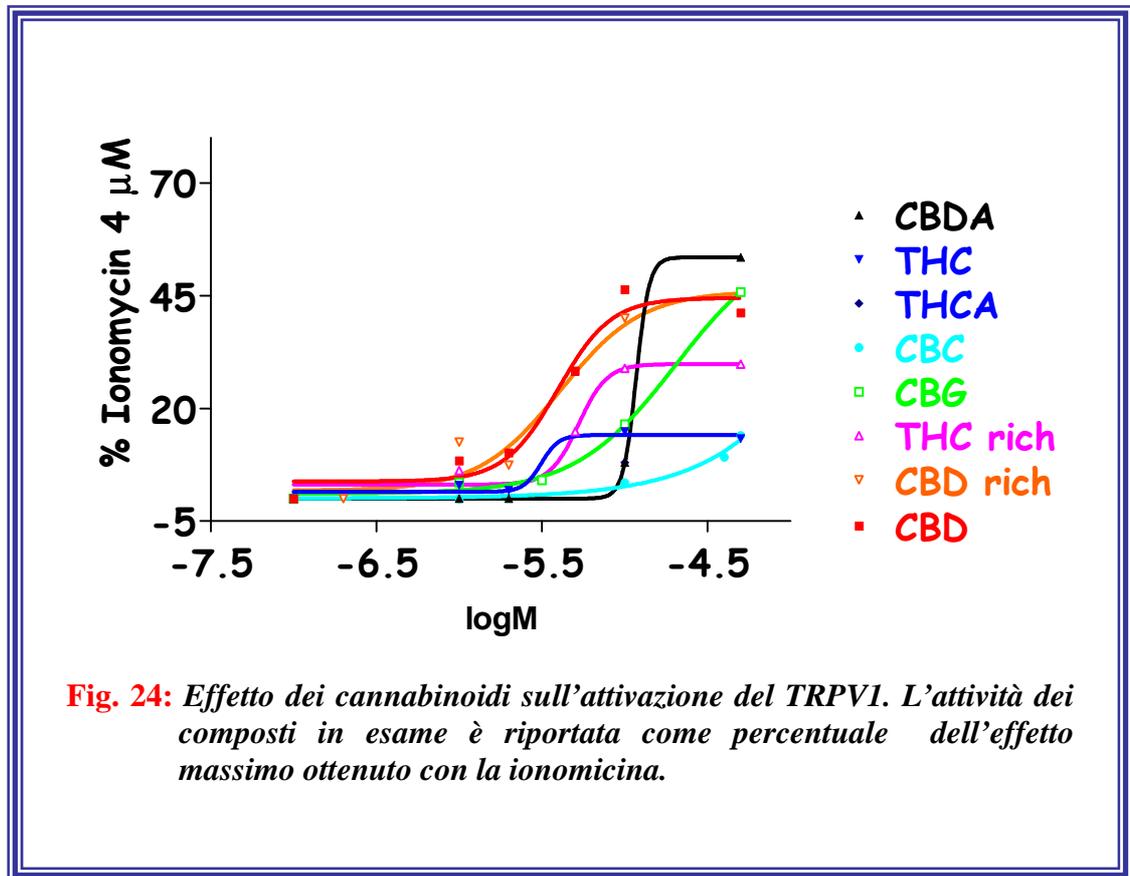
Tabella 5: *Determinazione dell' apoptosi in diverse linee cellulari. Le cellule sono state esposte a 10µMCBD per 48-72h.*

L'effetto del CBD sulle cellule Kimol era, invece, dovuto sia ad un effetto di blocco della proliferazione che all'innescò dell'apoptosi (**Tab. 5**), mentre l'effetto del CBD sulle cellule C₆ e sulle MDA-MB-231 (due linee cellulari del tipo "non-ormone-sensibile") era chiaramente dovuto solo all'induzione dell'apoptosi (**Tab. 5**). L'attivazione della cascata apoptotica sulle cellule MDA-MB-231 è stata anche confermata mediante Western Blotting, l'analisi densitometrica, infatti, rivelava il clivaggio della procaspase-3 che indica appunto l'avvenuto innescò dell'apoptosi in queste cellule (**Fig. 23**).



Per comprendere se i cannabinoidi, laddove inducevano l'apoptosi, agivano per attivazione dei recettori TRPV1, è stato valutato anche il loro effetto sull'influsso di calcio in cellule HEK293 transfettate stabilmente in modo da sovra-esprimere tale recettore. Il CBD ed il CBG si sono mostrati capaci di attivare il recettore dei vanilloidi, ma un'analisi più accurata dei risultati, indicava che quello non poteva essere il meccanismo d'azione predominante giacché anche altri composti (CBG e CBD-A), che non avevano esibito una grande efficacia nell'inibire la proliferazione

cellulare, si erano mostrati egualmente potenti nell'attivare il recettore TRPV1 (Fig. 24).



Studi sul meccanismo d'azione molecolare

Gli studi sui possibili meccanismi di azione molecolare si sono concentrati sui tre composti che erano risultati più promettenti (CBD, CBG e CBD-rich). Dopo aver determinato la presenza di alcune proteine chiave del sistema cannabinoide e vanilloide (FAAH, CB₁, CB₂, TRPV1) mediante RT-PCR (Tab. 6), è stato valutato il loro coinvolgimento nell'effetto antiproliferativo mostrato dai cannabinoidi. Secondo i tipi recettoriali espressi dalle cellule, l'azione anti-proliferativa del CBD 10 μM è stata analizzata in presenza ed in assenza dei rispettivi antagonisti (I-RTX, 100nM, è stato utilizzato come antagonista selettivo del TRPV1, mentre SR141716A, 0.5μM e

SR144528, 0.5 μ M, sono stati utilizzati rispettivamente come antagonista selettivo per CB₁ e CB₂).

mRNA (PCR)	CB ₁	CB ₂	TRPV1
AGS	-	-	+++
DU-145	+	+	+++
MCF-7	+	++	+++
C ₆	++	+	++
KiMol	+	+	++
CaCo-2	+++	+	+++
RBL-2H3	-	+++	-
MDA-MB-231	-	++	+++

Tabella 6: *Espressione del trascritto per CB1, CB2 e TRPV1. (-) = assente; (+)= debole; (++)= medio; (+++)= intenso.*

Fra tutte le linee cellulari in esame, solo nel caso delle MDA-MB-231, i due antagonisti (I-RTX e SR144528), utilizzati singolarmente, determinavano una parziale reversione dell'effetto del CBD; quando era somministrata la miscela dei due antagonisti, l'effetto del CBD si riduceva di circa il 40%, anche se il risultato finale era minimizzato in parte dal fatto che la miscela aveva "per se" un effetto inibente sulla proliferazione cellulare (**Fig. 25**). Sulla base dei risultati ottenuti in precedenza (vedi **Risultati I**), è stato inoltre valutato se i composti in esame potevano esercitare il loro effetto anti-proliferativo attraverso un aumento indiretto dei livelli endogeni degli EC. Per tale motivo è stata valutata la capacità dei cannabinoidi di bloccare il re-uptake cellulare di AEA. I dati ottenuti indicavano chiaramente che non era questo il principale meccanismo d'azione, in quanto il CBD

(che si era distinto come il più potente sulla proliferazione cellulare) dimostrava di essere poco efficace sul trasporto di AEA. Tali risultati confermavano che il meccanismo d'azione molecolare del CBD non poteva essere mediato (né direttamente né indirettamente) dai recettori cannabinici.

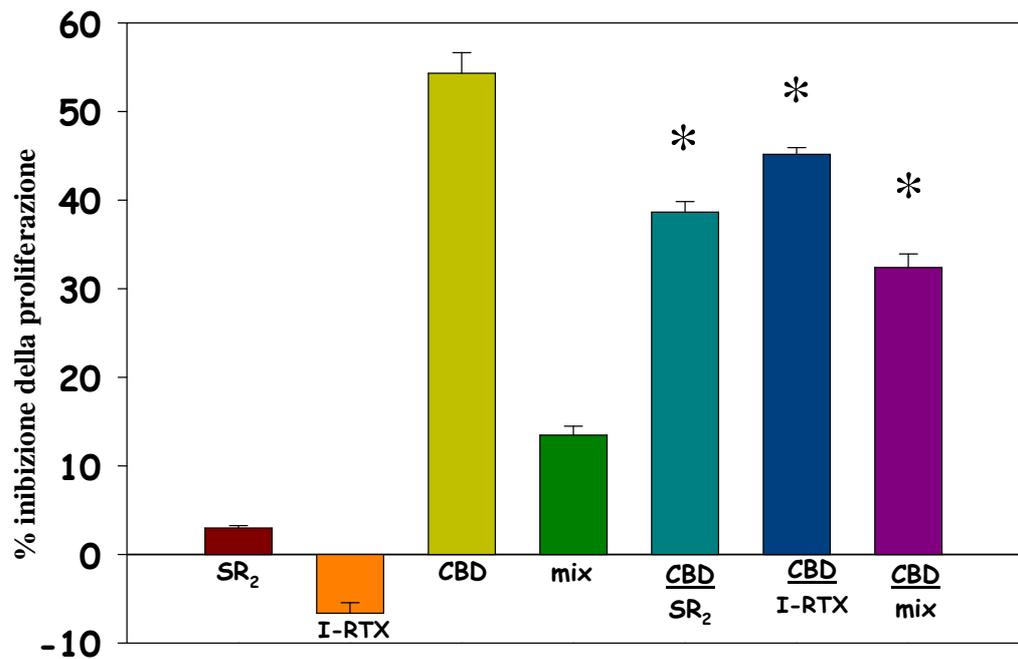


Fig. 25: *Effetto antiproliferativo del CBD 10 μM sulle cellule MDA-MB-231 in presenza di antagonisti (SR₂=SR144528=0.5 μM, I-RTX=100 nM).*

A riprova di tale ipotesi, infatti sono stati condotti ulteriori studi sulle cellule MDA-MB-231 in cui si valutava l'effetto del CBD (5 μM e 25 μM) dopo un'esposizione di 10 minuti ad un potente depletore di colesterolo (0.5 μM, β-metil-ciclodestrina, MCD) capace di distruggere alcuni importanti microdomini di membrana (lipid rafts) e quindi di modificare gli effetti mediati dal recettore CB₁ (Bari et al., 2005). La deplezione di colesterolo dalle membrane non intaccava minimamente l'effetto anti

proliferativo del CBD supportando l'ipotesi che esso non agiva attraverso target di membrana.

Effetto del CBD sullo stress ossidativo

Nella vita di tutti gli organismi aerobici, durante i consueti processi metabolici, specie molecolari come l'anione superossido, il radicale ossidrilico o il perossido di idrogeno sono regolarmente generate. Queste specie molecolari sono indicate generalmente col nome ROS (Reactive Oxygen Species) e se non vengono opportunamente bilanciate da specie antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi, perossidasi, vitamine, ubiquinolo) possono provocare danni fino alla morte cellulare (Scandalios, 2002).

Al fine di verificare se l'effetto antiproliferativo osservato in vitro è correlato a fenomeni di stress ossidativo, è stato analizzato l'effetto di 10 μ M di CBD sulle cellule MDA-MB-231 in presenza di alcuni agenti antiossidanti noti quali la Vitamina C, l'axastantina e l' α -tocoferolo (**Fig. 26A,B,C**); tali molecole sono risultate capaci, seppure in maniera parziale, di prevenire l'effetto del CBD confermando un suo coinvolgimento nello stress ossidativo delle cellule. E' stato verificato, inoltre, se l'azione ossidativa esercitata da CBD dipendeva dalla concentrazione usata o dalla presenza di siero nel mezzo (la deprivazione di siero per 12h dal mezzo di incubazione induce, infatti, una situazione di stress ossidativo). E' stato valutato, quindi, l'effetto del CBD (a concentrazioni micromolari e submicromolari) sulle cellule MDA-MB-231, sia in presenza che in assenza di siero. In assenza di siero, dopo 24h di esposizione, il CBD non presentava alcun effetto a basse concentrazioni (0.5-1 μ M), ed invece esibiva, quando utilizzato ad alte concentrazioni (10-25 μ M), un'azione anti-proliferativa più efficace di quella

osservata in presenza di siero anche se con tempi di trattamento più lunghi. In condizioni “fisiologiche” (in presenza di siero), il CBD a basse concentrazioni esibiva un interessante effetto pro-proliferativo (**Fig. 27**), e mostrava il consueto effetto anti-proliferativo a concentrazioni più alte, sebbene, ovviamente, con minore efficacia di quella osservata con tempi di trattamento più lunghi. Tali risultati indicano chiaramente un comportamento bifasico per il CBD che a concentrazioni medio-alte-micromolari e/o ad esposizioni lunghe sembra agire favorendo la produzione dei ROS, mentre a concentrazioni submicromolari e/o a tempi brevi di esposizione sembra avere un effetto anti-ossidante sulle cellule tumorali.

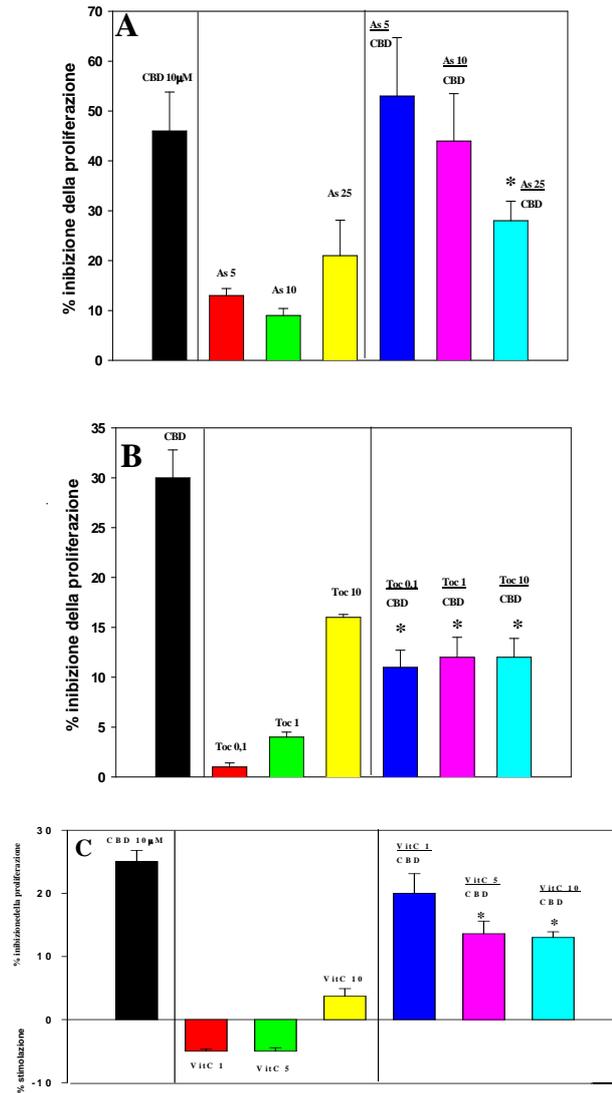


Fig. 26: *Effetto antiproliferativo del CBD sulle MDA-MB-231 in presenza di antiossidanti. A) CBD 10 μ M \pm Asantastina 5-10-25 μ M. B) CBD 10 μ M \pm α -tocoferolo 0.1-1-10 μ M. C) CBD 10 μ M \pm Vitamina C 1- 5-10 μ M.*

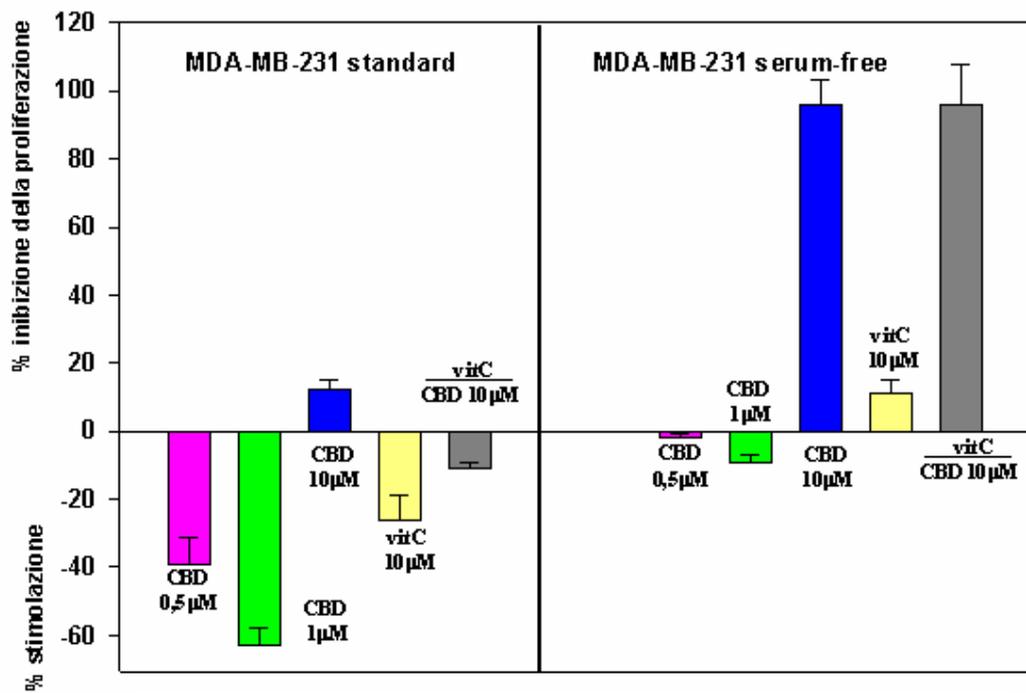


Fig. 27: Azione del CBD sulla proliferazione di MDA-MB-23.

A sinistra è riportato l'effetto in condizioni standard (10% FBS). A destra è riportato l'effetto in condizioni

Effetto antitumorale degli estratti di Cannabis in due modelli animali di tumore

Per valutare se, anche in vivo, l'utilizzo degli estratti arricchiti era più vantaggioso dell'uso dei singoli cannabinoidi, sono stati eseguiti anche alcuni esperimenti su un modello animale di tumore. Ancora una volta, cellule epiteliali di tiroide trasformate col virus del sarcoma Kirsten-Moloney (KiMol), sono state iniettate sotto cute insieme al veicolo (DMSO) o al CBD (5 e 20 mg/kg, intra-tumore, due volte a settimana per 4 settimane). Il CBD, già alla dose più bassa era in grado di ridurre in maniera significativa la massa tumorale asportata al termine dell'esperimento (**Fig. 28**). In un secondo esperimento è stato verificato l'effetto in vivo del CBD-rich (6.5mg/kg, cioè una dose equivalente a circa 5mg/kg di CBD) che si è dimostrato anch'esso capace di ridurre la massa tumorale. Quando è stato valutato l'effetto antitumorale di THC (5mg/kg) e THC-rich (6.5mg/kg), ambedue i composti, non erano in grado di bloccare la crescita del tumore, mostrando invece una tendenza opposta verso la stimolazione (**Fig. 29**).

L'effetto anti-tumorale sia del CBD (5 mg/kg) che del CBD-rich (6.5 mg/kg) è stato analizzato anche in un diverso modello sperimentale. La nuova procedura prevedeva l'inoculo di cellule MDA-MB-231 anziché delle cellule KiMol, questa linea cellulare era stata scelta perché in vitro si era distinta per aver fornito maggiori dati alla comprensione del meccanismo d'azione del CBD. I due preparati, somministrati intra-tumore due volte a settimana per 16 giorni, pur non mostrando grosse differenze di attività, come indica la sovrapponibilità delle due curve, erano capaci di ridurre in maniera significativa la crescita del tumore.

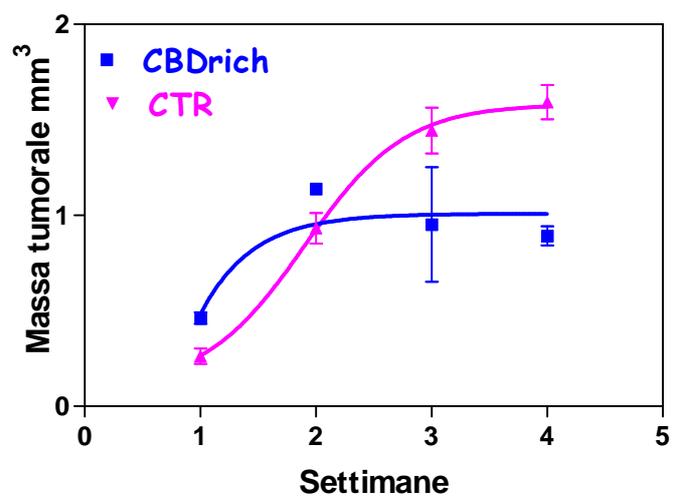
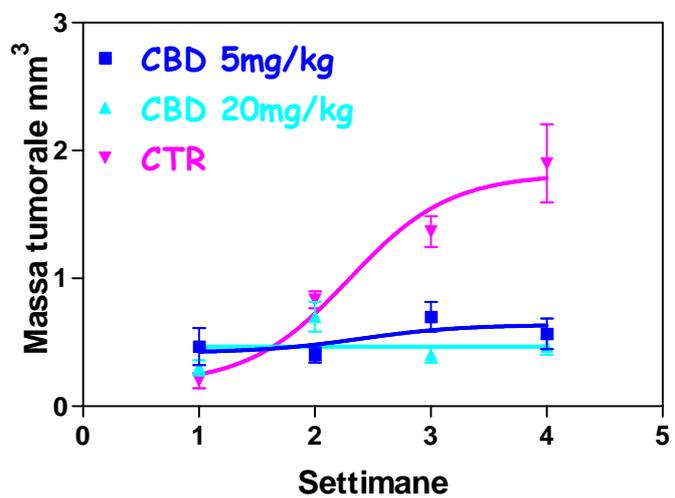


Fig. 28: *Effetto antitumorale di CBD (5 e 20 mg/kg) e CBDrich (6.5 mg/kg) su tumori indotti in topi nudi con inoculo sottocutaneo di cellule KiMol.*

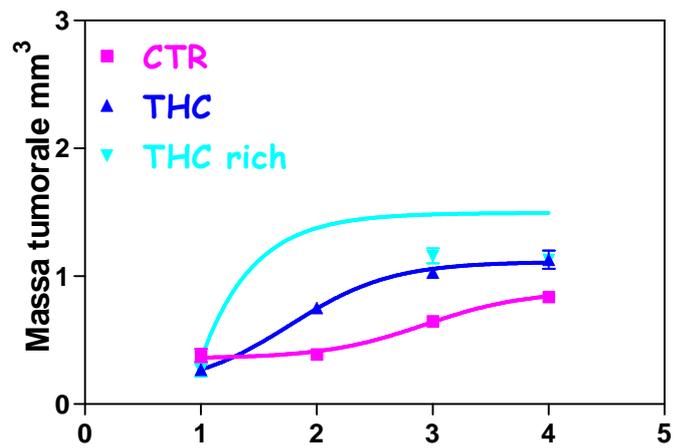


Fig. 29: *Effetto antitumorale di THC (5 mg/kg) e THC rich (6.5 mg/kg) su tumori indotti in topi nudi con inoculo sottocutaneo di cellule KiMol.*

Discussione

Lo scopo principale della presente tesi di dottorato è stato quello di comprendere se fosse possibile sfruttare la nostra conoscenza del sistema EC e dei fitocannabinoidi nel trattamento dei tumori. Durante la prima fase del lavoro di tesi, l'attività di ricerca è stata interamente indirizzata a determinare il ruolo svolto dal sistema EC nello sviluppo del carcinoma coloretale. La biopsia di tessuti umani sottoposti a colonscopia ha permesso di verificarne l'espressione e l'andamento durante la trasformazione neoplastica. In seguito è stato analizzato l'effetto di agonisti dei recettori cannabici e di inibitori selettivi del metabolismo dell'anandamide sulla proliferazione di alcune linee cellulari umane di adenocarcinoma di colon, sia differenziate (enterociti) che non differenziate (più invasive). Per verificare l'efficacia anti-tumorale degli inibitori del metabolismo in vivo, si è scelto di testare queste molecole in un modello animale di tumore completamente diverso, indotto dall'iniezione sottocutanea di cellule di epiteloma tiroideo in topi atimici.

L'interesse verso questo studio è nato dall'osservazione di alcune evidenze sperimentali che suggerivano il coinvolgimento degli EC nel controllo della proliferazione del cancro coloretale. Gli EC possono essere substrati della COX-2, un enzima che sembra essere largamente coinvolto nello sviluppo di questo tipo di tumore (Dempke et al., 2001; Marnett, 2002). L'effetto antiproliferativo mostrato da AEA e, in particolare, dal 2-AG sulle linee cellulari in esame, potrebbe essere dovuto ad una inibizione della produzione di PGs. E' stata inoltre riportata una over-produzione di una particolare classe di acidi lisofosfatidici, in questo tipo di tumore (Merchant et al., 1991; Huang et al., 2002) e tali molecole potrebbero agire da precursori biosintetici del 2-AG (Nakane et al., 2002) giustificandone l'abbondanza nei tessuti tumorali analizzati. Infine, il coinvolgimento dell'oncogene *ras* nello sviluppo del cancro del colon (Smith et al., 2002), permette di ipotizzare che, così

come per le cellule epiteliali trasformate KiMol (Bifulco et al., 2001), anche sulle cellule di adenocarcinoma di colon gli EC agiscono bloccando l'attività della p21.

La presenza del sistema EC nelle mucose di colon umano risulta essere in perfetto accordo con quanto in precedenza riportato sia nel ratto che nel topo (Izzo et al., 2001; Katayama et al., 1997), ma nei tessuti analizzati per questo studio, i livelli di AEA e 2-AG erano molto più alti nei tessuti pro-tumorali e tumorali (polipi adenomatosi e adenocarcinomi) che in quelli sani. Questo aumento dei livelli endogeni corrispondeva ad un aumento delle concentrazioni tissutali locali. La concentrazione di AEA variava da circa 75nM a 143nM o 236nM (rispettivamente per mucosa sana, carcinomi o polipi adenomatosi). L'AEA era eccessivamente prodotta dalle cellule soprattutto nello stadio "pre-tumorale" (i polipi adenomatosi sono il preludio alla formazione del carcinoma) forse per contrastare la crescita tumorale. La sovrabbondanza riscontrata suggerisce, infatti, una precisa risposta cellulare poiché le concentrazioni riscontrate sono tutte di gran lunga superiori a quelle richieste per l'attivazione fisiologica del CB₁ (K_i compreso fra 40-200nM; Pertwee, 1997). La concentrazione di 2-AG variava da 32μM a 71μM o 93μM (rispettivamente per mucosa sana, carcinomi o polipi adenomatosi). Anche se, in questo caso, le concentrazioni basali riportate sono sufficienti per l'attivazione dei recettori cannabici (K_i compreso fra 250-1200nM; Pertwee, 1997), molto probabilmente solo una parte di questo EC agisce a livello recettoriale poiché la restante parte è coinvolta come intermedio del metabolismo dei fosfogliceridi (Di Marzo et al., 2001b). Queste osservazioni possono trovare una spiegazione in alcuni meccanismi biochimici. Infatti, si è visto che nei pazienti affetti da una storia familiare di polipi adenomatosi si riscontra sempre una sovra-espressione di PLA₂ secretorie di gruppo II che sono responsabili della mobilizzazione dell'acido

arachidonico e del remodeling dei fosfolipidi (Kennedy et al., 1998). Questo evento, associato all'osservazione che i livelli di un possibile precursore biosintetico (LPA) del 2-AG aumentano in questo tipo di tumore, se, da un lato, potrebbe generare un aumento delle PGs e una maggiore stimolazione dei recettori dell'LPA, con conseguente effetto pro-tumorale, dall'altro potrebbe contribuire all'aumento degli EC per contrastare la crescita tumorale. L'ipotesi di un possibile ruolo anti-tumorale svolto dagli EC è stata confermata dai risultati ottenuti in vitro. Nelle cellule CaCo-2, infatti, che spontaneamente differenziavano in cultura, gli agonisti del recettore CB₁ (AEA, 2-AG, HU210, ACEA, NADA) inibivano la proliferazione cellulare con una potenza che rispecchiava la loro affinità recettoriale diversamente dall'agonista del recettore CB₂ (BML-190). Il coinvolgimento del recettore CB₁ era confermato dal fatto che l'effetto anti-proliferativo era selettivamente revertito da SR141716A (antagonista CB₁) e non da SR144528 (antagonista CB₂). L'azione di questi agonisti è confermata dall'espressione dei recettori in queste cellule. Le cellule CaCo-2, difatti, non esprimono il CB₂ ma solo il CB₁, mentre le cellule DLD-1 esprimono entrambi i sottotipi ed, infatti, rispondono anche alla stimolazione del CB₂. La banda di espressione del CB₁ nelle cellule DLD-1 mostrava una minore intensità rispetto a quella delle cellule CaCo-2; questo giustificerebbe la differenza di potenza esercitata dagli agonisti nelle due diverse linee cellulari.

L'effetto antiproliferativo, dipendente dall'attivazione dei recettori cannabici, così come la presenza di questi recettori nei tessuti umani analizzati, suggeriva un possibile aumento di EC (soprattutto nello stadio benigno del cancro coloretale) quale risposta cellulare alla progressione tumorale. Visto che gli EC ricoprono un ruolo protettivo nella progressione del polipo adenomatoso, allora qualsiasi intervento capace di aumentarne la produzione o di inibire la loro inattivazione,

potenziando “indirettamente” l’attivazione dei recettori cannabici, dovrebbe arrestare la crescita del tumore. Per tale motivo è stata indagata la presenza dei sistemi deputati al metabolismo dell’AEA nelle cellule CaCo-2, ed è stato valutato anche l’effetto anti-proliferativo di specifici inibitori del metabolismo degli EC. Le cellule CaCo-2 erano, di fatto, in grado sia di sequestrare l’AEA nelle cellule, sia di idrolizzarla enzimaticamente. Il VDM11 e l’AA-5HT inibivano con uguale potenza i due processi metabolici e la proliferazione cellulare; l’effetto sulle cellule era dovuto all’aumento degli EC come dimostravano sia l’analisi quantitativa dei livelli di EC che la reversione dell’effetto antiproliferativo da parte degli antagonisti recettoriali.

Un altro aspetto preso in considerazione in questo studio, è stato quello di verificare se la recettività delle cellule CaCo-2 agli EC fosse dipendente dal differenziamento (AEA e HU210 non inibivano la crescita delle cellule indifferenziate). In effetti, nel corso del loro differenziamento, le CaCo-2 aumentavano notevolmente l’espressione della FAAH, ma mantenevano inalterata l’espressione del CB₁. Questo spiegherebbe la diminuita attività dell’AEA negli enterociti, ma, per spiegare l’inefficacia di HU210 sulle stesse cellule, si dovrebbe ipotizzare che, nel corso del differenziamento, il CB₁, pur continuando ad essere espresso, perda la sua funzionalità. La maggiore sensibilità agli EC delle cellule indifferenziate rispetto agli enterociti ed alle DLD-1 (cellule meno invasive e maligne) può essere spiegata anche dalla possibilità di target cellulari diversi dai recettori dei cannabinoidi (ad es. COX-2). Ad ogni modo, tenuto conto che i livelli endogeni degli EC sono inferiori nelle cellule meno maligne e che, in queste cellule, non si osserva l’azione antiproliferativa degli EC esogeni, allora è lecito postulare per gli EC un’azione protettiva nella progressione tumorale.

I risultati ottenuti sui tessuti bioptici e sulle linee cellulari di carcinoma coloretale hanno lanciato le basi per lo studio che è stato condotto in seguito. Dal momento che i livelli degli EC sono così pronunciati nei tessuti tumorali e che gli EC sono in grado di inibire tonicamente la proliferazione di cellule tumorali, allora gli inibitori del metabolismo dovrebbero essere capaci di bloccare lo sviluppo tumorale anche in vivo. Queste molecole, infatti, sono in grado di innalzare il tono EC preferenzialmente a livello tumorale, dove gli EC sono prodotti per contrastare la proliferazione delle cellule cancerogene. Per tale motivo, è stato valutato l'effetto di Met-F-AEA (analogo metabolicamente stabile di AEA), 2-AG, Arvanil (un ligando "ibrido", capace attivare CB₁/TRPV1 e di inibire l'uptake di AEA), VDM11 e AA-5HT sulla crescita di tumori sviluppati su topi nudi a seguito ad un inoculo di cellule epiteliali di tiroide trasformate. In perfetta sintonia con l'ipotesi postulata, non solo la Met-F-AEA e il 2-AG (quest'ultimo solo debolmente forse a causa della sua instabilità metabolica) riducevano la massa tumorale, ma anche i due inibitori del metabolismo degli EC mostravano un effetto simile. Il VDM11 e l'AA-5HT, pur essendo entrambi in grado di ridurre la crescita tumorale, mostravano una diversa efficacia (VDM11 riduceva la massa tumorale del 63%, mentre AA-5HT del 25% rispetto al controllo), tale differenza era giustificabile sia dalla diversa farmacocinetica dei composti che dalla diversa influenza che i due eventi (uptake ed idrolisi) normalmente hanno sull'inattivazione degli EC. E' stato interessante confrontare l'effetto del VDM11 con quello dell'Arvanil, anche questo "ibrido", infatti, inibiva la progressione tumorale; queste due molecole, pur avendo un simile profilo chimico e farmacocinetico, esibivano un'efficacia diversa. Tale osservazione suggerisce che il meccanismo d'azione non dipendeva da un fenomeno apoptotico TRPV1-dipendente né da una diretta attivazione del CB₁; infatti, quando si sommava

la possibilità di inibire l'uptake con quella di attivare il CB₁ (come nel caso dell'Arvanil), l'effetto antitumorale non veniva potenziato. L'effetto antitumorale degli inibitori testati sembrava quindi dipendere principalmente dall'aumento locale degli EC. Tale ipotesi era confermata dalle analisi effettuate mediante spettrometria di massa dei livelli di EC estratti dai tumori prelevati alla fine dei trattamenti. Nei tumori trattati con VDM11 si osservava un aumento dei livelli di 2-AG e non di AEA; tale evidenza è stata interpretata con la necessità, in vivo, di utilizzare concentrazioni maggiori di VDM11 per inibire anche l'uptake di AEA. Nei tumori trattati con AA-5HT si osservava un aumento sia dei livelli di 2-AG che di AEA. L'aumento dei livelli del 2-AG, ad opera di AA-5HT, è in accordo con quanto riportato in letteratura (de Lago et al., 2005b). Sulla base dei risultati ottenuti appare evidente che l'aumento locale del 2-AG sia, da solo, in grado di arrestare la crescita tumorale, probabilmente perché questo EC è, in genere, più abbondante nelle cellule (dalle 150 alle 300 volte) dell'anandamide. E' importante sottolineare come l'aumento del 2-AG causato dagli inibitori sia stato più efficace della somministrazione stessa di 2-AG esogeno. Questi dati avvalorano la tesi indicata secondo la quale l'utilizzo degli inibitori del metabolismo è più sicuro ed efficace dell'uso degli agonisti. Gli inibitori, infatti, agiscono prevalentemente sui quei tessuti (tumorali) dove gli EC sono abbondantemente prodotti per contrastare la proliferazione cellulare, limitando gli effetti collaterali su tutti gli altri tessuti dove i recettori dei cannabinoidi sono pure espressi.

~ o ~

Oltre allo studio condotto sul ruolo svolto dagli EC nello sviluppo del cancro, per il presente lavoro di tesi è stato analizzato anche l'effetto antitumorale di una serie di estratti di *Cannabis* e di fitocannabinoidi su diversi tipi di tumore. Sebbene gli effetti antitumorali del THC fossero già noti anche se spesso contraddittori, lo scopo di questo lavoro era di rivalutare l'uso di cannabinoidi non-psicotropi, potenzialmente più sicuri terapeuticamente perché privi della potenziale componente d'abuso e dipendenza del THC. Lo studio condotto ha, inoltre, permesso di confrontare gli effetti degli estratti arricchiti rispetto a quelli mostrati dai singoli composti purificati e, quindi, di valutare anche il possibile vantaggio nell'utilizzo dell'estratto rispetto al singolo prodotto purificato. Data la variabilità riportata per queste molecole (sembrerebbe, infatti, che la potenza antitumorale degli EC è strettamente correlata al tipo cellulare in esame), tale studio è stato affrontato su un pool di otto linee tumorali distinte per tipologia di tumore e per origine. I saggi di antiproliferazione eseguiti non hanno evidenziato alcuna tessuto-specificità in quanto i fitocannabinoidi testati arrestavano la proliferazione cellulare in tutte le linee considerate, ad eccezione delle DU-145 (cellule di carcinoma della prostata), con lo stesso ordine di potenza. Sorprendentemente, il CBD, e non il THC, era sempre il più potente nell'inibire la proliferazione cellulare. L'effetto del CBD dipendeva specificamente dalla struttura poiché la sola aggiunta di un gruppo carbossile (CBD-A) diminuiva significativamente l'efficacia di questa molecola, mentre il CBG era il secondo composto per potenza più attivo, seguito dal CBC. In maniera del tutto insolita, il THC, pur essendo notevolmente più potente del CBD come agonista dei recettori CB₁ e CB₂, non si distingueva per potenza fra tutti i suoi congeneri. Questi dati non vanno visti in contrasto con il possibile ruolo del sistema EC nel controllo della

crescita tumorale descritto nella prima parte di questa Discussione. Bisogna, infatti, tenere in considerazione alcuni dati:

- 1) i meccanismi molecolari mediante i quali gli EC inibiscono la crescita tumorale non richiedono necessariamente l'attivazione dei recettori cannabici;
- 2) il THC, pur essendo un potente agonista dei recettori cannabici, non si comporta da agonista pieno, specialmente ai recettori CB₂;
- 3) gli EC, quando inibiscono la crescita tumorale mediante attivazione dei recettori cannabici, lo fanno con meccanismi molto specifici, selettivamente e non in maniera apparentemente non aspecifica come il CBD.

Questi risultati, sebbene sorprendenti, indicavano che il CBD poteva essere usato come anti-tumorale senza gli indesiderati effetti psicotropi del THC. Per questo motivo sono stati testati anche due estratti di Cannabis arricchiti in THC o CBD, il THC-rich e il CBD-rich, rispettivamente; il rationale alla base di questa scelta era quello di verificare se vi poteva essere un effetto sinergico quando, oltre al THC e al CBD (rispettivamente presenti al 73% e al 64.5% negli estratti), venivano somministrati anche altri cannabinoidi minoritari. In alcuni casi, infatti, l'estratto CBD-rich risultava più efficace del CBD purificato, mentre al contrario il THC-rich non migliorava in nessun caso l'effetto del THC purificato. L'efficacia del CBD, del THC e dei loro estratti arricchiti sono stati verificati anche in vivo. Questi esperimenti servivano a confermare i risultati in vitro e potevano fornire importanti indicazioni sulla farmacocinetica. Con tale proposito, utilizzando lo stesso modello usato per saggiare gli inibitori del metabolismo degli EC nella prima parte di questa tesi, cellule epiteliali di tiroide trasformate col virus del sarcoma Kirsten-Moloney (KiMol), sono state iniettate sotto cute insieme al veicolo (DMSO) o al CBD (5 e 20

mg/kg, intra-tumore, due volte a settimana per 4 settimane). Il CBD, già alla dose più bassa era in grado di ridurre in maniera significativa la massa tumorale. In un secondo esperimento è stato verificato l'effetto in vivo del CBD-rich (6.5mg/kg) che si dimostrava anch'esso capace di ridurre la massa tumorale. Quando è stato valutato l'effetto antitumorale di THC (5mg/kg) e THC-rich (6.5mg/kg), ambedue i composti, non erano in grado di bloccare la crescita del tumore, mostrando invece una tendenza opposta, peraltro non statisticamente significativa, verso la stimolazione. L'efficacia del CBD e del CBD-rich furono riconfermate anche quando fu adottata una diversa procedura sperimentale. Secondo tale procedura l'inoculo veniva preparato con una sospensione di cellule MDA-MB-231 anziché di cellule KiMol. Le due preparazioni, somministrate intra-tumore, due volte a settimana per 16 giorni erano capaci di ridurre in maniera significativa la crescita del tumore, pur non distinguendosi per potenza.

I risultati ottenuti con i fitocannabinoidi e gli estratti di Cannabis imponevano un successivo approfondimento sul possibile meccanismo d'azione del CBD. Recentemente è stato riportato che il CBD non solo esercita un effetto antiproliferativo in vitro su una linea cellulare di glioma, ma mostra anche un effetto anti-tumorale in un modello sperimentale di tumore indotto da un impianto sub-plantare delle stesse cellule di glioma (Massi et al., 2004). Secondo tale studio, l'effetto del CBD dipende dall'induzione dell'apoptosi. Partendo da tale spunto, è stata valutata la popolazione apoptotica delle cellule trattate con 10 μ M di CBD. In genere sulle cellule tumorali del tipo "ormone-sensibile", l'effetto dei cannabinoidi sulla proliferazione cellulare è attribuito all'attivazione del recettore CB₁, mentre sulle cellule tumorali del tipo "non-ormone-sensibile" l'induzione del fenomeno apoptotico è attribuita all'attivazione dei recettori TRPV1 e/o CB₂. In armonia con

tali presupposti, l'effetto anti-proliferativo del CBD sulle cellule DU-145 e sulle cellule MCF-7 (due linee cellulari del tipo "ormone-sensibile") era dovuto all'arresto del ciclo cellulare. L'effetto del CBD sulle cellule Kimol era, invece, dovuto sia ad un effetto di blocco della proliferazione che all'innescò dell'apoptosi, mentre l'effetto del CBD sia sulle cellule C₆ che sulle cellule MDA-MB-231 (due linee cellulari del tipo "non-ormone-sensibile") era dovuto solamente all'induzione dell'apoptosi, come confermato anche dall'analisi densitometrica della procaspase-3 e della sua forma clivata mediante Western Blotting. La variabilità mostrata dal CBD sulle diverse linee cellulari indicava la mancanza di un meccanismo comune interamente responsabile della sua attività. E' quindi plausibile pensare che il CBD agisca attraverso una serie di meccanismi concomitanti che, nell'insieme, si risolvono in una efficace azione terapeutica sui più disparati tipi tumorali. Per tale motivo è stata analizzata l'interazione dei fitocannabinoidi sia con il sistema cannabinoide che con quello vanilloide.

Queste molecole sono state, perciò, testate per la loro capacità di modificare l'influsso di Ca⁺⁺ in cellule HEK293 transfettate stabilmente col TRPV1 e i risultati di tale analisi hanno evidenziato come, sia il CBD che il CBG erano capaci di attivare il recettore dei vanilloidi. Sebbene questi due cannabinoidi condividevano la potenza in vitro sia sulla proliferazione cellulare che sull'attivazione del TRPV1, non era plausibile pensare che questo era il meccanismo d'azione predominante giacché anche altri composti (CBG e CBD-A), che non avevano esibito efficacia nell'inibire la proliferazione cellulare, si erano mostrati equipotenti nell'attivare il recettore. Tuttavia, se era plausibile ipotizzare che il CBD agiva attivando il TRPV1, allora il suo effetto antiproliferativo doveva essere revertito da un antagonista selettivo. Le stesse considerazioni erano valide qualora si considerava un meccanismo dipendente

dai recettori cannabici in quelle linee cellulari che non esprimevano il TRPV1 ma invece possedevano il recettore CB₁ o CB₂ (o entrambi). Per tale motivo l'azione anti-proliferativa del CBD 10 μM è stata analizzata in presenza ed in assenza dei rispettivi antagonisti. Fra tutte le linee cellulari in esame, solo nel caso delle cellule MDA-MB-231, due antagonisti per TRPV1 e CB₁ (I-RTX e SR144528), utilizzati singolarmente, determinavano una parziale reversione dell'effetto del CBD; quando era somministrata la miscela dei due antagonisti, l'effetto del CBD si riduceva di circa il 40%, anche se il risultato finale era minimizzato in parte dal fatto che la miscela aveva "per se" un effetto inibente sulla proliferazione cellulare. Ancora una volta non era possibile isolare un unico meccanismo d'azione che chiariva l'azione del CBD su una tipologia di cellule tumorali così variegata. L'effetto del CBD non dipendeva dall'attivazione diretta dei recettori cannabici o dei vanilloidi, ma la sua debole azione inibitoria sull'uptake di AEA suggeriva anche che la sua azione non era dovuta neanche ad un aumento dei livelli endogeni degli EC (attivazione indiretta dei recettori cannabici o TRPV1). Infine, la mancanza di target recettoriali di membrana per il CBD era confermata anche dalla totale inefficacia della MCD, un potente depletore di colesterolo, sull'effetto del CBD nelle cellule MDA-MB-231. Un'ultima serie di esperimenti è stata condotta per verificare, sulle stesse cellule, se l'effetto del CBD era dovuto a fenomeni di stress ossidativo. Alcuni agenti antiossidanti noti (quali la Vitamina C, l'axastantina e l'α-tocoferolo) erano, infatti, capaci, seppure in maniera parziale di prevenire l'effetto del CBD, confermando un suo coinvolgimento nello stress ossidativo delle cellule e suggerendo un'azione di tipo ossidativo per il CBD, ad esempio attraverso la produzione di ROS. E' interessante notare come se, da un lato il CBD può indurre apoptosi in cellule di glioma (Galve-Ropher et al., 2000), dall'altro è in grado di proteggere le cellule della

glia dall'apoptosi (Gomez de Pulgar et al., 2002b; Molina-Holgado et al., 2002). Questo dualismo del CBD è stato osservato anche durante il presente studio. CBD, infatti, inibiva la crescita solo di cellule non tumorali (dove esibiva una tossicità solo a partire da 25 μ M, la concentrazione più alta utilizzata) e non di cellule non trasformate, suggerendo che le proprietà (anti)ossidanti di questo cannabinoide dipendono dallo stato di differenziazione e trasformazione delle cellule. In un'altra serie di esperimenti, è stato osservato che il CBD mostrava questo dualismo anche in cellule tumorali in condizioni di stress ossidativo e/o in seguito a trattamento non cronico. In presenza ed in assenza di siero è stato valutato l'effetto di concentrazioni sia micromolari che submicromolari del CBD sulle cellule MDA-MB-231 dopo sole 24h di esposizione. Il CBD presentava un'azione nulla a concentrazioni basse ed un'azione pro-ossidativa quando utilizzato ad alte concentrazioni. In condizioni "fisiologiche" (in presenza di siero), il CBD a basse concentrazioni esibiva addirittura un interessante effetto pro-proliferativo. Gli antiossidanti, in genere, agiscono direttamente (sequestrando i radicali liberi) ed indirettamente (mantenendo l'equilibrio redox della cellula). Questo potrebbe spiegare perché l'azione antiossidante del CBD può mutare, in modo concentrazione dipendente, in azione pro-ossidante.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire i meccanismi molecolari del CBD, anche se, malgrado la mancanza di un meccanismo d'azione comune, l'efficacia anti-tumorale del CBD appare chiara dai risultati presentati in questa tesi.

Conclusioni

Il fine ultimo di questo lavoro di tesi è stato di valutare il potenziale valore terapeutico dei cannabinoidi (endogeni e di origine vegetale) nella patologia tumorale. Tale lavoro di ricerca è cominciato con lo studio particolareggiato dei diversi stadi patologici del carcinoma del colon retto (dall'assenza di neoplasie, alla formazione di polipi adenomatosi, alla presenza di carcinomi). Durante la progressione tumorale è stata evidenziata una variazione significativa nei livelli di EC che lasciava supporre che il sistema EC rivestisse un ruolo ben preciso nell'inasprimento della condizione patologica. Per tale motivo, si è scelto di approfondire il ruolo del sistema EC in un sistema cellulare vitro (CaCo-2) che simulasse la progressione tumorale in vivo con il differenziamento spontaneo in cultura in enterociti (meno maligni e meno invasivi rispetto la controparte non differenziata). Questo sistema ha permesso non solo di esaminare l'effetto antiproliferativo degli EC esogeni, ma anche di valutare l'utilizzo di molecole che intervenivano indirettamente sul sistema endogeno attivando indirettamente i recettori degli EC. La strategia adottata in vitro ha evidenziato, ancora una volta, quale fosse il ruolo svolto dal sistema EC nel controllo della crescita tumorale ed ha suscitato l'interesse farmacologico verso quelle sostanze capaci di modulare indirettamente il tono cannabinoide endogeno. Il lavoro è, quindi, proseguito con lo studio, in vivo, sull'effetto antitumorale di queste molecole. Si è potuto concludere quindi che:

- ✓ il sistema EC gioca un ruolo nella soppressione della crescita tumorale, che può essere sfruttato farmacologicamente con molecole sintetiche che ne potenzino l'efficacia.

Uno studio parallelo è stato inoltre condotto sull'efficacia dei fitocannabinoidi come agenti anti-tumorali. A tale proposito, è stato valutato l'effetto antiproliferativo di tali

molecole su diverse tipologie tumorali e sono stati investigati i meccanismi molecolari e cellulari alla base di tale effetto. Lo studio condotto ha messo in evidenza in particolar modo un fitocannabinoide non-psicotropo, il cannabidiolo, che ha mostrato interessanti proprietà antitumorali sia in vitro (su numerose linee cellulari) che in vivo (su due modelli animali di tumore). Si è potuto concludere quindi che:

- ✓ sia il cannabidiolo, che estratti di Cannabis arricchiti in questo fitocannabinoide, rappresentano una promettente strategia alternativa nello sviluppo di agenti anti-tumorali.

I risultati ottenuti durante questo lavoro di tesi sono stati riconosciuti a livello internazionale (si veda la sessione Pubblicazioni) e costituiscono un punto di partenza per successive investigazioni.

Bibliografia

- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* 2001 Feb;15(2):300-2.
- Bari M, Battista N, Fezza F, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2005;280(13):12212-20.
- Beal JA. Appetite effect of dronabinol. *J Clin Oncol.* 1994;12(7):1524-5.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 1997;277(5329):1094-7.
- Beltramo M, de Fonseca FR, Navarro M, Calignano A, Gorriti MA, Grammatikopoulos G, Sadile AG, Giuffrida A, Piomelli D. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci.* 2000;20(9):3401-7.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z et al. An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhances 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Europ. Jou. Pharmacol.* 1998; 353:23-31.
- Berry EM, Mechoulam R. Tetrahydrocannabinol and endocannabinoids in feeding and appetite. *Pharmacol. Ther.* 2002;95:185-190.
- Bhargava HN. Potential therapeutic applications of naturally occurring and synthetic cannabinoids. *Gen Pharmacol.* 1978;9(4):195-213.
- Bifulco M, Laezza C, Portella G, Vitale M, Orlando P, De Petrocellis L, Di Marzo V. Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB J.* 2001;15(14):2745-7.

- Bifulco M. Role of the isoprenoid pathway in *ras* transforming activity, cytoskeleton organization, cell proliferation and apoptosis. *Life Science*. 2005;77:1740-1749.
- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Bobrov MY, Gretskaya NM, Bezuglov VV, Sitachitta N, Gerwick WH and Di Marzo V. Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide Hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 248: 515-522.
- Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin. *J Neurochem.* 1999;72(5):2113-9.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J.* 2000;351 Pt 3:817-24.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrhian A, Finazzi-Agro A, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem.* 2001;268(7):1982-9.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol.* 2003;163:463-8.
- Blazquez C, Casanova ML, Planas A, Del Pulgar TG, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J.* 2003;17(3):529-31.

- Boger DL, Sato H, Lerner AE, Austin BJ, Patterson JE, Patricelli MP, Cravatt BF. Trifluoromethyl ketone inhibitors of fatty acid amide hydrolase: a probe of structural and conformational features contributing to inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999;9(2):265-70.
- Bracey MH, Hanson MA, Masuda KR, Stevens RC, Cravatt BF. Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science*. 2002;298(5599):1793-6.
- Buchwald A, Browne CE, Wu WM, Ji F, Bodor N. Soft cannabinoid analogues as potential anti-glaucoma agents. *Pharmazie*. 2002;55(3):196-201.
- Burkey TH, Quock RM, Consroe P, Ehlert FJ, Hosohata Y, Roeske WR, Yamamura HI. Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 1997;336(2-3):295-8.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 1998;394:277-281.
- Calignano A, Katona I, Desarnaud F, Giuffrida A, La Rana G, Mackie K, Freund TF, Piomelli D. Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature*. 2000;408(6808):96-101.
- Capasso R, Matias I, Lutz B, Borrelli F, Capasso F, Marsicano G, Mascolo N, Petrosino S, Monory K, Valenti M, Di Marzo V, Izzo AA. Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*. 2005;129(3):941-51.
- Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. 2003;111(1):43-50.

- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997;389(6653):816-24.
- Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(4):1062-7.
- Chen Y, Buck J. Cannabinoids protect cells from oxidative cell death: a receptor-independent mechanism. *J. Pharm. Exp. Ther*. 2000;293:807-812.
- Check WA. Marijuana may lessen spasticity of MS. *JAMA*. 1979;241(23):2476.
- Clark LD, Hughes R, Nakashima EN. Behavioral effects of marijuana. *Experimental studies. Arch Gen Psychiatry*. 1970;23(3):193-8.
- Contassot E, Tenan M, Schnuriger V, Pelte MF, Dietrich PY. Arachidonoyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecol. Oncol*. 2004;93:182-188.
- Cox ML, Welch SP. The antinociceptive effect of Delta9-tetrahydrocannabinol in the arthritic rat. *Eur J Pharmacol*. 2004;493(1-3):65-74.
- Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA. Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*. 1995;268:1506-1509.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 1996;384(6604):83-7.
- Cuda G, Paterno R, Ceravolo R, Candigliota M, Perrotti N, Perticone F, Faniello MC, Schepis F, Ruocco A, Mele E, Cassano S, Bifulco M, Santillo M,

- Avvedimento EV. Protection of human endothelial cells from oxidative stress: role of Ras-ERK1/2 signaling. *Circulation*. 2002;105(8):968-74.
- Dahlquist A. Method of assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem*. 1964; 7:18-25.
- de Lago E, Ligresti A, Ortar G, Morera E, Cabranes A, Pryce G, Bifulco M, Baker D, Fernandez-Ruiz J and Di Marzo V. In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur. J. Pharmacol*. 2004; 484: 249-257.
- de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ortega-Gutierrez S, Cabranes A, Pryce G, Baker D, Lopez-Rodriguez M, Ramos JA. UCM707, an inhibitor of the anandamide uptake, behaves as a symptom control agent in models of Huntington's disease and multiple sclerosis, but fails to delay/arrest the progression of different motor-related disorders. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2005a, 15(4):721-732.
- de Lago E, Petrosino S, Valenti M, Morera E, Ortega-Gutierrez S, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V. Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels. *Biochem Pharmacol*. 2005b;70(3):446-52.
- De Marchi N, De Petrocellis L, Orlando P, Daniele F, Fezza F, Di Marzo V. Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia. *Lipids Health Dis*. 2003;2:5.
- Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer. Res. Clin. Oncol*. 2001;127:411-417.
- De Petrocellis L, Melck D, Ueda N, Maurelli S, Kurahashi Y, Yamamoto S, Marino G, Di Marzo V. Novel inhibitors of brain, neuronal, and basophilic anandamide amidohydrolase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(1):82-8.

- De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8375-80.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett*. 2000;483(1):52-6.
- Deutsch DG, Omeir R, Arreaza G, Salehani D, Prestwich GD, Huang Z, Howlett A. Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem Pharmacol*. 1997;53(3):255-60.
- Devane WA, Hanus 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(5090):1946-9.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34(5):605-13.
- Di Carlo G, Izzo AA. Cannabinoids for gastrointestinal disease: potential therapeutical applications. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2003;12:39-49.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994;372(6507):686-91.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, Waku K. Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227(1):281-8.

- Di Marzo V. Endocannabinoids and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Bioch. Biophys. Acta.* 1998;1392:153-175.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, Kunos G. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem.* 1999;264(1):258-67.
- Di Marzo V, Hill MP, Bisogno T, Crossman AR, Brotchie JM. Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2000;14(10):1432-8.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. Anandamide: some like it hot. *Trends in Pharmac Sci* 2001a; 22: 346-9.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. Endocannabinoids. Molecular basis of endocannabinoid formation, action and inactivation and development of selective inhibitors. *Emerg. Ther. Targets.* 2001b;5:241-266.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T. Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002a; 66: 377-91.
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A. Endovanilloid signaling in pain. *Current Opinion in Neurobiology* 2002b; 12: 372-9.
- Di Marzo V, De Petrocellis L. (2005). Plant, Synthetic, and Endogenous Cannabinoids in Medicine. *Annu Rev Med.* *In press.*
- D'Souza DC, Abi-Saab WM, Madonick S, Forselius-Bielen K, Doersch A, Braley G, Gueorguieva R, Cooper TB, Krystal JH. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. *Biol Psychiatry.* 2005;57(6):594-608.

- Edgemond WS, Greenberg MJ, McGinley PJ, Muthian S, Campbell WB, Hillard CJ. Synthesis and characterization of diazomethylarachidonyl ketone: an irreversible inhibitor of N-arachidonylethanolamine amidohydrolase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;286(1):184-90.
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8):3376-80.
- Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci.* 2000;15(6):510-21.
- Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D. Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8756-61.
- Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V. Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett.* 2002;513(2-3):294-8.
- Flach AJ. Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in the treatment of end-stage open-angle glaucoma. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2002;100:215-22.
- Fride E, Foxx A, Rosenberg E, Faigenboim M, Cohen V, Barda L, Blau H, Mechoulam R. Milk intake and survival in newborn cannabinoid CB1 receptor knockout mice: evidence for a "CB3" receptor. *Eur J Pharmacol.* 2003;461(1):27-34.

- Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med.* 2000;6(3):313-9.
- Gaoni Y and Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 1971;93(1):217-24.
- Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol.* 1999;276(6 Pt 2):H2085-93.
- Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG. Anandamide transport: A critical review. *Life Sci.* 2005;77(14):1584-604.
- Glass M, Northup JK. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol.* 1999;56(6):1362-9.
- Gomez de Pulgar T, Velasco G, Sanchez C, Haro A, Guzman m. De-novo synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* 2002a;363:183-188.
- Gomez de Pulgar T, De Ceballos ML, Guzman M, Velasco G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* 2002b;277:36527-36533.
- Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(4):417-23.
- Gubellini P, Picconi B, Bari M, Battista N, Calabresi P, Centonze D, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Maccarrone M. Experimental parkinsonism alters

- endocannabinoid degradation: implications for striatal glutamatergic transmission. *J Neurosci.* 2002;22(16):6900-7.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 1999;11(3):946-58.
- Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R. Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1993;36(20):3032-4.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):3662-5.
- Holt S, Comelli F, Costa B, Fowler CJ. Inhibitors of fatty acid amide hydrolase reduce carrageenan-induced hind paw inflammation in pentobarbital-treated mice: comparison with indomethacin and possible involvement of cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2005;146(3):467-76.
- Howlett AC. Efficacy in CB₁ receptor-mediated signal transduction. *Brit. J Pharmacol.* 2004;142: 1209-1218. Review.
- Hang MC, Graeler M, Shankar G, spencer J, Goetzi EJ. Lysopholipid mediators of immunity and neoplasia. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002;1582:161-167.
- Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(12):8400-5.

- Izzo AA, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, Iuvone T, Esposito G, Mascolo N, Di Marzo V, Capasso F. Cannabinoid CB₁-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 2001;134:563-570.
- Izzo AA, Capasso F, Costagliola A, Bisogno T, Marsicano G, Ligresti A, Matias I, Capasso R, Pinto L, Borrelli F, Cecio A, Lutz B, Mascolo N, Di Marzo V. An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice. *Gastroenterology.* 2003;125(3):765-74.
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996;93:11848-11852.
- Jordt SE, Julius D. Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell.* 2002;108:421-430.
- Karanian DA, Brown QB, Makriyannis A, Kosten TA, Bahr BA. Dual modulation of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase protects against excitotoxicity. *J Neurosci.* 2005;25(34):7813-20.
- Katayama K, Ueda N, Kurahashi Y, Suzuki H, Yamamoto S, Kato I. Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997;1347:212-218.
- Kennedy BP, Soravia C, Moffat J, Xia L, Hiruki T, Collins S, Gallinger S, Bapat B. Overexpression of the non pancreatic secretory group II PLA₂ messenger RNA and protein in colorectal adenomas from familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* 1998;58:500-503.

- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol.* 2003;74(4):486-96. Review.
- Koutek B, Prestwich GD, Howlett AC, Chin SA, Salehani D, Akhavan N, Deutsch DG. Inhibitors of arachidonoyl ethanolamide hydrolysis. *J Biol Chem.* 1994;269(37):22937-40.
- Kozak KR, Crews BC, Morrow JD, Wang LH, Ma YH, Weinander R, Jakobsson PJ, Marnett LJ. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonoylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44877-85.
- Kozak KR, Prusakiewicz JJ, Marnett LJ. Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr Pharm Des.* 2004;10(6):659-67. Review.
- Lane M, Vogel CL, Ferguson J, Krasnow S, Saiers JL, Hamm J, Salva K, Wiernik PH, Holroyde CP, Hammill S, et al. Dronabinol and prochlorperazine in combination for treatment of cancer chemotherapy-induced nausea and vomiting. *J Pain Symptom Manage.* 1991;6(6):352-9.
- Lastres-Becker I, Gomez M, De Miguel R, Ramos JA, Fernandez-Ruiz J. Loss of cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia in the late akinetic phase of rats with experimental Huntington's disease. *Neurotox Res.* 2002;4(7-8):601-608.
- Lastres-Becker I, Bizat N, Boyer F, Hantraye P, Brouillet E, Fernandez-Ruiz J. Effects of cannabinoids in the rat model of Huntington's disease generated by an intrastriatal injection of malonate. *Neuroreport.* 2003;14(6):813-6.
- Leggett JD, Aspley S, Beckett SR, D'Antona AM, Kendall DA, Kendall DA. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2004;141(2):253-62.

- Lopez-Rodriguez ML, Viso A, Ortega-Gutierrez S, Fowler CJ, Tiger G, de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA. Design, synthesis, and biological evaluation of new inhibitors of the endocannabinoid uptake: comparison with effects on fatty acid amidohydrolase. *J Med Chem.* 2003;46(8):1512-22.
- Maccarrone M, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoids and their actions. *Vitamins and Hormones.* 2002; 65:225-255.
- Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(9):3825-9.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci.* 1995;15(10):6552-61.
- Maione S, Bisogno T, de Novellis V, Palazzo E, Cristino L, Valenti M, Petrosino S, Guglielmotti V, Rossi F, Di Marzo V. Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both CB1 and TRPV1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005, *in press.*
- Marinelli S, Di Marzo V, Berretta N, Matias I, Maccarrone M, Bernardi G, Mercuri NB. Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci.* 2003;23(8):3136-44.
- Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. Molecular mechanism of cancer pain. *Nature Rev. Cancer.* 2002;2:201-209.
- Marnett LJ. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;68-69:153-164.

- Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D. Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004;308:838-845.
- Matias I, Leonhardt M, Lesage J, De Petrocellis L, Dupouy JP, Vieau D, Di Marzo V. Effect of maternal under-nutrition on pup body weight and hypothalamic endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(2):382-9.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-4.
- McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood.* 2002;100(2):627-34.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* 1995;50(1):83-90.
- Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 2000;108(1-2):1-13. Review.
- Melck D, Bisogno T, De Petrocellis L, Chuang H, Julius D, Bifulco M, Di Marzo V. Unsaturated long-chain N-acyl-vanillyl-amides (N-AVAMs): vanilloid receptor ligands that inhibit anandamide-facilitated transport and bind to CB1 cannabinoid receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999a;262(1):275-84.
- Melck D, Rueda D, Galve-Ropher I, De Petrocellis L, Guzman M, Di Marzo V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated

protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* 1999b; 463:235-240.

Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology.* 2000;141(1):118-26.

Merchant TE, Kasimos JN, de Graaf PW, Minsky BD, Guerke LW, Glonek T. Phospholipid profiles of human colon cancer using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Int. J. Colorectal Dis* 1991;6:121-126.

Mestre L, Correa F, Arevalo-Martin A, Molina-Holgado E, Valenti M, Ortar G, Di Marzo V, Guaza C. Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *J Neurochem.* 2005;92(6):1327-39.

Milton NG. Anandamide and noladin ether prevent neurotoxicity of the human amyloid-beta peptide. *Neurosci Lett.* 2002;332(2):127-30.

Milton NG. Phosphorylated amyloid-beta: the toxic intermediate in alzheimer's disease neurodegeneration. *Subcell Biochem.* 2005;38:381-402. Review.

Molina-Holgado E, Vela JM, Arevalo-Martin A, Almazan G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C. Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signalling. *J. Neurosci.* 2002;22:9742-9753.

Monteleone P, Matias I, Martiadis V, De Petrocellis L, Maj M, Di Marzo V. Blood levels of the endocannabinoid anandamide are increased in anorexia nervosa and in binge-eating disorder, but not in bulimia nervosa. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(6):1216-21.

- Moody JS, Kozak KR, Ji C, Marnett LJ. Selective oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol by leukocyte-type 12-lipoxygenase. *Biochemistry*. 2001;40(4):861-6.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993;365(6441):61-5.
- Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst*. 1975;55(3):597-602.
- Nakane S, Oka S, Arai S, Waku K, Ishima Y, Tokumura A, Sugiura T. Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain. *Arch.Biochem Biophys* 2002;402:51-58.
- Noyes R Jr, Brunk SF, Avery DA, Canter AC. The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther*. 1975;18(1):84-9.
- Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V. Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(9):1473-81.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertaler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1298-305.
- Parolaro D. Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Sci*. 1999;65(6-7):637-44.

- Patterson JE, Ollmann RI, Cravatt BF, Boger DL, Wong CH, Lerner RA. Inhibition of oleamide hydrolase catalyzed hydrolysis of the endogenous sleep-inducing lipid cis-9 octadecenamide. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118:5938-59-45.
- Patricelli MP, Cravatt BF. Clarifying the catalytic roles of conserved residues in the amidase signature family. *J Biol Chem.* 2000;275(25):19177-84.
- Pazos MR, Nunez E, Benito C, Tolon RM, Romero J. Role of the endocannabinoid system in Alzheimer's disease: new perspectives. *Life Sci.* 2004;75(16):1907-15. Review.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol. Ther.* 1997;74:129-180.
- Pertwee RG. Evidence for the presence of CB₁ cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB₁ cannabinoid receptors. *Life Sci.* 1999;65(6-7):597-605. Review.
- Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol.* 2001;63(5):569-611. Review.
- Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002a;66(2-3):101-21. Review.
- Pertwee RG. Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002b;95(2):165-74. Review.
- Portella G, Laezza C, Laccetti P, De Petrocellis L, Di Marzo V, Bifulco M. Inhibitory effects of cannabinoid CB₁ receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J.* 2003;17(12):1771-3.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. Characterization of a novel

- endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(3):1020-4.
- Rak J, Mitsushashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vioria-etit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG, Kerbel RS. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential models of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblast. *Cancer Res.* 2000; 60:490-498.
- Razdan RK. Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol Rev.* 1986;38(2):75-149. Review.
- Rodriguez de Fonseca F, Gorriti MA, Bilbao A, Escuredo L, Garcia-Segura LM, Piomelli D, Navarro M. Role of the endogenous cannabinoid system as a modulator of dopamine transmission: implications for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurotox Res.* 2001;3(1):23-35.
- Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzman M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 2002;277:46645-46650.
- Russo E. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses.* 2005; *in press.*
- Sanchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzman M. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett.* 1998;436(1):6-10.
- Sanchez C, de Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzman M. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res.* 2001;61(15):5784-9.

- Sanchez MG, Sanchez AM, Ruiz-Llorente L, Diaz-Laviada I. Enhancement of androgen receptor expression induced by (R)-methanandamide in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett.* 2003;555(3):561-6.
- Sarnataro D, Grimaldi C, Pisanti S, Gazzero P, Laezza C, Zurzolo C, Bifulco M. Plasma membrane and lysosomal localization of CB₁ cannabinoid receptor are dependent on lipid rafts and regulated by anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett.* 2005; 579(28):6343-9.
- Scandalios JG. Oxidative stress response-what have genome-scale studies taught us? *Genome Biology.* 2002;3: 10191-10196.
- Schmid PC, Wold LE, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. Anandamide and other N-acyl ethanolamines in human tumors. *Lipids.* 2002;37(9):907-12.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol.* 2000;129(2):227-30.
- Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. Mutations in APC, K-ras, and p-53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc.Natl.Acad Sci. USA.* 2002;99:9433-9438.
- Smith PF. Cannabinoids in the treatment of pain and spasticity in multiple sclerosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002;3(6):859-64. Review
- Stefano GB, Bilfinger TV, Rialas CM, Deutsch DG. 2-arachidonoyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. *Pharmacol Res.* 2000;42(4):317-22.

- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J.* 2004;380(Pt 3):749-56.
- Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Piersanti G, Mor M, Rivara S, Plazzi PV, Park C, Kathuria S, Piomelli D. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *J Med Chem.* 2003;46(12):2352-60.
- Thomas EA, Cravatt BF, Danielson PE, Gilula NB, Sutcliffe JG. Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system *J Neurosci Res.* 1997; 50:1047-1052.
- Tian X, Guo J, Yao F, Yang DP, Makriyannis A. The conformation, location, and dynamic properties of the endocannabinoid ligand anandamide in a membrane bilayer. *J Biol Chem.* 2005;280(33):29788-95.
- Tsuboi K, Sun Y, Okamoto Y, Araki N, Tonai T and Ueda N. Molecular characterization of N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *Jour. Biol. Chem.* 2005; 280: 11082-11092.
- Ueda N, Okamoto Y, Morishita J. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: a novel enzyme of the beta-lactamase fold family releasing anandamide and other N-acylethanolamines. *Life Sci.* 2005;77(14):1750-8.
- van der Stelt M, Fox SH, Hill M, Crossman AR, Petrosino S, Di Marzo V, Brotchie JM. A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB J.* 2005;19(9):1140-2.

- Velasco G, Galve-Ropher I, Sanchez C, Blazquez C, haro A, Guzman M. Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Science* 2005;77:1723-1731.
- Walsh D, Nelson KA, Mahmoud FA. Established and potential therapeutic applications of cannbinoids in oncology. *Support Care Cancer*. 2003; 11:137-143.
- Walker J, Huang S. Cannabinoid analgesia. *Pharmacological Therapeutics*. 2002; 95:127-135.
- Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signalling in the brin. *Science*. 2002;296: 678-682.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*. 1999;400(6743):452-7.

Pubblicazioni

1. **Ligresti A**, Cascio MG, Pryce G, Kulasegram S, Beletskaya I, De Petrocellis L, Saha B, Mahadevan A, Visintin C, Wiley JL, Baker D, Martin BR, Razdan RK, Di Marzo V. New potent and selective inhibitors of anandamide reuptake with antispastic activity in a mouse model of multiple sclerosis. *Br J Pharmacol*. 2005. *In press*.
2. **Ligresti A.**, Di Marzo V. Endocannabinoid-based molecules as potential therapeutic drugs. 2005. **Capitolo 24** del libro *Endocannabinoids. The brain and body's marijuana beyond*. Editori: Emmanuel S. Onaivi, Takayuki Sugiura, Vincenzo Di Marzo.
3. Bisogno T, **Ligresti A**, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;81(2):224-38. Review.
4. Appendino G, De Petrocellis L, Trevisani M, Minassi A, Daddario N, Moriello AS, Gazzieri D, **Ligresti A**, Campi B, Fontana G, Pinna C, Geppetti P, Di Marzo V. Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels and its therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 312(2):561-70.
5. Di Marzo V., **Ligresti A.**, Morera E., Nalli M., Ortar G. The anandamide membrane transporter. Structure-activity relationships of anandamide and oleoylethanolamine analogs with phenil rings in the polar head group region. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004;12: 5161-5169.
6. Bifulco M., Laezza C., Valenti M., **Ligresti A.**, Portella G., Di Marzo V. A new strategy to block tumor growth by inhibiting endocannabinoid inactivation. *FASEB J*. 2004;18(13):1606-8.

7. Fowler CJ, Tiger G, **Ligresti A**, Lopez-Rodriguez ML, Di Marzo V. Selective inhibition of anandamide cellular uptake versus enzymatic hydrolysis-a difficult issue to handle. *Eur. J. Pharmacol.* 2004;492(1):1-11.
8. **Ligresti A**, Morera E., Van Der Stelt M.M., Monory K., Lutz B., Ortar G. and Di Marzo V. Further evidence for the existence of a specific process for the membrane transport of anandamide. *Biochem J.* 2004;380(Pt 1):265-72.
9. Matias I., Chen J., De Petrocellis L., Bisogno T., **Ligresti A**, Fezza F., Krauss A.H., Shi L., Protzman C.E., Li C., Liang Y., Nieves A.L., Kedzie K.M., Burk R.M., Di Marzo V. and Woodward D.F. Prostaglandin-ethanolamides (prostamides): in vitro pharmacology and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309(2):745-57.
10. de Lago E., **Ligresti A**, Ortar G., Morera E., Cabranes A., Pryce G., Bifulco M., Baker D., Fernandez-Ruiz J. and Di Marzo V. In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur. J. Pharmacol.* 2004; 484 (2-3): 249-57.
11. Cascio MG., Minassi A., **Ligresti A**, Appendino G., Burstein S. and Di Marzo V. A structure-activity relationship study on N-arachidonoil-aminoacids as possible endogenous inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 314 (1): 192-6.
12. Matias I., **Ligresti A**. and Di Marzo V. A general view of the endocannabinoid system. *Acta Therapeutica* 2003; 1: 4-14. Review.
13. Bisogno T., Howell F., Williams G., Minassi A., Cascio MG., **Ligresti A**, Matias I., Schiano Moriello A., Paul P., Williams EJ., Gangadharan U., Hobbs C., Di Marzo V. and Doherty P. Cloning of the first sn1-DAG lipases

- points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signalling in the brain. *J. Cell. Biol.* 2003; 163 (3): 463-8.
14. Han B., McPhail KL., **Ligresti A.**, Di Marzo V. and Gerwick WH. Semiplenamides A-G, fatty acid amides from a Papua New Guinea collection of the marine cyanobacterium *Lyngbya semiplena*. *J. Nat. Prod.* 2003;66(10):1364-8.
 15. Izzo A.A., Capasso F., Costagliola A., Bisogno T., Morsicano G., **Ligresti A.**, Matias I., Capasso R., Pinto L., Borrelli F., Cecio A., Lutz B., Mascolo N. and Di Marzo V. An endogenous cannabinoid tone attenuates colera toxin-induced accumulation in mice. *Gastroenterology.* 2003; 125 (3): 765-74.
 16. **Ligresti A.**, Bisogno T., Matias I., De Petrocellis L., Laezza C., Cascio M.G., Cosenza V., D'Argenio G., Scaglione G., Bifulco M., Sorrentini M., Di Marzo V. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology.* 2003; 125 (3): 677-87.
 17. Ortar G., **Ligresti A.**, De Petrocellis L., Morera E., Di Marzo V. Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65 (9):1473-81.
 18. Appendino G., **Ligresti A.**, Minassi A., Daddario N., Bisogno T., Di Marzo V. Homologues and isomers of noladin ether, a putative novel endocannabinoid: interaction with rat cannabinoid CB1 receptors. *Bioorg. Med.Chem. Lett.* 2003;13, 43-46.
 19. De Petrocellis L, Bisogno T, **Ligresti A.**, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol.* 2002;16 (4):297-302.

20. Rossi A., **Ligresti A.**, Longo R., Russo A., Borrelli F., Sautebin L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine* 2002; 9,530-535.
21. Mascolo N., Izzo A.A., **Ligresti A.**, Costagliola A., Pinto L., Cascio M.G., Mafia P., Cecio A., Papasso F., Di Marzo V. The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *FASEB J.* 2002; 16, 1973-1975.
22. Esposito G., **Ligresti A.**, Izzo A.A., Bisogno T., Ruvo M., Di Rosa M., Di Marzo V., Iuvone T. The endocannabinoid system protects rat glioma cells against HIV-1 Tat protein-induced cytotoxicity. Mechanism and regulation. *J. Biol. Chem.* 2002;277, 50348-50354.
23. Di Marzo V., De Petrocellis L., Fezza F., **Ligresti A.**, Bisogno T. Anandamide receptors. *Prostaglandine Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2002;66,377-391. Review.

Curriculum Vitae

Alessia Ligresti nasce l'11 Ottobre del 1975 a Minturno, Latina. Nel 1995, dopo aver conseguito il Diploma di Maturità Classica, si iscrive alla Facoltà di Farmacia dell'Università "Federico II" di Napoli. A Marzo 2001 consegue la Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche con una tesi sperimentale, realizzata presso il Dipartimento di Farmacologia sotto la supervisione della Prof.ssa Lidia Sautebin, dal titolo "Azione di un estratto etanologico di propolis e di alcuni suoi componenti sull'attività totale della ciclo-ossigenasi in macrofagi J774". Nel Giugno dello stesso anno vince un Assegno di Collaborazione ad Attività di Ricerca a tempo determinato presso l'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Pozzuoli (Na) sotto la responsabilità scientifica del Dott. Vincenzo Di Marzo, fondatore e coordinatore dell'Endocannabinoid Research Group, con il quale collabora tuttora. Nel 2003 diviene membro del ICERS (International Cannabinoid Research Society); l'anno seguente, viene insignita del premio per la migliore comunicazione orale al "14th Symposium on the cannabinoids of the ICERS" e nel Giugno 2005 viene eletta Rappresentante degli Studenti dell'ICERS. Nel Dicembre 2002 è ammessa al corso di Dottorato di Ricerca in Scienza del Farmaco con indirizzo in Chimica delle Sostanze Naturali Bioattive (XVIII° ciclo). In accordo con il suo relatore, il Prof. Luciano Mayol, svolge sua attività di ricerca presso i laboratori dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR. Recentemente ha svolto un periodo di consulenza nei laboratori del Department of Biological Science presso l'Allergan, Inc. di Irvine, California.

Ringraziamenti

A conclusione del mio lavoro di tesi mi sembra doveroso dedicare un ringraziamento a tutti quelli che mi hanno permesso di terminare con successo il Dottorato di Ricerca. Innanzitutto vorrei ringraziare il mio Relatore, il Prof. Luciano Mayol per aver creduto in me e per avere acconsentito allo svolgimento di questa tesi presso l'Endocannabinoid Research Group, (ICB-CNR). Un ringraziamento particolare va al mio Tutore, il Dott. Vincenzo Di Marzo, grazie per avermi accettato nel suo gruppo e per avermi trasmesso la passione per la ricerca. Sento di dover ringraziare anche il mio Supervisore, la Dott.ssa Tiziana Bisogno per essersi dimostrata un'amica pur mantenendo il suo ruolo "ufficiale" durante questi anni.

Un lavoro di tesi è fatto anche della quotidianità del laboratorio e per questo sento di dover ringraziare tutti quelli che mi hanno accompagnato nel cammino di ogni giorno. Sono grata ad Isabelle Matias, per tutte le volte che mi ha ascoltato, incoraggiato e sostenuto fuori e dentro il laboratorio. Infinite grazie a Marta Valenti per essere sempre riuscita a strapparmi un sorriso anche nelle situazioni peggiori, le auguro ogni bene per la sua "nuova" vita; mille grazie ad Aniello Schiano Moriello per le innumerevoli chiacchierate che mi ha regalato durante le interminabili ore "sotto cappa". Grazie a Stefania Petrosino per la sua generosità e per i sorrisi sinceri che ha regalato tutte le volte che mi ha ceduto il suo turno all'Hetovac e grazie anche a Maria Grazia Cascio per la sua disponibilità.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia (mio padre, mia madre, mia sorella e mio cognato), per il bene smisurato che continuamente mi dimostrano e per tutti i sacrifici che continuano a fare per me anche adesso che non vivo più con loro, non credo che basti farvi sapere quanto vi amo. Sento di dover ringraziare anche Gaetano, Gianna ed Imma per il loro affetto sincero e per il sostegno morale che sempre mi

forniscono, vi considero la mia seconda famiglia e sono felicissima del legame speciale che mi unisce a voi.

Infine voglio ringraziare *Salvatore*, mio marito, il mio migliore amico, il mio amante ed il mio compagno di vita. Grazie perché mi ami così come sono, grazie perché mi hai concesso di vivere i miei sogni con te, grazie perché ci sei... questa tesi è dedicata a te.