



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II

DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E
MOLECOLARE



TESI DI DOTTORATO, 2007

REGOLAZIONE E MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA DEI SISTEMI
ENDOVANILLOIDE ED ENDOCANNABINOIDE E
POTENZIALI SVILUPPI TERAPEUTICI.

DOTTORANDO: ANIELLO SCHIANO MORIELLO
DIPARTIMENTO DI MEDICINA SPERIMENTALE
DELLA SECONDA UNIVERSITA' DI NAPOLI

DOCENTE-GUIDA: Prof. PASQUALE GRIPPO

CORRELATORE: Dott. LUCIANO DE PETROCELLIS

COORDINATORE: Prof. GIUSEPPE D'ALESSIO

Sommario

Il sistema endocannabinoide è formato dai recettori di membrana CB₁ e CB₂, (noti per la capacità di legare il principio attivo della *Cannabis* Δ^9 -THC), dai loro ligandi endogeni (gli endocannabinoidi anandamide e 2-arachidonoil glicerolo) e dagli enzimi coinvolti nella biosintesi e degradazione degli endocannabinoidi. Gli endocannabinoidi non sono conservati nelle cellule ma sono sintetizzati "on demand" e terminata la loro azione vengono rapidamente ricaptati ed idrolizzati. L'anandamide è anche un ligando endogeno del recettore dei vanilloidi TRPV1 (recettore di membrana attivato da temperature >42 °C e dalla capsaicina il principio attivo dei peperoncini rossi che determina una sensazione di bruciore). Esiste una vasta letteratura sul coinvolgimento dei sistemi endocannabinoide ed endovanilloide in situazioni fisio-patologiche. Il mio progetto è stato focalizzato: i) sullo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nella trasduzione del segnale mediato dai sistemi endocannabinoide ed endovanilloide, ii) sulla modulazione di tale segnale mediante approccio farmacologico.

In particolare è stata valutata la capacità da parte di nuovi composti di sintesi (derivati da due noti inibitori della ricaptazione cellulare dell'anandamide, OMDM1 e OMDM2) di modulare mediante legame covalente con gruppi amminoacidici l'ingresso nelle cellule di [¹⁴C] anandamide. Infatti, OMDM1-2 sono inibitori reversibili ed il loro effetto è revertito mediante lavaggio delle cellule. Nel corso di questi studi sono stati identificati composti in grado di inibire stabilmente l'ingresso di [¹⁴C] anandamide nelle cellule. Tali studi rafforzano l'ipotesi della presenza di un trasporto facilitato dell'anandamide nelle cellule mediante un sistema di proteine specifiche (la cui esistenza è al momento solo postulata). Inoltre l'individuazione di inibitori covalenti di tale processo potrà essere utile per l'identificazione delle proteine ivi coinvolte.

Sono stati studiati nuovi antagonisti del TRPV1 quali l'N-arachidonoil serotonina (già noto per inibire l'idrolisi dell'anandamide) e due composti derivati dalla iodinazione in posizione 6 di olvanil e arvanil, noti agonisti del TRPV1. Per tale studio sono state utilizzate cellule HEK 293 trasfettate con TRPV1 valutando spettrofluorimetricamente la capacità del recettore di indurre ingresso di Ca²⁺.

Inoltre è stata studiata la regolazione del recettore TRPM8 (appartenente, come il TRPV1, alla famiglia di recettori TRP) e il suo "cross-talk" con il recettore CB₁. Il recettore TRPM8 è attivato dalle basse temperature (<25 °C) e dal mentolo che determina sensazioni di fresco. È stato dimostrato che: i) l'attivazione della proteina chinasi A determina una desensibilizzazione del TRPM8; ii) l'anandamide è stata identificata come primo antagonista endogeno del TRPM8. Per lo studio del "cross-talk" con il recettore CB₁, cellule HEK 293 sono state co-trasfettate con i recettori TRPM8 e CB₁. Da questi studi è emerso che l'attivazione del CB₁ modula negativamente il TRPM8.

Infine è stata dimostrata l'attività antiproliferativa di cannabinoidi vegetali su diverse linee cellulari tumorali ed il coinvolgimento dei sistemi endocannabinoide ed endovanilloide nell'attività di tali composti.

Abstract

The endocannabinoid system consists of the cannabinoid receptors, (CB₁ and CB₂ known to bind the active component of *Cannabis* Δ^9 -THC), their endogenous ligands (the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonoyl glycerol), and the proteins responsible for the biosynthesis and inactivation of the ligands. The endocannabinoids are not stored in the cells but are biosynthesised “on demand” to be immediately released from the cells, then uptaken and hydrolysed. Anandamide is also an endogenous ligand of vanilloid receptor TRPV1, a membrane receptor activated by temperature > 42 °C and by capsaicin the active principle of chilli peppers that elicits burning sensations. There is a very large literature about involvement of endocannabinoid and endovanilloid system in an increasing number of physiological and pathological conditions. The aim of my project is focused on i) the study of molecular mechanisms involved in signal transduction of the endocannabinoid and endovanilloid system; ii) signal modulation by pharmacological approach.

Particularly it has been evaluated the ability of new synthetic compounds (derived from two known inhibitors of anandamide uptake OMDM1 and OMDM2) to modulate the cellular uptake of [¹⁴C] anandamide by covalent bonds with aminoacid groups. Indeed OMDM1 and OMDM2 are reversible inhibitors and their effect is reverted after washing the cells. In this study new compounds able to stably inhibit the cellular uptake of [¹⁴C] anandamide have been identified. These studies strengthen the hypothesis of the presence of a facilitated transport of anandamide by specific protein(s) (whose presence is at moment only postulated). Moreover the characterization of covalent inhibitors might permit to identify the proteins involved in this process.

New antagonists of TRPV1 have been studied such as *N*-arachidonoyl serotonin (already known inhibitor of anandamide hydrolysis) and two compounds derived from the iodination on the 6'-carbon atom of olvanil and arvanil, known agonists of TRPV1. HEK 293 cells transfected with TRPV1 have been used for this study, spectrofluorimetrically evaluating the capability of TRPV1 to induce Ca²⁺ influx.

The regulation of TRPM8 receptor (a component of TRP receptor family as TRPV1) and the “cross-talk” mechanism with CB₁ receptors have been studied. TRPM8 is a receptor responsive to cold (< 25 °C) and to menthol that elicits cool sensations. It has been shown that i) protein kinase A activation down-regulates TRPM8 receptor; ii) anandamide has been identified as the first potential antagonist of TRPM8. The cross-talk study with CB₁ receptors has been investigated in HEK 293 cells co-transfected with CB₁ and TRPM8 receptors. Also CB₁ activation results in a down regulation of TRPM8.

Finally, it has shown the anti proliferative activity of plant cannabinoids in different cellular tumoral lines and the involvement of endocannabinoid and endovanilloid systems in the activity of these compounds.

Introduzione

Cenni storici

L'uso della *Cannabis* è una pratica molto antica, le prime notizie al riguardo risalgono al 2600 AC quando l'imperatore cinese Huang Ti la usava per i crampi e i dolori reumatici. L'interesse scientifico del mondo occidentale per le potenzialità terapeutiche della *Cannabis* però si è avuto solo a partire dal XIX secolo dopo i lavori sull'argomento del medico inglese O'Shaughnessy (Mechoulam 1986). Attualmente l'uso dei cannabinoidi in medicina è consentito in Canada e in alcuni stati degli Stati Uniti dove trovano applicazione come antiemetici durante la chemioterapia, come analgesici e nel trattamento dei casi di anoressia tra i malati di AIDS (Grotenhermen 2005).

Cannabinoidi

La *Cannabis sativa* è una pianta da cui si ricavano i cannabinoidi (se ne conoscono più di 60), questi sono composti lipofili, chimicamente sono dei terpenoidi la maggior parte dei quali ha una struttura biciclica o triciclica. Gli effetti psicotropi dell'uso di questa pianta sono dovuti principalmente al (-)-trans- Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC). Questi effetti sono mediati principalmente dall'interazione, a livello cerebrale, di questo composto con il recettore dei cannabinoidi CB₁. Un altro derivato importante di questa pianta è il cannabidiolo. Sia il THC che il cannabidiolo sono presenti nella *Cannabis* principalmente come acidi (THC acido e cannabidiolo acido). Il cannabidiolo al contrario del THC non è psicoattivo ed ha un'affinità molto bassa per i recettori dei cannabinoidi CB₁ e CB₂ (Pertwee 1997) ma è in grado di attivare il recettore dei vanilloidi TRPV1. Il cannabidiolo ha inoltre attività

anticonvulsive, anti ansietà e neuroprotettive. Tra i cannabinoidi derivati dalla *Cannabis* (fitocannabinoidi) c'è anche la Δ^9 -tetraidrocannabiniverina che è un antagonista dei recettori dei cannabinoidi.

Recettori dei cannabinoidi

Studi condotti per chiarire il meccanismo d'azione del THC hanno permesso di identificare due recettori di membrana: CB₁ e CB₂ (Fig 1) a cui il derivato della *Cannabis* si lega. CB₁ e CB₂ sono recettori a sette segmenti di transmembrana accoppiati a proteine G aventi un dominio N terminale extracellulare glicosilato e un dominio C terminale intracellulare. Si pensa che le proteine G siano di tipo G_{i/o} accoppiate negativamente all'adenilato ciclasi e positivamente alla proteina chinasi mitogeno attivata (MAPK). Tramite l'accoppiamento di tipo G_{i/o} il CB₁ regola l'attività di molte proteine della membrana plasmatica e vie di trasduzione del segnale. Ad esempio l'attivazione dei recettori CB₁ presinaptici inibisce i canali del calcio di tipo N e stimola i canali rettificanti del potassio riducendo così la trasmissione sinaptica (Freund 2003). Per i CB₁ possono verificarsi anche accoppiamenti tramite G_s che portano all'attivazione dell'adenilato ciclasi. I due recettori hanno il 44% di identità a livello della sequenza proteica, il CB₁ è formato da 472 amminoacidi mentre il CB₂ da 360. Il recettore CB₁ è stato clonato nel ratto nel 1990 e successivamente nell'uomo. Si trova prevalentemente ma non esclusivamente nelle terminazioni nervose centrali e periferiche (soprattutto a livello presinaptico ma anche a livello postsinaptico) dove media l'inibizione del rilascio di neurotrasmettitori (Pertwee 1997; Howlett 2002). La distribuzione nel sistema nervoso centrale di CB₁ è in accordo con diversi effetti caratteristici di agonisti di questi recettori

come la capacità di produrre ipocinesia e catalessia o di indurre segni di analgesia sia in animali che nell'uomo (Howlett 2002; Walker 2005). Le principali regioni dove è maggiormente espresso il recettore CB₁ sono ippocampo, gangli della base, cervelletto e corteccia cerebrale. Il recettore CB₁ è presente nel sistema nervoso centrale anche in cellule non neuronali quali astrociti, oligodendrociti e cellule staminali neuronali (Mackie 2006). Fuori dal sistema nervoso il CB₁ si ritrova nel testicolo, nell'utero, nell'endotelio vascolare, nell'occhio, nella milza e negli adipociti.

Il recettore CB₂ si trova prevalentemente nelle cellule del sistema immunitario dove regola il rilascio di citochine e la migrazione delle cellule immunitarie. In particolare si osserva nei leucociti quest'ordine di espressione: cellule B > "natural killer" (NK) >> monociti / macrofagi > neutrofili > cellule T CD8⁺ > cellule T CD4⁺ (Mackie 2006), ma anche nella milza e nelle tonsille. L'attivazione del recettore CB₂ porta ad un aumento di attività di Erk e ciò determina la migrazione delle cellule immunitarie e il cambiamento di espressione genica. Si è osservata la presenza del CB₂ anche nel sistema nervoso centrale ad esempio nelle cellule della microglia (Howlett 2002).

Recettori dei cannabinoidi

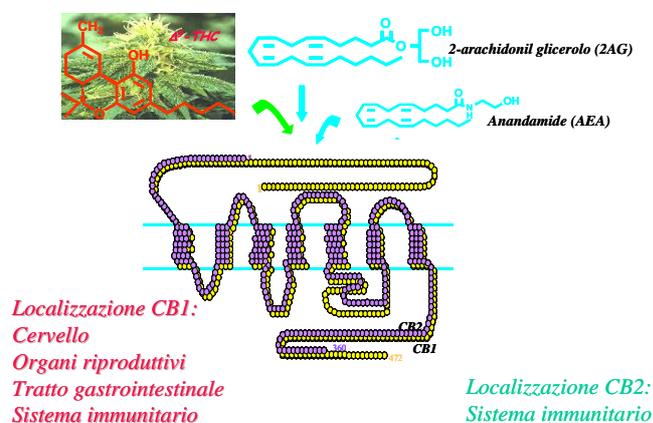


Fig1

Ci sono crescenti evidenze sull'esistenza di altri recettori dei cannabinoidi, uno di questi potrebbe essere il recettore orfano accoppiato a proteine G GPR 55 (Pertwee 2006).

Cannabinoidi endogeni (endocannabinoidi)

Il primo agonista endogeno dei recettori dei cannabinoidi (o endocannabinoide) ad essere identificato fu l'anandamide o arachidonoil etanolamina (Devane 1992). L'anandamide è un agonista parziale dei recettori CB₁ e un debole agonista dei recettori CB₂.

Il secondo ad essere identificato fu il 2-arachidonoilglicerolo o 2-AG (Sugiura 1995) il quale attiva sia il CB₁ che il CB₂ (con profili farmacologici diversi). I suoi livelli sono cento volte quelli dell'anandamide. Un endocannabinoide strutturalmente correlato all'anandamide è la virodamina, che si distingue dall'anandamide perché in essa l'etanolamina è unita all'acido arachidonico con un legame estereo e non ammidico. La virodamina si comporta come un antagonista / agonista inverso dei recettori CB₁. Più recentemente si sono aggiunti alla lista degli endocannabinoidi anche la N-arachidonoil dopamina (NADA) e il noladin etere. Gli endocannabinoidi, i loro enzimi metabolici e i loro recettori formano il sistema endocannabinoide. Gli endocannabinoidi sono prodotti su richiesta e in seguito rilasciati dalle cellule dove sono stati sintetizzati. Gli endocannabinoidi agiscono come molecole di segnalazione retrograda venendo rilasciati dai neuroni postsinaptici e agendo sui neuroni presinaptici dove inibiscono il rilascio di neurotrasmettitori sia inibitori che eccitatori. Per la loro inattivazione è necessaria prima la ricaptazione cellulare

(processo di diffusione probabilmente di tipo facilitato) e poi un processo di idrolisi enzimatica.

Un altro composto che è stato indicato come possibile endocannabinoide è l'oleamide, sostanza lipidica conosciuta per la sua capacità di indurre il sonno. Secondo Leggett e coautori (Leggett 2004) l'oleamide è un agonista endogeno selettivo dei recettori dei cannabinoidi CB₁ umani e di ratto.

Metabolismo degli endocannabinoidi

L'anandamide è biosintetizzata a partire da un fosfolipide di membrana l'N-arachidonoil fosfatidil etanolamina (NAPE) (Fig 2). Questo a sua volta viene sintetizzato da parte di una N-acil-trasferasi, un enzima Ca²⁺ e cAMP dipendente, a partire dalla fosfatidil etanolamina e da un fosfolipide contenente il gruppo acile dell'acido arachidonico. Dal NAPE l'anandamide viene sintetizzata ad opera di una fosfolipasi di tipo D, la NAPE-PLD. Questo enzima è una β-idrolasi appartenente alla famiglia delle zinco-metallo idrolasi (Okamoto 2004).

L'anandamide viene idrolizzata dall'enzima FAAH (fatty acid amide hydrolase) in acido arachidonico ed etanolamina. La FAAH è una serina idrolasi appartenente alla famiglia delle amidasi identificato per la prima volta nel 1994 nel fegato di ratto (Cravatt 1996) formato da 597 amminoacidi con un peso molecolare di 64 KD. Nella FAAH la triade Ser-Ser-Lys è coinvolta nel meccanismo catalitico. L'anandamide è anche un substrato della cicloossigenasi 2 (Cox2). Il prodotto di queste reazioni sono le prostaglandin-etanolammidi (prostamidi) in particolare le prostamidi E₂, D ed F_{2α}. Questi composti non sono in grado di attivare i recettori dei cannabinoidi, sembrano

invece capaci di attivare il recettore dei vanilloidi TRPV1 ma solo ad alte concentrazioni (5-30 μM) (Matias 2004). Infine l'anandamide può essere il substrato anche della lipoossigenasi.

Il 2-AG viene biosintetizzato a partire da un diacilglicerolo (DAG) (Fig 2) il quale si forma ad opera di una fosfolipasi di tipo C (PLC) (in particolare PLC β 1 e PLC β 4 mediano la biosintesi del 2-AG nei neuroni piramidali e del Purkinje) che idrolizza fosfoinositidi di membrana. Il DAG subisce a sua volta l'idrolisi catalizzata da una DAG lipasi, un enzima Ca^{2+} dipendente localizzato sulla membrana plasmatica, per formare il 2-AG. La DAG lipasi appartiene alla famiglia delle serine lipasi; di questo enzima sono note due isoforme, la α e la β (Bisogno 2003) la α è abbondante nel cervello adulto mentre la β è maggiormente espressa durante lo sviluppo del cervello. La DAG lipasi che sintetizza il 2-AG è sn1 selettiva, infatti agisce su un diacilglicerolo che presenta acido arachidonico in posizione 2 e idrolizzando l'acido grasso presente in posizione 1 produce il 2-AG (Bisogno 2003). Il processo degradativo del 2-AG avviene ad opera di una MAG lipasi (monoacilglicerolo lipasi) questa è una serina idrolasi, clonata nel 1990 avente un peso molecolare di 33 KD, in essa la triade catalitica è formata dagli amminoacidi Ser 122, Asp 239 e His 269. La MAG lipasi scinde questo endocannabinoide in acido arachidonico e glicerolo. La MAG lipasi è localizzata nei neuroni presinaptici, dove il 2-AG svolge la sua funzione, e la sua attività provoca l'immediata cessazione della segnalazione dell'endocannabinoide. Il 2-AG può inoltre essere degradato anche dalla FAAH e dalla ciclossigenasi.

La DAG lipasi che catalizza la biosintesi del 2-AG si trova nei neuroni post sinaptici nel cervello adulto e in quelli presinaptici durante lo sviluppo cerebrale (Bisogno 2003).

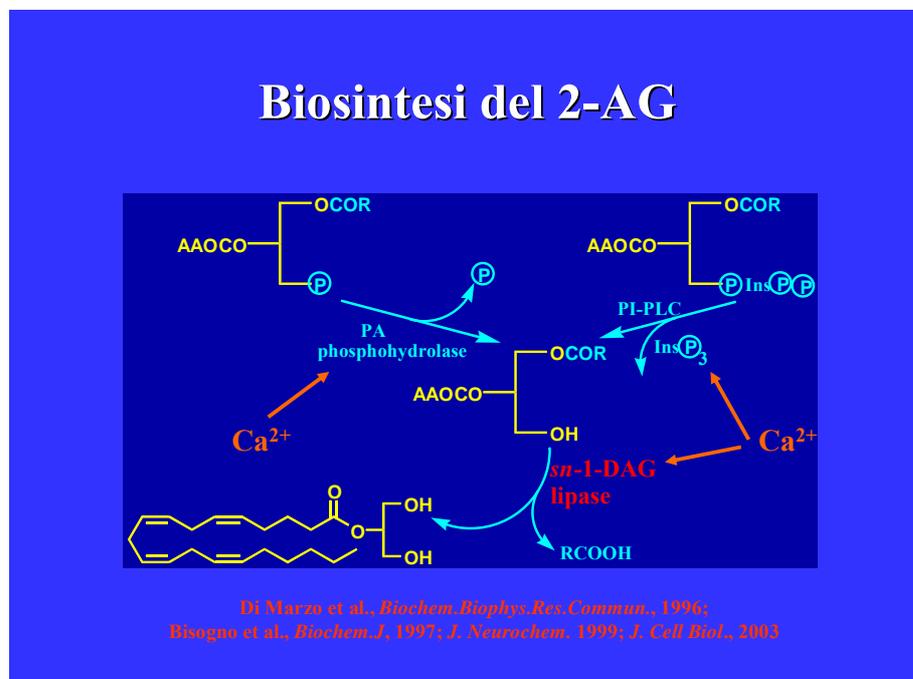
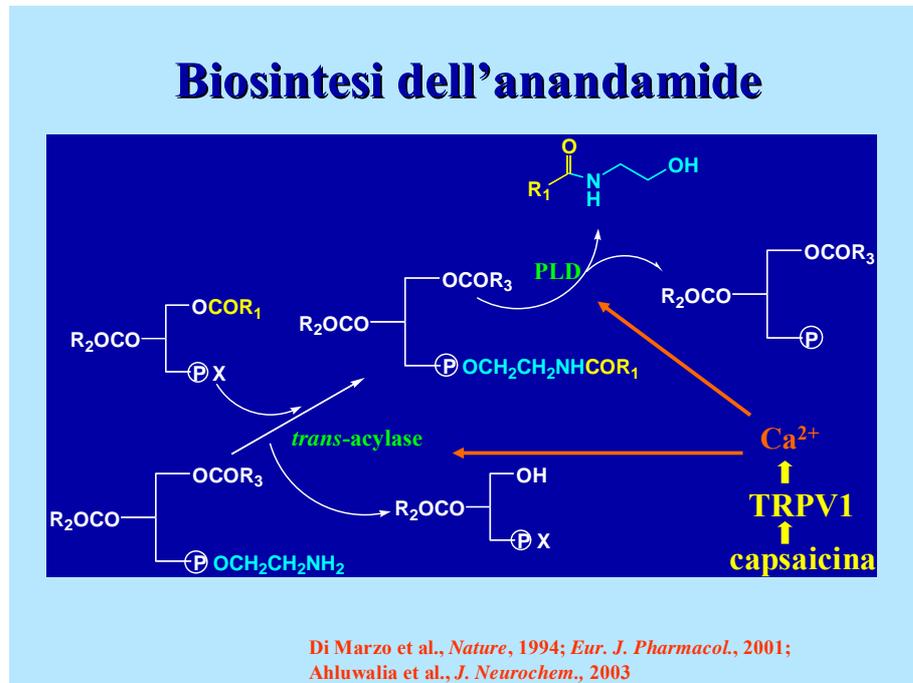


Fig 2

Antagonisti e agonisti sintetici dei recettori dei cannabinoidi

Sono stati sviluppati diversi antagonisti sintetici dei due recettori dei cannabinoidi (Pertwee 2006). Per il CB₁ il primo antagonista ad essere sviluppato fu l'SR141716A (rimonabant) nel 1994. Lo stesso gruppo ha sintetizzato anche il primo antagonista del recettore CB₂ l'SR144528 nel 1998. Altri antagonisti selettivi per il CB₁ sono LY320135, AM251 e AM281 gli ultimi due sono stati sintetizzati da Alexandros Makriyannis che ha sintetizzato anche l'inibitore del recettore CB₂ AM630. Sono stati sviluppati anche agonisti sintetici di questi recettori, tra questi l'agonista CB₁ HU210 e l'agonista CB₂ WIN552122.

Coinvolgimento del sistema endocannabinoide in situazioni patologiche

In letteratura sono numerosi i lavori che riportano il coinvolgimento del sistema endocannabinoide in diverse situazioni patologiche (Di Marzo 2006). Nel sistema nervoso centrale si riscontrano una serie di situazioni in cui la segnalazione endocannabinoide è elevata, ad esempio nell'ippocampo in seguito a citotossicità dovuta a glutammato, nell'ipotalamo in caso di privazione di cibo, nella sostanza grigia periacqueduttale dopo somministrazione di stimolo doloroso (Di Marzo 2004). In questi casi l'aumento della segnalazione ha un ruolo protettivo per i neuroni e questo viene svolto o con un'inibizione a feedback dell'attività glutamatergica o rinforzando l'appetito attraverso la soppressione di segnali anoressizzanti o determinando analgesia centrale sopprimendo l'attività di neuroni nocicettivi. La segnalazione endocannabinoide è anche aumentata in una serie di modelli

animali di malattie neurodegenerative come nei gangli della base di ratti trattati con 6-idrossidopamina o con reserpina (due modelli di morbo di Parkinson) o nell'ippocampo di ratti trattati con β amiloide (un modello di morbo di Alzheimer) o nel midollo spinale di topi CREAE con encefalomielite allergica sperimentale cronica (un modello di sclerosi multipla) (Di Marzo 2004). Anche in questo caso sembra che il ruolo del sistema endocannabinoide sia protettivo, infatti nel caso del morbo di Parkinson si oppone all'iperattività neuronale, nel morbo di Alzheimer contrasta l'infiammazione locale ed infine nel caso della sclerosi multipla agisce inibendo i tremori e la spasticità. Tuttavia la natura progressiva di queste malattie degenerative può portare ad una iperattivazione permanente del sistema endocannabinoide e questo può determinare la comparsa di sintomi tipici di queste patologie come l'inibizione dell'attività motoria nel morbo Parkinson e la perdita di memoria nel morbo di Alzheimer, effetti tipici di agonisti CB_1 . Un caso diverso si osserva per la corea di Huntington, in modelli animali di questa malattia infatti si ha una perdita di fibre che esprimono CB_1 dai primi stadi della patologia e ciò è responsabile della caratteristica ipercinesia (Lastres-Becker 2001). E' da segnalare che bassi livelli di recettori CB_1 sono stati riscontrati post mortem in pazienti con corea di Huntington.

Un ruolo notevole gli endocannabinoidi lo esercitano anche nel food intake e nel controllo del bilancio energetico; è stata evidenziata una iperattività del sistema endocannabinoide nell'ipotalamo e negli adipociti in modelli animali di obesità genetica (Di Marzo 2001).

Tra le patologie che riguardano l'apparato gastroenterico sono da ricordare l'infiammazione del piccolo intestino e l'ileo paralitico indotto da peritonite

(Di Marzo 2004). In entrambe queste patologie si assiste ad un aumento della segnalazione ai recettori CB₁, ma mentre nel primo caso ciò determina una protezione contro i sintomi della patologia nell'ileo paralitico contribuisce alla diminuzione della motilità intestinale. E' da ricordare il coinvolgimento del sistema endocannabinoide nel controllo delle funzioni riproduttive (Wang 2003). Nel topo è stato osservato che l'anandamide ha un doppio effetto sull'impianto dell'embrione a seconda della sua concentrazione, a bassa concentrazione lo stimola mentre ad alta lo inibisce; in donne gravide un difetto nell'idrolisi dell'anandamide, che ne determina un aumento dei livelli, è correlato ad un aborto prematuro o al fallimento dell'impianto di oociti fecondati in vitro. Infine c'è da evidenziare anche la relazione tra il livello di segnalazione endocannabinoide e il cancro. È stato riscontrato un aumentato livello della segnalazione endocannabinoide in tessuti maligni umani rispetto ai corrispettivi tessuti sani. Inoltre, è stato osservato che la stimolazione dei recettori CB₁ e CB₂ causa il blocco della proliferazione delle cellule cancerose o l'induzione della loro apoptosi in vitro, e l'inibizione della crescita del cancro, dell'angiogenesi e delle metastasi in vivo. Ciò suggerisce che le variazioni di attività del sistema endocannabinoide potrebbero rappresentare una delle risposte adattative che cercano di contrastare la proliferazione delle cellule tumorali (Di Marzo 2004). Inoltre, è stato osservato che inibitori dell'inattivazione degli endocannabinoidi possono rallentare la crescita tumorale (Bifulco 2004). E' stato però anche suggerito che il riscontro di una iperespressione dei recettori CB₂ in cellule emopoietiche precursori sia associata e possa essere un fattore causale della leucemia mieloide acuta. Si può così concludere che i cambiamenti della segnalazione endocannabinoide

siano qualche volta un tentativo di contrastare il processo patologico mentre altre volte rappresentano un fattore causale della malattia o dei suoi sintomi (Di Marzo 2004).

Ruolo fisiologico degli endocannabinoidi

Il 2-AG è l'endocannabinoide maggiormente espresso nei tessuti (Sugiura 1995). Durante lo sviluppo del cervello l'attività del suo enzima biosintetico, la DAG lipasi, è richiesta per la crescita assonale (Bisogno 2003). Il 2-AG in questo caso viene sintetizzato nel cono presinaptico in accrescimento sul quale sono presenti anche i recettori CB₁ su cui agisce. Nel cervello adulto gli endocannabinoidi (2-AG e anandamide) vengono prodotti nel neurone postsinaptico e agiscono sul CB₁ presente sul neurone presinaptico inibendo il rilascio di neurotrasmettitori sia nelle sinapsi eccitatorie che in quelle inibitorie (Kreitzer 2002). In generale, data la loro natura lipofila e la loro biosintesi su richiesta gli endocannabinoidi si comportano come dei mediatori locali agendo in modo autocrino o paracrino.

Il recettore TRPV1

Il TRPV1 (transient receptor potential channel vanilloid type 1) (Fig 3) è un trasduttore di stimoli nocicettivi sia fisici (calore, basso pH) che chimici come la capsaicina, principio attivo del peperoncino rosso piccante (*Capsicum annum*) (Caterina 1997), e la resiniferatossina derivato del lattice di una pianta simile ad un cactus (*Euphorbia resinifera*) tipica del Marocco.

Il recettore TRPV1 appartiene alla grande famiglia dei recettori TRP (transient receptor potential) che sono dei canali per cationi a sei domini di

transmembrana. Sono permeabili a diversi cationi sia monovalenti che bivalenti ma mostrano una permeabilità più elevata verso il Ca^{2+} . I TRP sono stati identificati per primo in *Drosophila* e sono rappresentati da più di venti recettori suddivisi in sei sottofamiglie (Clapham 2003 Nature). Della sottofamiglia TRPV il TRPV1 è il solo che risponde alla stimolazione di prodotti naturali come la capsaicina o la resiniferatossina (RTX). E' costituito da sei regioni di transmembrana con una regione del poro tra la quinta e la sesta, è assemblato come un tetramero che si organizza intorno ad un poro acquoso centrale. I domini N e C terminali sono intracellulari, il dominio N terminale contiene tre domini ripetuti di anchirina mentre il dominio C terminale presenta i siti di legame per la calmodulina e per il fosfatidil inositolo 4,5 bisfosfato (PIP_2). Viene attivato da una temperatura ≥ 42 °C; la stimolazione da parte dei vanilloidi, il basso pH e la presenza di sostanze proalgiche abbassano la soglia di attivazione di questo recettore (Ferrer-Montiel 2004). L'attivazione del TRPV1 nelle cellule dove è espresso determina un rapido aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulari. Nei neuroni ciò determina una depolarizzazione che se raggiunge un valore soglia determina l'insorgenza di un potenziale d'azione. L'attivazione del recettore è però subito seguita da uno stato di desensibilizzazione in cui i neuroni che esprimono questo recettore non rispondono a successive aggiunte di vanilloidi. Il TRPV1 oltre che nella membrana plasmatica si ritrova anche nella membrana del reticolo endoplasmatico. I TRPV1 sono molto abbondanti sulle fibre sensoriali periferiche di tipo C e $\text{A}\delta$ (Ferrer-Montiel 2004). A livello del sistema nervoso questo recettore è ampiamente distribuito. Nel cervello si trova infatti nei neuroni dopaminergici, nella sostanza negra, nei neuroni piramidali

ippocampali, nei neuroni ipotalamici, nel locus coeruleus, in vari strati della corteccia, (van der Stelt 2004) infine è abbondantemente espresso a livello dei DRG (gangli delle radici dorsali del midollo spinale). Inoltre il TRPV1 è presente in cellule non appartenenti al sistema nervoso quali cheratinociti dell'epidermide, nella vescica, nell'urotelio, nella muscolatura liscia, nel fegato, nei granulociti polimorfonucleati e nei macrofagi. Studi su topi che non possiedono recettori TRPV1 funzionali hanno evidenziato che il TRPV1 è implicato nella percezione del dolore termico e infiammatorio (Caterina 2000). Il TRPV1 è anche coinvolto nell'infiammazione intestinale e nel dolore neuropatico. Il TRPV1 potrebbe giocare un ruolo importante anche in condizioni fisiologiche come la regolazione delle funzioni vescicali. Inoltre la presenza del TRPV1 in diversi nuclei cerebrali suggerisce che questo recettore è coinvolto nel controllo di funzioni del sistema nervoso centrale come la plasticità neuronale, il controllo della temperatura corporea, il food intake e il movimento (Szallasi 2002).

Recettori dei Vanilloidi (TRPV1)

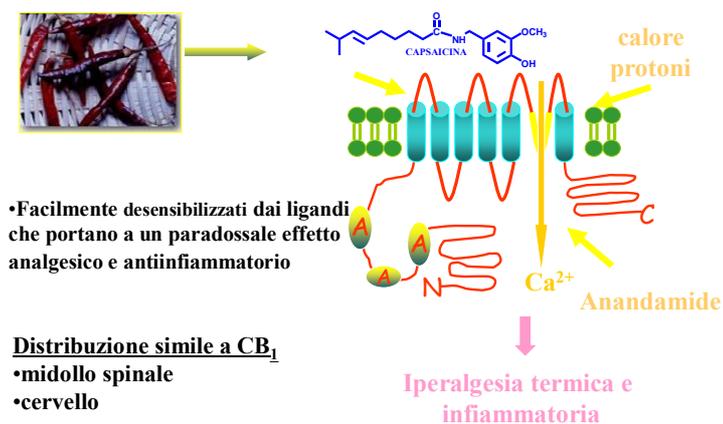


Fig 3

Tra gli antagonisti conosciuti ci sono la capsazepina e la 5 iodio RTX (Wahl 2001). Partendo dall'osservazione che la iodinazione dell'RTX (l'agonista più potente finora conosciuto di questo recettore) ha prodotto un potente inibitore del TRPV1 (la 5 iodio RTX) sono stati sviluppati nuovi antagonisti con l'alogenazione della capsaicina sintetica (nonanoil vanillamide = nordiidrocapsaicina) in posizione C-5 o C-6 della porzione vanillica con iodio, bromo o cloro. Si sono così ottenuti sei nuovi antagonisti, di questi gli alogenati in posizione 6 sono i più potenti. Inoltre gli iodio derivati sono più potenti dei bromo derivati e questi dei derivati del cloro, tutti e sei sono antagonisti competitivi (Appendino 2003).

Il TRPV1 oltre ad essere attivato da composti esogeni come la capsaicina è attivato anche da derivati dell'acido arachidonico quali l'endocannabinoide anandamide (Smart 2000) e l'N-arachidonoil dopamina (NADA) (Huang 2002) e da metaboliti dell'acido arachidonico derivati dall'azione di lipoossigenasi su questo acido grasso, quali il 12-(S) e il 15-(S) HPETE (acido idroperossieicosatetraenoico); questi composti endogeni possono essere definiti endovanilloidi. Tra gli endovanilloidi sopra citati quello che mostra maggiore attività sul TRPV1 è la NADA che è in grado di attivare questo recettore in cellule HEK-293 che sovraesprimono il recettore con una potenza paragonabile alla capsaicina (Huang 2002), mentre l'anandamide mostra una potenza 5-10 volte inferiore. Altri composti endogeni come le N-acildopamine, N-palmitoildopamina e N-stearoildopamina (PALDA e STEARDA) pur non attivando direttamente il TRPV1 sono in grado di modulare (incrementandola) l'attività dell'anandamide e della NADA sul recettore dei vanilloidi (De Petrocellis), mentre una terza N-acildopamina la N-oleoildopamina oltre ad

incrementare l'attività dell'anandamide sul TRPV1 è in grado di attivare questo recettore da sola.

Il TRPV1 può essere modulato tramite fosforilazione (De Petrocellis 2001) ad opera della proteina chinasi A (PKA) e della proteina chinasi C (PKC). La PKA in seguito a fosforilazione rende il recettore più sensibile all'anandamide, mentre attivatori della PKC potenziano la risposta del recettore alla capsaicina, in un meccanismo che prevede sia la fosforilazione del recettore che l'idrolisi del PIP₂ che si comporta come un regolatore negativo dell'attività del TRPV1.

Relazione tra il CB₁ e il TRPV1

I due recettori sono colocalizzati a livello di molte fibre sensoriali di tipo C non mielinizzate di piccolo diametro e a livello del midollo spinale e dei DRG (Ahluwalia 2000). In questi neuroni i due recettori sembrano giocare ruoli opposti: il TRPV1 sembra responsabile per la trasmissione del dolore durante l'iperalgia termica e infiammatoria (Caterina 2000), mentre il CB₁ sembra contrastare l'iperalgia e questo potrebbe essere ottenuto almeno in parte inibendo il TRPV1 (Kelly 2001). Tuttavia l'attivazione del TRPV1 da parte di agonisti sintetici potenti è seguita immediatamente dalla desensibilizzazione determinando un effetto analgesico in vivo. Esiste la colocalizzazione di questi due recettori anche nei nuclei del cervello e in aree coinvolte nel controllo delle funzioni motrici (sostanza negra, striato, cervelletto), funzioni cognitive e della memoria (ippocampo e corteccia), funzioni emozionali (amigdala) e nocicettive (sostanza grigia periacqueduttale) (Szabo 2002). L'anandamide è un ligando endogeno di entrambi i recettori. Sostanze in grado di attivare sia il CB₁ che il TRPV1 come l'ibrido strutturale AEA / capsaicina, l'arvanil, e i suoi

analoghi sono analgesici più potenti di agonisti puri CB₁ o TRPV1 (Melck 1999). In cellule HEK-293 in cui sono stati trasfettati entrambi i recettori (CB₁ di ratto e TRPV1 umano) l'uso di un agonista CB₁ l'HU210 aumenta la risposta della capsaicina sul TRPV1. Questo effetto è bloccato dall'antagonista CB₁ SR141716A e da inibitori della fosfoinositide 3 chinasi (PI-3K) e della fosfolipasi C. L'anandamide è più efficace nell'attivare il TRPV1 in cellule che esprimono anche il CB₁. La forskolina un attivatore dell'adenilato ciclasi aumenta l'effetto della capsaicina sul TRPV1. L'HU210 inibendo la sintesi di cAMP blocca l'effetto stimolatorio della forskolina. Ciò suggerisce che in cellule che co-esprimano entrambi i recettori il pretrattamento con agonisti CB₁ inibisce o stimola l'attivazione del TRPV1 da parte della capsaicina a seconda che è stata attivata o meno una risposta cAMP mediata (Hermann 2003).

Il recettore TRPM8

Il TRPM8 (transient receptor potential channel of melastatin type 8) è un canale di membrana appartenente alla famiglia dei recettori TRP (Fig 4) (McKemy 2005). Come il TRPV1 il TRPM8 è un canale cationico permeabile preferenzialmente agli ioni Ca²⁺, strutturalmente è organizzato come tetramero. I due recettori hanno una simile abbondante espressione in neuroni afferenti primari. Il TRPM8 è attivato dal freddo (McKemy 2002) (temperature inferiori a 25° C) e da composti come il mentolo (ingrediente attivo della menta), l'eucaliptolo e l'icilina (composto sintetico) che inducono una sensazione di fresco. Contrariamente al TRPV1 il TRPM8 è attivato dal PIP₂. Un'altra differenza tra questi due canali TRP è la loro regolazione ad opera del pH, infatti mentre un basso pH (<7) sensibilizza il TRPV1, esso è in grado di

bloccare le correnti mediate da TRPM8 provocate dall'icilina e dal freddo ma non quelle dovute al mentolo. Circa le modalità di attivazione del recettore TRPM8 queste sembrano non essere identiche per tutti i suoi agonisti, infatti l'icilina, contrariamente al freddo e al mentolo, è in grado di attivare il canale solo in presenza di calcio extracellulare. E' noto anche che c'è differenza per i domini del recettore implicati nella sensibilità all'icilina e al mentolo, infatti è stato osservato che i residui amminoacidici presenti nella regione linker tra i domini di transmembrana S2 ed S3 sono coinvolti nella sensibilità all'icilina ma non al mentolo. Per il mentolo sembrano importanti il dominio di transmembrana S2 e il dominio TRP che è una regione appartenente al C terminale altamente conservata tra i canali TRP e che è coinvolto nella sensibilità al PIP₂ (Bandell 2006). Il TRPM8 non si trova solo nei neuroni che sono sensibili ai cambiamenti di temperatura. Ad esempio il TRPM8 è iperespresso nel tumore della prostata e in altri tumori quali quelli della mammella, colon, polmone e pelle risultando però non rilevabile nei corrispondenti tessuti sani. Di notevole interesse è il coinvolgimento del TRPM8 nel tumore prostatico dove i livelli di espressione dell'mRNA di TRPM8 potrebbero essere un target prognostico di questa patologia e la comprensione del ruolo svolto da questo recettore nel carcinoma prostatico potrebbe aprire la strada alla messa a punto di nuove strategie terapeutiche.

Recettori TRP

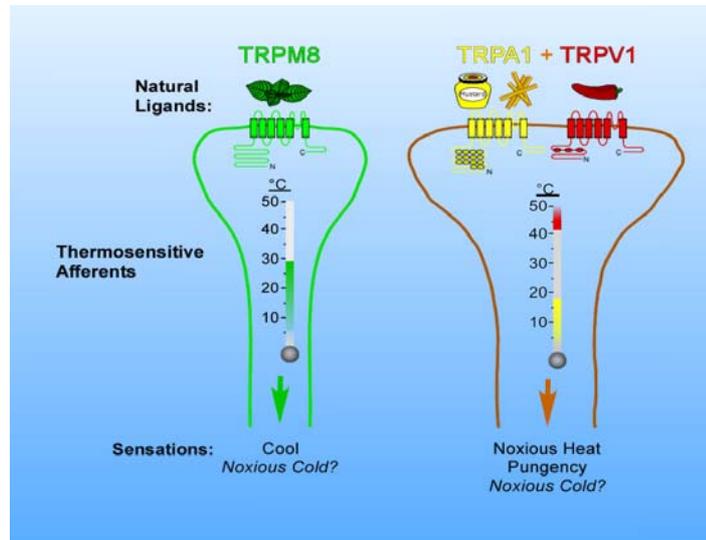


Fig 4

Scopo del lavoro

Esiste una vasta letteratura riguardante il coinvolgimento del sistema endocannabinoide in situazioni patologiche. Composti che sono in grado di modulare i livelli degli endocannabinoidi sono quindi potenzialmente interessanti a livello terapeutico. Da qui nasce l'interesse di una maggiore comprensione del metabolismo degli endocannabinoidi e in particolare dell'anandamide e del suo meccanismo di ingresso nelle cellule. Per questo motivo sono stati testati una serie di composti in grado di modulare questo processo. L'anandamide inoltre interagisce anche con il recettore TRPV1, recettore noto per essere coinvolto nella patogenesi del dolore cronico ed infiammatorio. L'uso di composti in grado di antagonizzare il recettore dei vanilloidi e magari capaci di inibire l'idrolisi dell'anandamide potrebbe essere importante nel trattamento del dolore. Questo ci ha fatto decidere di testare nuovi composti come antagonisti del recettore dei vanilloidi. Recentemente un

altro recettore appartenente alla famiglia dei TRP, il TRPM8 è stato studiato per il suo coinvolgimento in patologie tumorali in particolare nel carcinoma prostatico. Abbiamo voluto studiare in questo caso la sua modulazione fisiologica e l'interazione di questo recettore con i sistemi endocannabinoide ed endovanilloide. Infine dato le note proprietà antitumorali del THC, il cui uso terapeutico è però limitato dai suoi effetti psicotropi, si sono valutate le proprietà antitumorali di altri composti derivati dalla *Cannabis* privi degli effetti avversi sul sistema nervoso centrale tipici del THC.

Materiali e Metodi

Colture cellulari

Le cellule sono state cresciute a 37° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Le cellule HEK-293 sono state coltivate in EMEM contenente FBS (siero bovino fetale) al 10% e amminoacidi non essenziali all'1%. Le cellule RBL-2H3 sono state coltivate in EMEM contenente FBS al 10%. Le cellule C6, MDA-MB-231, DU-145 e MCF7 sono state coltivate in RPMI 1640 + FBS al 10%. Le cellule AGS e le HaCat sono state coltivate in DMEM-F12-Ham + FBS al 10%, le CaCo-2 in DMEM + 10% FBS, le cellule Kimol in Coon's modified F12-Ham + 10% FBS, infine le cellule 3T3-F442A sono state coltivate in DMEM Glutamax completato con 10% NCS (siero dia vitello neonato), 1% di amminoacidi non essenziali e 20 mM HEPES.

Saggio sul trasportatore di membrana dell'anandamide

Per saggiare la capacità di inibire l'ingresso nelle cellule dell'endocannabinoide anandamide da parte dei composti chimici analizzati

sono state utilizzate le cellule RBL-2H3 (cellule di leucemia basofila di ratto) o C6 (cellule di glioma di ratto). Le cellule sono state incubate con 2.4 μM (10000 cpm) di [^{14}C] anandamide per 5 minuti a 37° C in presenza o in assenza di varie concentrazioni di inibitori. Il supernatante veniva recuperato e la [^{14}C] anandamide in esso contenuta veniva estratta con $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 volume:volume) e veniva letta allo scintillatore. I valori così ottenuti ci permettevano di fare una stima dell'anandamide che era entrata nelle cellule. I dati sono stati espressi come IC_{50} cioè come la concentrazione del composto in esame in grado di inibire del 50% l'ingresso dell'anandamide nelle cellule e sono stati calcolati con il Graph Pad Software Inc. In alcune prove i composti da testare venivano solo preincubati e rimossi con tre lavaggi con mezzo di coltura con BSA (albumina da siero bovino) allo 0.2% seguiti da due lavaggi con lo stesso mezzo senza BSA prima dell'aggiunta dell'anandamide.

Saggio di attività dei recettori TRPV1 e TRPM8

Si sono utilizzate cellule HEK-293 (cellule embrionali di rene umane) che iperesprimono il recettore TRPV1 umano o TRPM8 di ratto. Le cellule sono state coltivate in EMEM completato con l'aggiunta di amminoacidi non essenziali, 10% siero bovino fetale e mantenute a 37° C in atmosfera umidificata contenente CO_2 al 5%. Per studiare l'effetto di vari composti sulla mobilizzazione di Ca^{2+} mediata dai recettori TRPV1 e TRPM8 le cellule sono state marcate con una sonda fluorescente, Fluo-3 metilestere o Fluo-4 metilestere alla concentrazione di 4 μM , solubilizzato in dimetilsolfossido contenente Pluronic (un agente disperdente) al 0.04%, per un'ora a temperatura ambiente. Al termine della marcatura le cellule sono state lavate con tampone

Tyrode pH 7.4 e trasferite in una cuvetta di quarzo di uno spettrofluorimetro (Perkin Elmer LS50B) dove erano mantenute in continua agitazione. Gli esperimenti sono stati compiuti misurando la fluorescenza cellulare a 25° C ($\lambda_{EX} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 540 \text{ nm}$ per il Fluo-3 o $\lambda_{EM} = 516 \text{ nm}$ per il Fluo-4) prima e dopo l'aggiunta dei composti da testare a varie concentrazioni. L'efficacia degli agonisti del TRPV1 e TRPM8 è stata calcolata comparando il loro effetto con quello dello ionoforo ionomicina alla concentrazione di 4 μM . L'attività di un composto come agonista del recettore viene misurata come EC_{50} che rappresenta la concentrazione alla quale il composto esercita il 50% del suo effetto massimo sul recettore. La capacità inibitoria di un composto su uno dei due recettori viene valutata come IC_{50} che rappresenta la concentrazione alla quale il composto in esame inibisce del 50% l'attività di un agonista noto ad una data concentrazione esercitata sul recettore. Per valutare se un antagonista è competitivo o non competitivo si effettua il test dello Schild plot. L'antagonista si può considerare competitivo se la pendenza della retta che si ottiene da questo test è ~ 1 mentre non è competitivo quando è < 0.8 .

Saggio di proliferazione cellulare

Le cellule sono state piastrate in una piastra a sei pozzetti alla densità di 5×10^4 cellule per pozzetto a 37° C in atmosfera umidificata contenente CO_2 al 5%. Tre ore dopo il piastramento sono stati aggiunti alle cellule il veicolo o le sostanze da analizzare a differenti concentrazioni e tali aggiunte sono state ripetute ogni 24 ore per quattro giorni cambiando il mezzo di incubazione. Al quarto giorno veniva rimosso il mezzo di incubazione, le cellule venivano poi lavate con PBS e successivamente fissate in formalina al 10% per 15 minuti.

Dopo la rimozione della formalina e il lavaggio delle cellule con acqua le cellule venivano colorate con il Crystal Violet (un colorante vitale) allo 0,1% per 30 minuti. Al termine della colorazione rimuovendo il mezzo e lavando le cellule con acqua si eliminava il colorante che non era penetrato nelle cellule. Le cellule sono state in seguito lisate con acido acetico al 10% e analizzate spettrofotometricamente leggendo la loro assorbenza a 595 nm. I valori di densità ottica delle cellule trattate con veicolo sono state considerate come 100% di proliferazione.

Trasfezione permanente di cellule HEK-293 con cDNA di TRPM8 di ratto

Le cellule HEK-293 sono state piastrate in capsule di Petri di 100mm di diametro e trasfettate quando hanno raggiunto circa l'80% di confluenza. La trasfezione è stata effettuata utilizzando Lipofectamina 2000 utilizzando un plasmide contenente cDNA di TRPM8 di ratto. Si è utilizzato un rapporto tra Lipofectamina e plasmide di 2.5:1 (μl / μg). Si è ottenuta una trasfezione stabile selezionando le cellule con geneticina (G418) alla concentrazione di 600 μg / ml, che veniva aggiunta nel mezzo di crescita delle cellule.

Trasfezione di cellule TRPM8-HEK-293 con cDNA di CB₁ umano

Le cellule HEK-293 stabilmente trasfettate con TRPM8 (TRPM8-HEK-293) sono state trasfettate in maniera transiente con il plasmide pcDNA3 contenente cDNA di CB₁ umano utilizzando Lipofectamina 2000 seguendo la stessa procedura utilizzata per trasfettare il TRPM8.

Valutazione dell'espressione genica

L'RNA è stato estratto dalle cellule con Trizol (Invitrogen) seguendo le indicazioni del produttore. L'RNA è stato quindi solubilizzato in RNA-storage-solution (Ambion), e quantificato spettrofotometricamente. Venivano poi utilizzati 3 µg di RNA che erano trattati con DNAsi I (RNAsi free) per eliminare eventuali contaminazioni di DNA genomico. Si è poi retroscritto 1 µg di RNA totale in una miscela di reazione di 25 µl contenente: 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM ditiotreitolo 1 mM dNTP, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 20 unità di inibitore delle RNAsi (Invitrogen) e 0.125 unità (A₂₆₀) di una miscela di esanucleotidi come random-priming. La miscela di reazione veniva incubata per 5 min a 55° C. Seguiva un rapido raffreddamento a 4° C per 2 minuti. Durante questo step l'incubazione veniva sospesa e venivano aggiunte 200 unità di retroscrittasi Superscript[®] III (Invitrogen) in tutti i campioni tranne che nei controlli negativi. L'incubazione quindi veniva ripresa e si effettuava prima un passaggio a 20° C per 10 min a cui seguivano 90 min a 50 °C. La reazione veniva terminata riscaldando a 95°C per 10 min.

La real-time PCR è stata effettuata con un iCycler-iQ[®] in una miscela di reazione di 25 µl contenente: 1x iQ-SYBR-Green-Supermix (Bio Rad), da 10 a 50 ng di cDNA e 300 nM di primers. Il profilo di amplificazione consisteva in una iniziale denaturazione di 2 min a 94° C seguiti da 40 cicli così strutturati: 30 sec a 94°C seguiti da un annealing di 30 sec alla temperatura ottimale di annealing e da un periodo di allungamento di 45 sec a 68° C. I primers e la temperatura di annealing sono stati definiti mediante l'utilizzo del software Beacon-Designer[®] versione 5.1 (Biosoft International). I risultati sono stati

normalizzati rispetto all'espressione dei geni di riferimento β -actina e β -2-microglobulina.

Una RT-PCR semiquantitativa è stata eseguita per valutare l'espressione degli mRNA di CB₁, CB₂, TRPV1 e GAPDH (housekeeping) in tutte le linee cellulari usate nello studio dei fitocannabinoidi. In questo caso l'amplificazione dei cDNA è stata effettuata in un tampone di 25 μ l contenente: 2 μ l di cDNA, 500 μ M di dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.8 μ M di ciascun primer, e 0.5 U di *Taq* polimerasi platinum (Invitrogen). Il profilo termico della reazione consisteva di uno step di denaturazione a 94 °C per 1 min, annealing per 1 min a 55 °C (GAPDH) o 57 °C (CB₂ e TRPV1) o 60 °C (CB₁), seguito da uno step di estensione a 72 °C per 1 min. Alla fine dei cicli è stato effettuato uno step di estensione finale a 72 °C per 10 min. Alla fine della PCR i prodotti di amplificazione sono stati corsi su un gel di agarosio al 2% contenente etidio bromuro per la visualizzazione agli UV. Gli oligonucleotidi utilizzati nella PCR sono stati disegnati sulla base di sequenze depositate in GenBank.

Risultati

Saggi su nuovi inibitori della captazione cellulare dell'anandamide

Sulla base della struttura di due noti inibitori dell'ingresso dell'anandamide nelle cellule, OMDM1 e OMDM2 sono stati sintetizzati una serie di nuovi composti modificando la porzione polare aromatica o la coda alchilica dei composti sopra citati (Fig 5). I composti così ottenuti sono in grado di formare legami covalenti con residui amminoacidici o direttamente o in seguito ad esposizione agli UV. Tutti i composti sono stati saggiati su cellule RBL-2H3 per analizzare la loro capacità di inibire la captazione cellulare

dell'anandamide. Quando venivano coincubati per 5 min insieme all'anandamide radiomarcata quasi tutti i composti si sono dimostrati in grado di inibire l'ingresso dell'anandamide nelle cellule (vedi tabella1). Gli effetti inibitori mostrano generalmente una selettività legata alla conformazione enantiomerica. I composti che sono risultati più attivi sono stati sottoposti a nuove prove per valutare la loro capacità di formare legami stabili con il putativo trasportatore. I composti che non hanno bisogno di una esposizione agli UV per formare legami covalenti venivano preincubati per un'ora con le cellule. Prima dell'aggiunta di [¹⁴C] anandamide i composti venivano rimossi con opportuni lavaggi. Nessuno di questi composti (tabella 1) quando veniva solo preincubato era però in grado di inibire in maniera significativa l'ingresso dell'anandamide. Per i composti fotoattivabili si è eseguito un protocollo sperimentale diverso in cui veniva utilizzata la linea cellulare C6 (più resistente agli UV). I composti in esame sono stati preincubati per 8 min a temperatura ambiente in presenza di luce UV (315-400 nm, 125 W) o al buio. Dopo la preincubazione si procedeva con una serie di lavaggi prima dell'aggiunta di anandamide radiomarcata. Con questi composti si sono ottenuti i risultati più interessanti, in particolare i composti 1a (OMDM-37), 1b (OMDM-39) e 8 (Lo 395) hanno dimostrato di essere in grado di inibire l'ingresso dell'anandamide anche quando vengono solo preincubati (vedi tabella 2) e per il composto Lo 395 si nota che l'esposizione agli UV aumenta significativamente la sua capacità inibitoria (il % di inibizione risultava 60.0 ± 13.9 in presenza di esposizione agli UV contro 32.8 ± 8.6 delle prove condotte al buio).

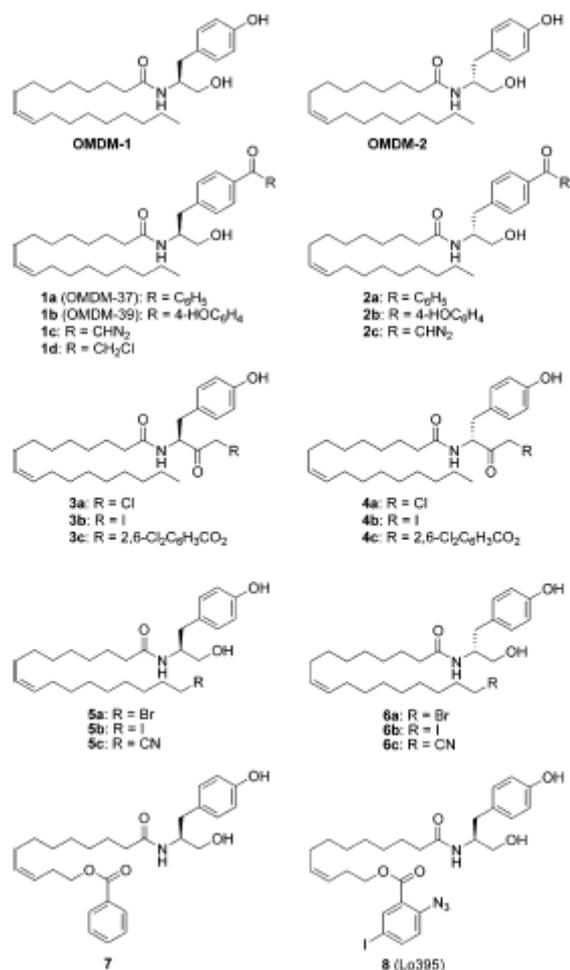


Fig 5: Composti derivati da OMDM 1e OMDM 2

Tabella 1: Effetti inibitori dei composti sulla captazione di [¹⁴C]Anandamide in cellule RBL-2H3

Composto	Solo coincubazione	1 h di sola preincubazione
1a	6.0±0.9	N.T. (test UV)
2a	10.0±1.2	N.T.
1b	10.1±1.3	N.T. (test UV)
2b	8.1±0.8	N.T.
1c	>25	N.T.
2c	>25	N.T.
1d	>25	N.T.
3a	10.0±4.1	>25
4a	>25	N.T.
3b	>25	N.T.
4b	>25	N.T.
3c	16.1±2.6	>25
4c	7.5±1.5	>25
5a	10.2±1.4	>25
6a	20.1±2.3	N.T.
5b	10.8±1.5	>25
6b	14±1.1	>25
5c	23.1±2.6	N.T.
6c	>25	N.T.
7	>25	N.T.
8 (Lo395)	11.0±1.6	N.T. (test UV)

N.T. : non testato o testato con gli UV. Dati espressi come IC₅₀ (µM)

Tabella 2: Inibizione della captazione di [¹⁴C]Anandamide in cellule C6 irradiate con gli UV o al buio

Composto, concentr., N	% di inibizione al buio	% di inibizione con UV
1a, 5µM, N=3	37.5±1.5	30.3±3.1 (P>0.1)
1a, 10µM, N=3	65.8±6.5	57.2±5.5 (P>0.1)
1b, 5µM, N=3	28.3±0.9	68.6±24.0 (P=0.1)
1b, 10µM, N=3	73.6±7.5	73.2±6.9 (P>0.1)
8, 10µM, N=6	32.8±8.6	60.0±13.9 (P=0.038)

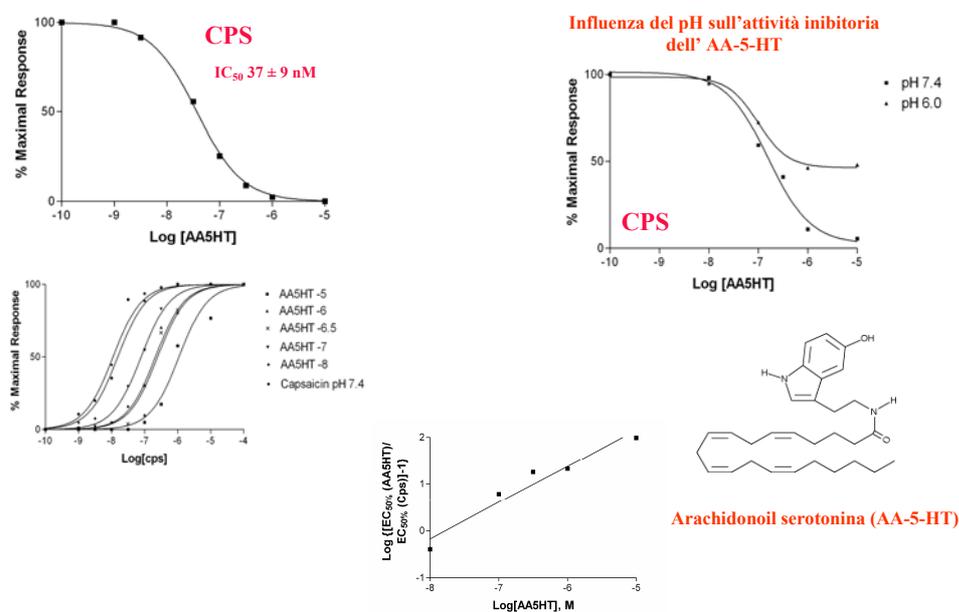
P calcolato tramite ANOVA seguito dal test di Student Newman Keuls

Valutazione dell'attività dell'N-arachidonoil serotonina (AA-5-HT) sul recettore dei vanilloidi TRPV1

L'azione dell'AA5-HT sul TRPV1 è stata valutata tramite saggio spettrofluorimetrico in cellule HEK-293 che sovraesprimono il recettore TRPV1 umano, marcando queste cellule con la sonda sensibile al Ca²⁺ Fluo-3 metilestere. L'AA-5-HT ha dimostrato di essere inattivo di per sé come agonista del recettore a concentrazioni fino a 10 µM. L'AA-5-HT è stato testato come inibitore valutando la sua capacità di inibire l'ingresso di Ca²⁺ mediato dal recettore TRPV1 in seguito alla sua attivazione da parte della capsaicina (100 nM) o dell'anandamide (1 µM). I risultati così ottenuti mostrano che l'AA-5-HT è un buon antagonista del TRPV1 avendo ottenuto dai saggi effettuati valori di IC₅₀ di 37 ± 9 nM e 105 ± 13 nM rispettivamente negli esperimenti effettuati con la capsaicina e con l'anandamide. L'AA-5-HT non riusciva ad antagonizzare completamente la risposta della capsaicina quando i saggi venivano effettuati a pH 6. Il composto in esame ha mostrato di inibire anche il TRPV1 di ratto sempre iperespresso in cellule HEK-293. In questo caso il valore di IC₅₀ ottenuto verso la capsaicina 100 nM è stato di 40 ± 6 nM. Tramite il test dello Schild plot è stato valutato se l'AA-5-HT è un antagonista competitivo o non competitivo del recettore TRPV1. L'AA-5-HT è risultato un antagonista non competitivo dato che la pendenza della retta di

Schild, calcolata dalle curve dose-risposta della capsaicina, è risultata 0.75 ± 0.14 con $r^2 = 0.96$ (Fig 6).

Antagonisti TRPV1: AA-5-HT



Saggi di ingresso di Ca²⁺ effettuati in HEK 293 trasfettate con TRPV1

Fig 6 A sinistra dall'alto effetto di AA-5-HT verso capsaicina 0.1 μ M; effetto di concentrazioni crescenti di AA-5-HT sulle curve dose-risposta della capsaicina; a centro retta di Schild; a destra effetto del pH

Valutazione dell'attività del 6-I arvanil e del 6-I olvanil sul recettore dei vanilloidi TRPV1

Il 6-I arvanil e il 6-I olvanil derivano dalla iodurazione dell'arvanil e dell'olvanil che in precedenza erano risultati potenti agonisti del TRPV1 in saggi di attività del recettore in HEK-293 che sovraesprimevano il recettore TRPV1 umano (De Petrocellis 2000). La iodurazione di questi composti li trasforma da agonisti in antagonisti con una apprezzabile potenza inibitoria

essendo più potenti della capsazepina (noto antagonista del TRPV1) nell'inibire l'attività della capsaicina 100 nM con valori di IC_{50} di 51 ± 7 nM per il 6-I arvanil e 35 ± 6 nM per il 6-I olvanil. I due inibitori hanno mostrato buona attività inibitoria anche quando provati contro altri due agonisti del TRPV1, l'anandamide e il NADA (Fig 7 e Fig 8). Testato verso anandamide 1 μ M il 6-I arvanil e il 6-I olvanil hanno esibito rispettivamente valori di IC_{50} di 30.1 ± 4.9 e di 6.7 ± 0.9 nM, mentre quando provati verso NADA 0.3 μ M i valori di IC_{50} ottenuti sono stati di 39.4 ± 7.6 nM per il 6-I arvanil e di 67.0 ± 12.5 nM per il 6-I olvanil. Dalle curve dose-risposta si sono ricavati le pendenze degli Schild plot per valutare se gli effetti inibitori sono di tipo competitivo o non competitivo. Entrambi i composti si comportano come antagonisti competitivi verso l'anandamide e non competitivi verso la capsaicina e il NADA. Le pendenze degli Schild plot erano per il 6-I arvanil di 0.53 ± 0.09 e 0.77 ± 0.09 rispettivamente per capsaicina e NADA mentre era di 1.16 ± 0.16 per l'anandamide. Nel caso del 6-I-olvanil i valori ottenuti sono stati 0.46 ± 0.04 e 0.50 ± 0.09 rispettivamente verso capsaicina e NADA mentre 0.93 ± 0.10 con l'anandamide.

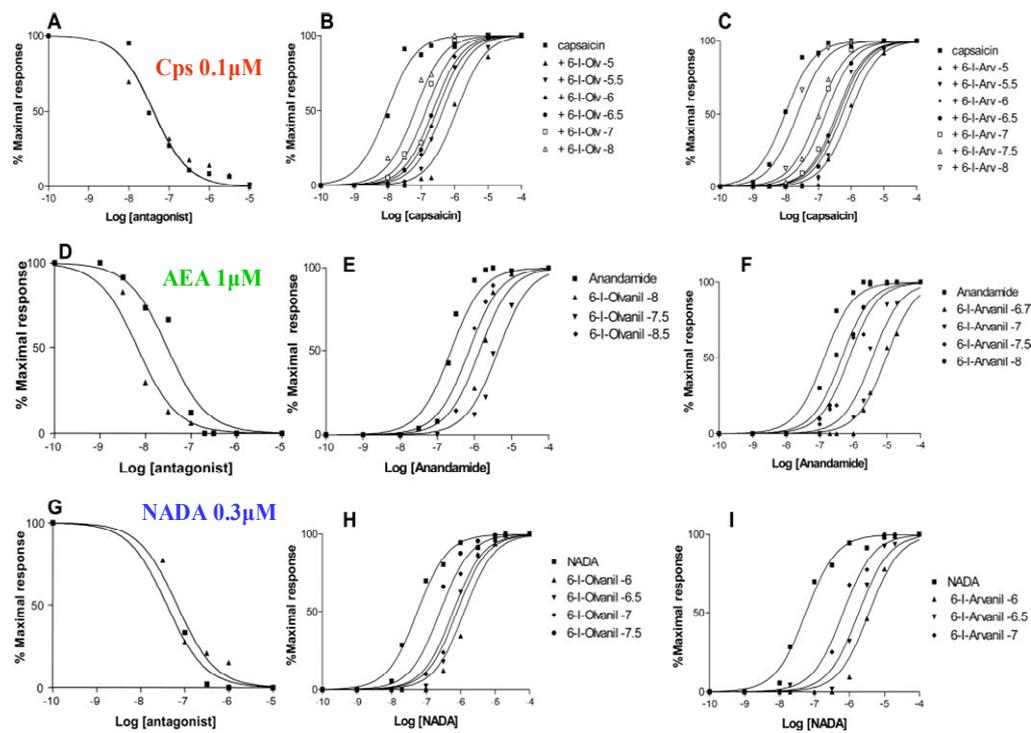
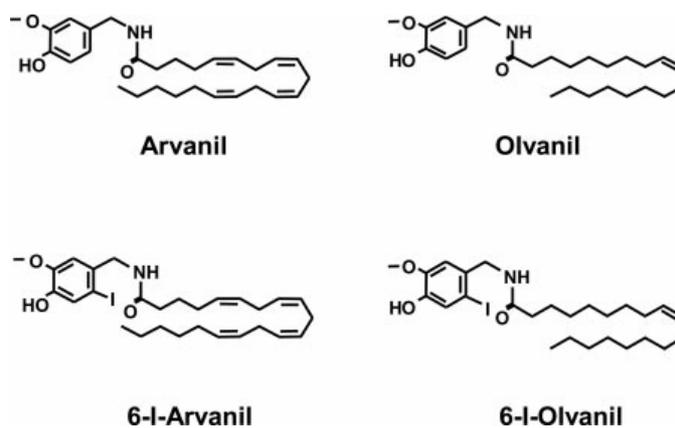


Fig 7 A, D, G effetto di 6-I olvanil e 6-I arvanil rispettivamente verso capsaicina 0.1 μM, anandamide 1 μM e NADA 0.3 μM; B, E, H effetto di concentrazioni crescenti di 6-I olvanil e C, F, I, effetto di concentrazioni crescenti di 6-I arvanil sulle curve dose-risposta degli agonisti usati nella stessa riga



	Capsaicina	Anandamide	NADA
6-I-Olvanil	35 ± 6 nM	6.7 ± 0.9 nM	67 ± 12.5 nM
6-I-Arvanil	51 ± 7 nM	30.1 ± 4.9 nM	39.4 ± 7.6 nM

IC₅₀ calcolata in saggi di ingresso di Ca²⁺ in cellule HEK 293 trasfettate con TRPV1 umano

Fig 8 Strutture di 6-I olvanil e 6-I arvanil e valori di IC₅₀ verso capsaicina 0.1 μM, anandamide 1 μM e NADA 0.3 μM

Effetto dei fitocannabinoidi sulla crescita cellulare

E' stata saggiata la capacità di una serie di fitocannabinoidi (Fig 9) di ridurre la crescita cellulare di una serie di linee cellulari tumorali. Sono stati utilizzati il THC, il THC acido (THCA), il cannabidiolo (CBD), il cannabicromene (CBC) ed estratti ricchi in THC e CBD. Tra le molecole utilizzate, il cannabidiolo è sempre risultato il più efficace con valori di IC₅₀ che vanno da 6.0 ± 3.0 a 10.6 ± 1.8 μM (Fig 10) e l'estratto ricco in cannabidiolo risultava equipotente. Come ordine di potenza seguiva il cannabigerolo. L'effetto inibitorio si riscontrava su quasi tutte le linee cellulari usate, ma per la linea cellulare di carcinoma di prostata umana DU-145 l'inibizione della crescita si aveva solo alla più alta concentrazione testata (25 μM), mentre alle basse concentrazioni si

aveva addirittura un effetto stimolatorio della crescita cellulare. E' stata valutata la citotossicità dei fitocannabinoidi con la colorazione con tripan blu. Da ciò è risultato che i composti analizzati risultano citotossici solo a partire da 25 μM . Per valutare la selettività del cannabidiolo verso le cellule tumorali rispetto alle non tumorali, questo fitocannabinoide è stato testato in parallelo su due linee cellulari non tumorali, le HaCat (cheratinociti umani) e sulle 3T3-F442A (preadipociti di ratto). Su queste linee il cannabidiolo non aveva nessun effetto sulla vitalità cellulare quando veniva usato a concentrazioni simili ai valori di IC_{50} mentre un effetto citotossico si poteva osservare a partire da 25 μM . Infine è stata provata la selettività del cannabidiolo testandolo anche su una linea cellulare primaria derivata dalla ghiandola mammaria, le HMepC (cellule epiteliali mammarie umane), il cannabidiolo esercitava una significativa attività antiproliferativa a partire da 25 μM .

Fitocannabinoidi

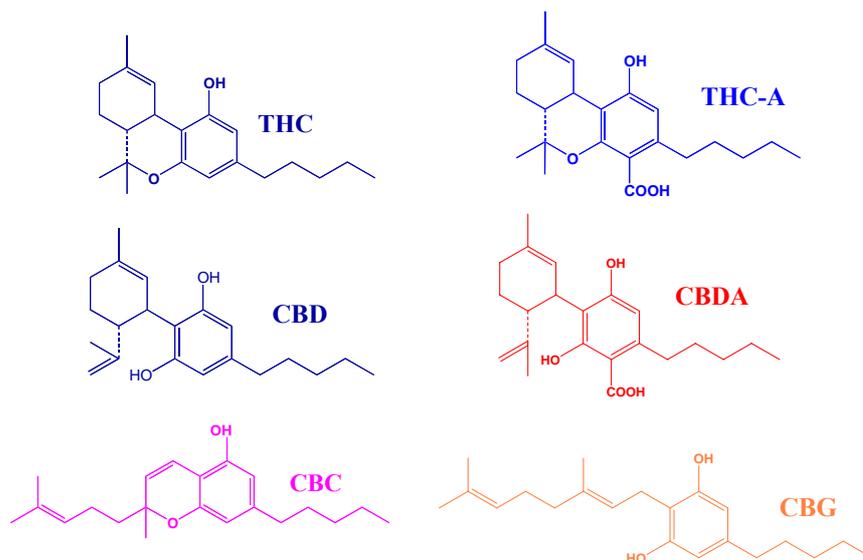


Fig 9 Struttura dei fitocannabinoidi

Effetto dei fitocannabinoidi sulla crescita di diverse linee cellulari

Composti	MCF-7	C ₆	DU-145	KiMol	CaCo2	MDA-MB-231	RBL-2H3	AGS
Δ^9 THC	14.2 ± 2.1	23.0 ± 4.2	> 25	23.2 ± 1.5	16.5 ± 0.2	24.3 ± 4.2	15.8 ± 3.7	19.3 ± 1.5
THC-A	9.8 ± 0.4	18.0 ± 5.3	> 25	21.0 ± 2.7	21.5 ± 1.4	18.2 ± 5.3	10.0 ± 3.4	> 25
CBD	8.2 ± 0.3	8.5 ± 0.8	20.2 ± 1.8	6.0 ± 3.0	7.5 ± 0.5	10.6 ± 1.8	6.3 ± 1.5	7.5 ± 1.3
CBD-A	21.7 ± 3.2	18.0 ± 4.2	> 25	12.7 ± 3.0	> 25	> 25	> 25	> 25
CBC	14.2 ± 1.4	13.0 ± 2.6	> 25	7.3 ± 3.0	12 ± 2.4	20.4 ± 2.6	15.8 ± 4.2	18.3 ± 3.0
CBG	9.8 ± 3.6	13.0 ± 2.1	21.3 ± 1.7	8.2 ± 0.7	9.0 ± 1.4	16.2 ± 2.6	9.0 ± 0.7	8.2 ± 0.7
THC-rich	21.0 ± 0.5	18.5 ± 3.3	> 25	23.0 ± 2.0	16.0 ± 0.5	25.2 ± 3.3	14.6 ± 3.1	22.0 ± 2.0
CBD-rich	6.0 ± 1.0	4.7 ± 0.6	20.0 ± 4.6	6.2 ± 2.9	12.3 ± 1.2	14.1 ± 1.6	7.0 ± 0.6	10.0 ± 1.9

Sono riportati per tutte le linee cellulari i valori di IC₅₀ (µM) di inibizione della proliferazione cellulare

Di tutti i composti testati e su tutte le linee cellulari analizzate il CBD si è rivelato sempre il più potente inibitore della proliferazione delle cellule tumorali

Fig 10 Effetti antiproliferativi dei fitocannabinoidi su linee cellulari tumorali

Studi per valutare i meccanismi d'azione dei fitocannabinoidi

L'espressione dei recettori CB₁, CB₂ e TRPV1 per RT-PCR è stata valutata mediante uno screening delle linee cellulari utilizzate. Questi recettori risultavano espressi in quasi tutte le linee usate (Fig 11). Per valutare la possibilità che il TRPV1 potesse mediare gli effetti dei fitocannabinoidi questi ultimi sono stati saggiati su cellule TRPV1-HEK-293. Dei composti testati il cannabidiolo si comportava da buon agonista del TRPV1, mentre degli altri composti il cannabidiolo acido e il cannabigerolo si comportavano da deboli agonisti e gli altri erano inattivi sul recettore. Per valutare il coinvolgimento dei recettori dei cannabinoidi e dei vanilloidi nell'effetto anticancro dei fitocannabinoidi è stato studiato l'effetto di antagonisti selettivi dei recettori, nelle cellule dove erano espressi. Sono stati utilizzati l'inibitore del TRPV1 5-iodio- resinferatossina (I-RTX 100 nM), del CB₁ SR141716A (0.5 µM) e del CB₂ SR144528 (0.5 µM) ed è stata valutata la loro capacità di contrastare l'effetto inibitorio di cannabidiolo 10 µM. Un effetto statisticamente

significativo si è osservato nelle cellule del cancro della mammella umano MDA-MB-231 dove I-RTX ed SR144528 sono in grado di revertire anche se solo parzialmente l'effetto del cannabidiolo. Quando somministrati insieme i due inibitori abbassavano del 40% l'effetto del cannabidiolo, questo risultato era probabilmente minimizzato dal fatto che la miscela dei due inibitori inibiva la crescita cellulare di per sé (Fig 11).

Meccanismo molecolare d'azione:

effetto di antagonisti selettivi dei recettori CB₁, CB₂ e TRPV1

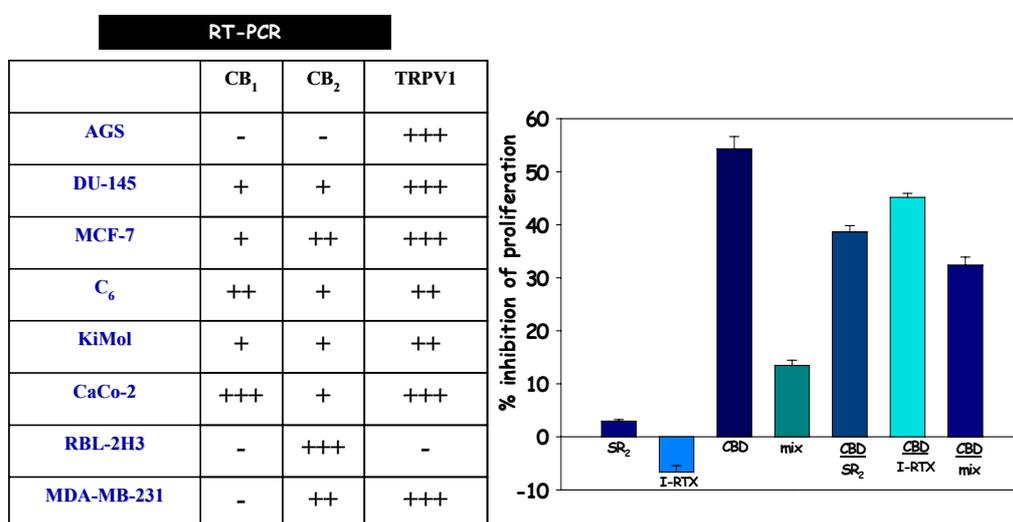


Fig 11 A sinistra livelli di espressione degli mRNA di CB₁, CB₂ e TRPV1 nelle cellule utilizzate; a destra effetto di antagonisti di CB₂ (SR₂) e TRPV1 (I-RTX) sull'effetto antiproliferativo del CBD sulle cellule MDA-MB-231

Coinvolgimento dello stress ossidativo nell'azione del cannabidiolo sulle cellule MDA-MB-231

Sono stati studiati gli effetti dell'uso di sostanze antiossidanti sull'azione antiproliferativa del cannabidiolo 10 μ M. L' α tocoferolo già alla concentrazione di 0.1 μ M era in grado di contrastare in maniera significativa

l'effetto del cannabidiolo. Inoltre anche la vitamina C e l'astaxantina a 25 μM erano in grado di ridurre l'effetto inibitorio del cannabidiolo di circa il 30% (Fig 12). Per chiarire meglio il ruolo del cannabidiolo sono stati fatti esperimenti per valutare se il cannabidiolo inducesse la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) nelle MDA-MB-231. Le cellule in questo caso venivano caricate con la sonda fluorescente 2',7'-dicloro fluoresceina diacetato 10 μM ($\lambda_{\text{EX}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 521 \text{ nm}$) per 1 ora a 37 °C per seguire spettrofluorimetricamente la produzione di ROS. Il cannabidiolo (10 μM) quando veniva incubato con le cellule in un tampone contenente Ca^{2+} determinava una produzione di ROS che era dipendente sia dal tempo del trattamento che dalla dose utilizzata (Fig 12). In maniera significativa l'effetto di un trattamento di 60 minuti con cannabidiolo veniva annullato quando le cellule venivano preincubate con il chelante del Ca^{2+} BAPTA-AM (40 μM) per 30 minuti e successivamente incubate in un tampone isotonic in cui il Ca^{2+} era stato sostituito con Mg^{2+} .

***CBD agisce sulle cellule MDA-MB-231
inducendo anche la produzione di ROS***

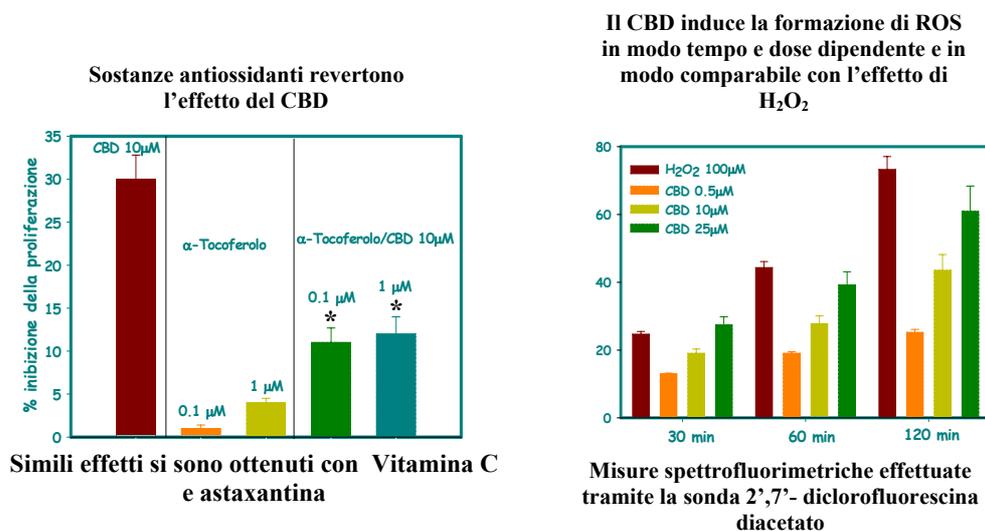


Fig 12 A sinistra effetto dell' α tocoferolo sull'attività antiproliferativa del CBD sulle cellule MDA-MB-231; a destra sulle stesse cellule effetto del CBD sulla formazione dei ROS. * $P < 0.05$ ottenuto tramite ANOVA seguito dal test di Bonferroni

Effetti di attivatori della proteina chinasi A sull'attività agonistica su TRPM8 di icilina e mentolo

In cellule HEK-293 stabilmente trasfettate con TRPM8 è stata valutata la capacità di agonisti del recettore di determinare elevazioni dei livelli intracellulari di Ca^{2+} . L'icilina mostrava un valore di EC_{50} di $0.19 \pm 0.03 \mu M$ mentre per il mentolo si aveva un valore di EC_{50} di $40.9 \pm 15.1 \mu M$. Quando si faceva precedere l'aggiunta dell'agonista da una preincubazione (5 min) o con 8Br-cAMP (100 μM) o con forskolina (10 μM), due attivatori della proteina chinasi A, le curve dose-risposta degli agonisti venivano spostate verso destra (Fig 13). I nuovi valori di EC_{50} così ottenuti per l'icilina erano $0.50 \pm 0.04 \mu M$

e $0.56 \pm 0.03 \mu\text{M}$ rispettivamente in presenza di 8Br-cAMP e di forskolina mentre per il mentolo i valori ottenuti erano $64.7 \pm 5.4 \mu\text{M}$ e $294.5 \pm 16.2 \mu\text{M}$ rispettivamente in presenza di 8Br-cAMP e di forskolina. Per entrambi gli agonisti l'effetto inibitorio di 8Br-cAMP e di forskolina veniva attenuato dall'uso dell'inibitore selettivo della proteina chinasi A Rp-cAMP-S ($25 \mu\text{M}$).

Effetto della stimolazione del recettore CB₁ sull'attivazione del TRPM8 da parte dell'icilina

Per valutare l'effetto di una attivazione del CB₁ sul recettore TRPM8 è stata effettuata una trasfezione transiente delle cellule TRPM8-HEK-293 con il plasmide pcDNA3 codificante per il CB₁ umano ottenendo cellule CB₁-TRPM8-HEK-293 le quali, come verificato con RT-PCR, esprimevano alti livelli di trascritto CB₁ (Fig 14). L'attivazione del CB₁ nelle cellule co-trasfettate con il suo agonista specifico HU210 inibiva in modo dose dipendente l'effetto dell'icilina $1 \mu\text{M}$ sul TRPM8. L'effetto inibitorio dell'HU210 era assente nelle cellule trasfettate solo con TRPM8 o in queste stesse cellule trattate solo con Lipofectamina. L'effetto dell'HU210 sulle cellule co-trasfettate era attenuato dall'uso dell'antagonista del recettore CB₁ SR141716A ($0.1 \mu\text{M}$) (Fig 13).

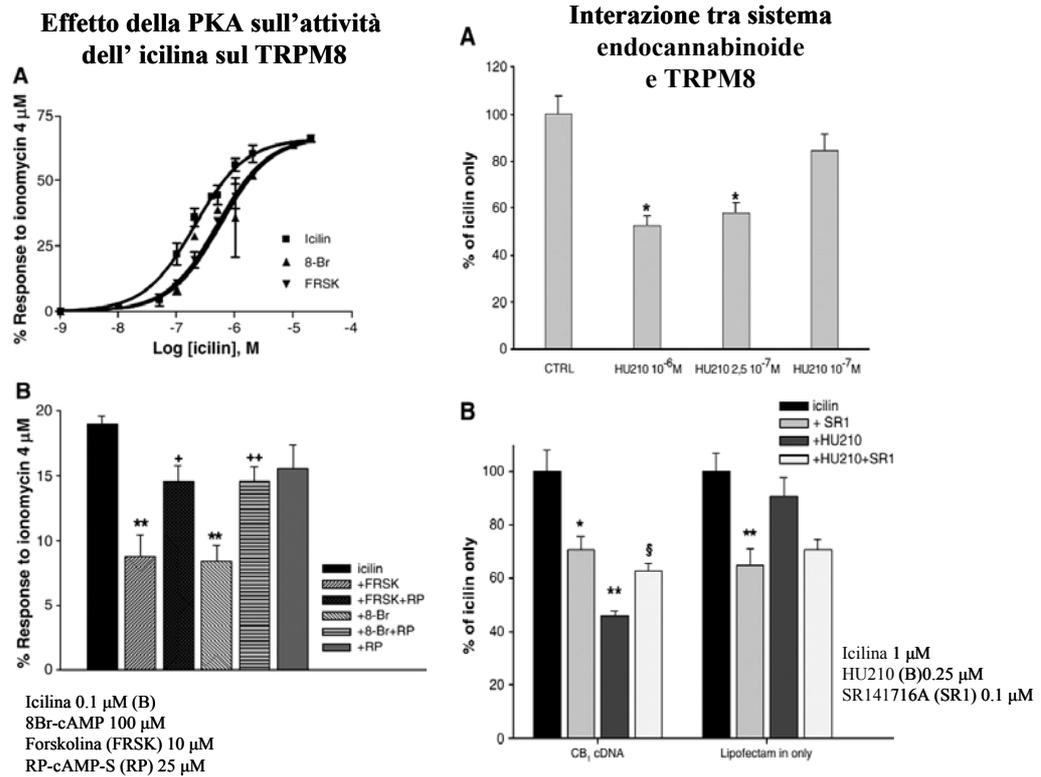


Fig 13 A sinistra modulazione della via di segnalazione della proteina chinasi A sull'attività dell'icilina sul TRPM8; ** = $P < 0.01$ verso icilina, + $P < 0.05$ verso icilina + forskolina (FRSK), ++ = $P < 0.01$ verso icilina + 8Br. A destra effetto dell'attivazione del CB₁ sull'attività dell'icilina sul TRPM8; * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ verso CTRL (A) o icilina (B), § = $P < 0.05$ verso icilina + HU210. P calcolato tramite ANOVA seguito dal test di Bonferroni

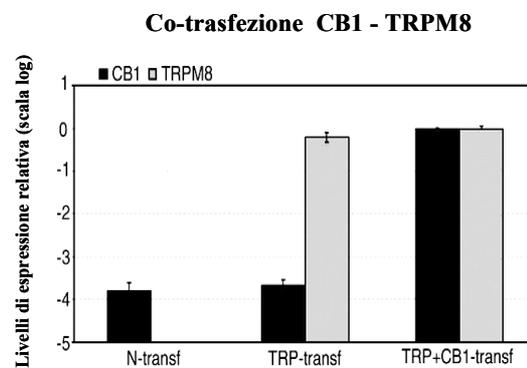


Fig. 14: Verifica tramite Real time PCR dell'avvenuta trasfezione delle cellule per CB₁ e TRPM8

Effetto di agonisti ed antagonisti TRPV1 sull'attività del TRPM8

Sono stati testati una serie di molecole che interagiscono con il TRPV1 (attivandolo o inibendolo) per valutare la loro capacità di influenzare l'attivazione del TRPM8. La capsazepina (antagonista TRPV1) ha mostrato un IC_{50} di $0.15 \pm 0.08 \mu\text{M}$ verso icilina $0.5 \mu\text{M}$ mentre l'IRTX l'antagonista più potente del TRPV1 finora identificato non influenzava il TRPM8 così come il 6-I olvanil e il 6-I-arvanil. Per quanto riguarda gli agonisti TRPV1 (Fig 15) capsaicina e RTX mostravano un buon effetto inibitorio verso icilina $0.5 \mu\text{M}$ avendo valori di IC_{50} di $1.10 \pm 0.32 \mu\text{M}$ e $0.15 \pm 0.03 \mu\text{M}$ rispettivamente per capsaicina e RTX, questi stessi composti erano decisamente meno efficaci nel contrastare l'effetto del mentolo sul TRPM8. I ligandi endogeni di TRPV1 e CB_1 , anandamide e NADA si sono dimostrati in grado di inibire gli effetti sia dell'icilina che del mentolo sul TRPM8.

Effetto inibitorio di agonisti del TRPV1 sull'influsso di Ca^{2+} indotto dall'azione di icilina e mentolo su TRPM8 in cellule TRPM8-HEK 293

	Icilina ($0.5\mu\text{M}$)	Mentolo ($100 \mu\text{M}$)
Capsaicina	$1.10 \pm 0.32 \mu\text{M}$	$>10 \mu\text{M}$
RTX	$0.15 \pm 0.03 \mu\text{M}$	$>2 \mu\text{M}$
Anandamide	$0.15 \pm 0.08 \mu\text{M}$	$3.09 \pm 0.61 \mu\text{M}$
NADA	$0.74 \pm 0.35 \mu\text{M}$	$1.98 \pm 0.38 \mu\text{M}$

Dati espressi come IC_{50}

Fig 15

Discussione

I risultati ottenuti dallo studio effettuato hanno permesso di individuare nuovi composti in grado di modulare i sistemi biologici analizzati e hanno fornito ulteriori delucidazioni sui meccanismi fisiologici che regolano questi sistemi. Interessanti si sono rivelati i risultati ottenuti nello studio della captazione cellulare dell'anandamide che ci hanno permesso di individuare nuovi inibitori di questo processo. La caratteristica selettività enantiomerica e l'andamento dose-risposta dell'inibizione causata dall'uso dei composti testati sono a favore dell'ipotesi che questi inibitori si leghino a qualche componente della membrana delle cellule. A conferma di ciò alcuni composti conservano la propria capacità inibitoria anche se vengono solo preincubati con le cellule e poi rimossi con opportuni lavaggi prima dell'aggiunta dell'anandamide, facendo ipotizzare la formazione di un legame stabile con una o più proteine di membrana. Inoltre le cellule utilizzate mostrano una capacità variabile di incorporare anandamide che è in relazione con il numero di passaggi che queste cellule hanno effettuato in coltura. Ciò fa ipotizzare che l'espressione delle proteine coinvolte nel processo vari nel tempo. Questi dati sono quindi a favore dell'esistenza di un trasportatore dell'anandamide e i nuovi composti analizzati, specialmente quelli fotoattivabili, potrebbero essere utilizzati per il suo isolamento e la sua caratterizzazione.

Lo studio sugli inibitori del TRPV1 ha permesso di individuare nuovi composti che sembrano poter avere interessanti potenzialità terapeutiche. In particolare l'AA-5-HT, già noto per la sua capacità di inibire l'enzima responsabile dell'inattivazione dell'anandamide, la FAAH (Bisogno 1998), ha mostrato di antagonizzare gli effetti mediati dal TRPV1 sia umano che di ratto e la sua potenza è paragonabile a quella della capsazepina (noto antagonista TRPV1). Un fattore limitante si è dimostrato il pH. Infatti a pH 6 (condizione che può verificarsi in caso di infiammazione cronica) l'AA-5-HT si è dimostrato meno efficace nell'antagonizzare l'effetto della capsaicina sul TRPV1. La doppia attività su FAAH e TRPV1 è in grado sia di aumentare i livelli di anandamide che di avere un effetto proalgescico dovuto al blocco della risposta mediata dal recettore dei vanilloidi. Infatti, in studi in vivo l'AA-5-HT si è dimostrato capace di esercitare una forte attività analgesica in due modelli di dolore in ratti, cioè il trattamento con formalina e la costrizione cronica del nervo sciatico (Maione 2007).

Per quanto riguarda il 6-I arvanil e il 6-I olvanil il nostro studio ha permesso, come nel caso precedente, di individuare validi antagonisti del TRPV1 e di confermare inoltre una osservazione fatta in precedenza con altri potenti antagonisti, cioè l'importanza della iodurazione delle molecole. Infatti, la iodurazione sia dell'RTX (Wahl 2001) che della capsaicina sintetica (Appendino 2003) aveva portato in passato alla sintesi di potenti antagonisti TRPV1. In maniera interessante i due nuovi inibitori hanno mostrato in studi in vitro di avere un effetto immunosoppressivo, effetto che ha mostrato anche l'arvanil (Marquez 2006). Questa osservazione va a favore di un possibile uso terapeutico sia di agonisti che di antagonisti del recettore dei vanilloidi. Il

lavoro sul TRPM8 ci ha permesso di caratterizzare meglio la regolazione di questo recettore che sta emergendo come potenziale nuovo target terapeutico del carcinoma prostatico. Partendo dal fatto che TRPM8 e TRPV1 sono attivati da stimoli termici opposti (rispettivamente $< 25^{\circ} \text{C}$ e $> 42^{\circ} \text{C}$) abbiamo voluto valutare che relazioni ci fossero tra la modulazione di questi due recettori. Abbiamo osservato che i due recettori sono regolati in maniera opposta, infatti TRPM8 è desensibilizzato dalla PKA che al contrario modula in maniera positiva il recettore dei vanilloidi (De Petrocellis 2001) mentre in maniera opposta si comporta il PIP_2 (Chuang 2001). Una ulteriore conferma di questo andamento la si è avuta valutando il ruolo del recettore CB_1 , la stimolazione di questo recettore in cellule in cui è coespresso con il TRPM8 riduce la risposta di quest'ultimo recettore indotta dai suoi agonisti; in precedenza era invece stato riportato un effetto stimolatorio del CB_1 sulla risposta mediata da TRPV1 (Hermann 2003). Infine agonisti del TRPV1 si sono comportati come antagonisti del TRPM8. Di particolare importanza è il fatto che anche molecole endogene come anandamide e NADA esibiscono questa caratteristica, suggerendo un ruolo fisiologico di questi composti nella modulazione del TRPM8. Da questi risultati si evidenzia che TRPV1 e TRPM8 sono la controparte funzionale l'uno dell'altro mediando stimoli opposti essendo modulati dagli stessi stimoli ma in maniera opposta.

Il lavoro sui fitocannabinoidi ci ha permesso di valutare l'effetto di una serie di molecole contenute nella *Cannabis* sulla crescita di cellule tumorali. In letteratura sono noti gli effetti antitumorali del THC (Guzman 2003), l'uso di questo composto però è limitato dai suoi effetti psicotropi per questo era interessante indagare sulle proprietà di altri cannabinoidi naturali privi di effetti

sul sistema nervoso centrale. Sorprendentemente il composto più attivo è risultato il cannabidiolo e anche il cannabigerolo e il cannabichromene sono risultati più potenti del THC. L'efficacia del cannabidiolo e dell'estratto ricco in cannabidiolo è stata confermata in vivo in due modelli di tumori xerografici ottenuti dall'inoculazione in topi atimici o di cellule KiMol (cellule della tiroide di ratto trasformate con l'oncogene *v-K-ras*) o di cellule di tumore della mammella umane MDA-MB-231 (Ligresti 2006). Inoltre il cannabidiolo ha mostrato di inibire anche la formazione di metastasi al polmone che si sviluppano in seguito all'inoculazione di cellule MDA-MB-231. Dato che si è osservato che il cannabidiolo, il cannabigerolo e il cannabichromene sono in grado di attivare il TRPV1 e/o di inibire l'inattivazione dell'anandamide, si è voluto verificare se i recettori dei cannabinoidi e dei vanilloidi fossero in qualche modo coinvolti nell'effetto di questi fitocannabinoidi. Tuttavia nonostante le linee cellulari utilizzate esprimano i recettori dei cannabinoidi e dei vanilloidi questi sembrano non avere un coinvolgimento nell'effetto antiproliferativo; solo nelle cellule MDA-MB-231 si ha una parziale, ma significativa, reversione dell'effetto del cannabidiolo ad opera di antagonisti del CB₂ e del TRPV1. Sempre nelle cellule MDA-MB-231 è stato valutato se l'effetto del cannabidiolo fosse collegato allo stato di stress ossidativo delle cellule. E' stato così osservato che l'uso di antiossidanti reverte l'effetto del cannabidiolo e che quest'ultimo è in grado di stimolare la produzione di ROS in modo dipendente dai livelli di Ca²⁺. Infine è interessante notare che a basse concentrazioni il cannabidiolo è in grado di inibire la produzione di ROS indotta da H₂O₂, ma a basse concentrazioni in alcuni tipi di cellule questo composto ha mostrato effetti pro proliferativi.

Bibliografia

Ahluwalia J, Urban L, Capogna M, Bevan S, Nagy I. Cannabinoid 1 receptors are expressed in nociceptive primary sensory neurons. *Neuroscience* 2000; **100**: 685-8.

Appendino G, Harrison S, De Petrocellis L, Daddario N, Bianchi F, Schiano Moriello A, Trevisani M, Benvenuti F, Geppetti P, Di Marzo V. Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 2003; **139**: 1417-1424.

Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang SW, Patapoutian A. High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* 2006; **9**: 493-500.

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**: 1606-1608.

Bisogno T, Melck D, De Petrocellis L, Bobrov MYu, Gretskaya NM, Bezuglov VV, Sitachitta N, Gerwick WH, Di Marzo V. Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **248**: 515-522.

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**, 463-468.

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**: 816-824.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; **288**: 306-313.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 2001; **41**: 957-962.

Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003; **426**: 517-524.

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**: 83-87.

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**: 52-56.

De Petrocellis L, Harrison S, Bisogno T, Tognetto M, Brandi I, Smith GD, Creminon C, Davis JB, Geppetti P, Di Marzo V. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 2001; **77**: 1660-1663.

De Petrocellis L, Chu CJ, Schiano Moriello A, Kellner JC, Walker JM, Di Marzo V. Actions of two naturally occurring saturated N-acyldopamines on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels. *Br J Pharmacol* 2004; **143**: 251-256.

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**: 1946-1949.

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**: 686-691.

Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járαι Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; **410**: 822-825.

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; **3**: 771-784.

Di Marzo V, De Petrocellis L. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 2006; **57**: 553-574.

Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Planells-Cases R. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 2004; **271**: 1820-1826.

Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003; **83**: 1017-1066.

Grotenhermen F. Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; **4**: 507-530.

Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzman M. Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr Pharm Des* 2006; **12**: 2319-2325.

Guzman M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 745–755.

Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano Moriello A, Lutz B, Di Marzo V. Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**: 607-616.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; **54**: 161-202.

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**: 8400-8405.

Kelly S, Chapman V. Selective cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. *J Neurophysiol* 2001; **86**: 3061-3064.

Kreitzer AC, Regehr WG. Retrograde signaling by endocannabinoids. *Curr Opin Neurobiol* 2002; **12**: 324-330.

Lastres-Becker I, Fezza F, Cebeira M, Bisogno T, Ramos JA, Milone A, Fernandez-Ruiz J, Di Marzo V. Changes in endocannabinoid transmission in

the basal ganglia in a rat model of Huntington's disease. *Neuroreport* 2001; **12**: 2125-2129.

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**: 253-262.

Ligresti A, Schiano Moriello A, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; **318**: 1375-1387.

Maione S, De Petrocellis L, de Novellis V, Schiano Moriello A, Petrosino S, Palazzo E, Rossi F, Woodward DF, Di Marzo V. Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2007; **150**: 766-781.

Marquez N, De Petrocellis L, Caballero FJ, Macho A, Schiano Moriello A, Minassi A, Appendino G, Muñoz E, Di Marzo V. Iodinated N-Acylvanillamines: potential "multiple target" anti-inflammatory agents acting via the inhibition of T-cell activation and antagonism at vanilloid TRPV1 channels. *Mol Pharmacol* 2006; **69**: 1373-1382.

Matias I, Chen J, De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Fezza F, Krauss AH, Shi L, Protzman CE, Li C, Liang Y, Nieves AL, Kedzie KM, Burk RM, Di Marzo V, Woodward DF. Prostaglandin ethanolamides (prostamides): in vitro pharmacology and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; **309**: 745-757.

Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 2006; **8**: E298-306.

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D.: Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002; **416**: 52-58.

McKemy DD.: How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Molecular Pain*; 2005 **1**: 16

Mechoulam R. In Cannabis as Therapeutic Agent (ed. Mechoulam, R.). 1986; 1-19 (CRC Press Boca Raton).

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* 1999; **262**: 275-284.

Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N. Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem* 2004; **279**: 5298-5305.

Pertwee RG Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997; **74**: 129-180.

Pertwee RG Cannabinoid pharmacology: the first 66 years *Br J Pharmacol* 2006; **174**: S163-S171.

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**: 227-230.

- Szabo T, Biro T, Gonzalez AF, Palkovits M, Blumberg PM. Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **98**: 51-57.
- Szallasi A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease. *Am J Clin Pathol* 2002; **118**: 110-121.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **215**: 89-97.
- van der Stelt M, Di Marzo V. Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem* 2004; **271**: 1827-1834.
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 2001; **59**: 9-15.
- Walker JM, Hohmann AG. Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol* 2005;(168): 509-554.
- Wang H, Matsumoto H, Guo Y, Paria BC, Roberts RL, Dey SK. Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 14914-14919.