

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO  
EMILIA**

---

**Dipartimento di Scienze della Vita**

Corso di Laurea specialistica a ciclo unico in FARMACIA

**I Cannabinoidi nell'attività antineoplastica**

**TESI DI LAUREA di:**

**Jacopo Francesco Foroni**

**RELATRICE:**

**Prof.ssa Renata Battini**

---

**ANNO ACCADEMICO 2012/2013**

*A voi che mi avete sostenuto, protetto e plasmato.*

*A te che sei riuscita a dare un senso alla vita con quei secondi di  
nirvana dove ci guardiamo l'anima.*

# Indice

	Pagina
Capitolo 1 - Gli utilizzi terapeutici della Cannabis	5
1.1.Cenni storici	5
1.2.Utilizzi terapeutici e aspetti farmacologici della cannabis	9
Capitolo 2 - I tumori	12
2.1. Patogenesi	13
2.2. Ciclo cellulare	14
2.3. Classi terapeutiche dei farmaci antitumorali	15
2.4. Apoptosi	17
2.5. Autofagia	23
Capitolo 3 - Cannabis, fitocannabinoidi ed endocannabinoidi	26
3.1. Morfologia e Tassonomia della Cannabis	26
3.2. Costituenti chimici	28
3.3. Farmacocinetica e metabolismo	47
3.4. Tossicologia	53
3.5. Recettori dei Cannabinoidi	54
3.5.1. Agonisti e antagonisti sui recettori cannabinoidi	57
3.6. Sistema endocannabinoide	59
3.6.1. Biosintesi Endocannabinoidi	62
3.6.2. Rilascio e meccanismo d'azione degli endocannabinoidi	64

3.6.3. Degradazione degli endocannabinoidi	65
3.6.4. Effetti degli endocannabinoidi sull'organismo	67
<b>Capitolo 4 - I cannabinoidi nell'attività antineoplastica</b>	<b>70</b>
4.1. Cannabinoidi e induzione di percorsi apoptotici e autofagici	72
4.1.1. Cannabinoidi e induzione di percorsi apoptotici	72
4.1.2. Cannabinoidi e induzione di percorsi autofagici	76
4.1.3. Cannabinoidi e induzione di percorsi apoptotici e autofagici	79
4.2. Effetti sinergici dei cannabinoidi in combinazione con altri farmaci	84
<b>Conclusioni</b>	<b>87</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>89</b>

# Capitolo 1

## Gli utilizzi terapeutici della Cannabis

### 1.1. Cenni storici

Le prime testimonianze di coltivazione della cannabis sativa per utilizzo tessile risalgono al 6000 a.C; il primo riscontro per uso terapeutico è invece riportato all'interno di un erbario cinese, il Pen Ts'ao redatto dall'imperatore Shen Nung, del 2737 a.C, dove è documentato l'utilizzo di preparati di cannabis per alleviare diverse malattie come la gotta, i reumatismi, la malaria, la stipsi e la debolezza mentale. In India la cannabis venne utilizzata a partire dal 1000 a.C sia come droga ricreativa sia come droga con finalità terapeutiche (analgesico, anticonvulsivante, ipnotico, tranquillante, anestetico, antinfiammatorio, antibiotico, antiparassitario, antispasmodico, digestivo, stimolante dell'appetito, diuretico, afrodisiaco, anti-tossivo ed espettorante) spesso associato all'ambito religioso. I metodi di somministrazione, gli aspetti terapeutici e le implicazioni in ambito religioso sono riportati nell'Atharva Veda una collezione di testi sacri di autori sconosciuti, dove la cannabis viene menzionata come una delle cinque piante sacre. Dall'Asia, continente d'origine di questa droga, si diffuse in Mesopotamia, nella penisola arabica, in Europa e successivamente in Africa e nelle Americhe. Molte scoperte testimoniano come anche gli Assiri fossero a conoscenza degli effetti psicoattivi della cannabis fin dal IX secolo a.C. Essi la utilizzavano sia per via topica nel ridurre i gonfiori e i lividi, sia per via sistemica nel caso di depressione, impotenza e artrite. Un largo utilizzo si ebbe anche presso la cultura araba: i testi ritrovati descrivono le proprietà diuretiche, digestive, antidolorifiche e antiepilettiche di questa pianta, come riportato in uno scritto datato 1464 a cura di Ibn al-Badri, dove veniva illustrata la profilassi della patologia epilettica di cui soffriva il figlio del sultano, trattata con estratti di cannabis. Alcuni autori ellenici e romani riportarono nei loro scritti l'utilizzo voluttuario della pianta e della resina da essa prodotta. Tra questi si ricordano lo scrittore Erodoto che nel 450 a.C descrisse una cerimonia funebre sciita durante la quale venivano inalati i vapori ottenuti dalla combustione dei semi della cannabis (descrizione poi confermata dai ritrovamenti da parte di archeologi di semi carbonizzati all'interno di tombe sciite); lo scrittore romano Plinio ne "Le notti arabe", lo scrittore Dioscoride che nell'opera "Materia medica" risalente al I secolo d.C. la

riteneva utile per mal d'orecchi, edemi, itterizia e altri disturbi ed infine il medico greco Galeno che la raccomandava contro le flatulenze, il mal d'orecchi e il dolore in genere<sup>1</sup>. La diffusione di questa pianta in Africa avvenne ad opera degli arabi nel XV secolo e i suoi preparati venivano utilizzati per curare i morsi di serpente, per facilitare le nascite, per la malaria, per la febbre, per la dissenteria e l'asma. Dall'Africa questa pianta si diffuse in Sud America nel XVI secolo tramite le navi che trasportavano gli schiavi africani, infatti molti termini e molti impieghi terapeutici della pianta adottati in Brasile sono originari dell'Angola. Fu Napoleone<sup>2</sup> a diffondere l' utilizzo di questa pianta in Europa; successivamente tra il 1838 e il 1840 entrerà a far parte della medicina occidentale. L'effettiva introduzione della cannabis nella medicina occidentale si deve al lavoro di Willian B. O'Shaughnessy, un medico irlandese, e di Jacques-Joseph Moreau, uno psichiatra francese<sup>3</sup>. O'Shaughnessy lavorò in India per molti anni e qui ebbe il suo primo contatto con la cannabis. Egli studiò la letteratura locale sulla pianta, descrisse molte preparazioni popolari, valutò la tossicità in animali, testò questi effetti su pazienti con differenti patologie e nel 1839 pubblicò l'opera 'On the preparations of the Indian hemp, or gunjah'. L'assistente medico Moreau invece lavorava presso il manicomio Charenton, vicino a Parigi, dove era pratica comune del tempo accompagnare i pazienti psichiatrici in lunghi viaggi esotici in paesi distanti. Durante uno di questi viaggi egli osservò che l'uso dell'hashish era molto diffuso presso le comunità arabe e rimase impressionato dagli effetti della sostanza. Nel 1840, ritornato a Parigi, decise di sperimentare sistematicamente diverse preparazioni di cannabis prima su se stesso e successivamente sui suoi studenti. Nel 1845 pubblicò 'Du Hachisch et de l'Alienation Mentale: Etudes Psychologiques', uno dei più completi documenti sugli effetti acuti della cannabis. I trattati di Moreau e di O' Shaughnessy ebbero un importante impatto sulla medicina occidentale, specialmente a causa della scarsità di scelte terapeutiche per le infezioni da rabbia, colera e tetano. In Italia, nel XIX secolo, uno dei pionieri della ricerca sull'utilizzo terapeutico della cannabis fu il farmacista Carlo Erba, che cercò di isolare i vari principi attivi contenuti nella pianta e avviò la vendita nel 1849 di preparazioni galeniche a base di cannabis all'interno della sua farmacia<sup>4</sup>. Nel 1860 l'associazione medica dell'Ohio nominò un "Comitato sulla

---

<sup>1</sup> Osbaldeston, Dioscoride. *Materia medica*. Cinque libri in un unico, 2000.

<sup>2</sup> Capasso, *Farmacognosia*, 2011.

<sup>3</sup> Zuardi, *History of cannabis as a medicine: a review*, 2005.

<sup>4</sup> Samorini, *L'erba di Carlo Erba. Per una storia della canapa indiana in Italia 1845-1948*, 1997.

cannabis indica”che stilò un elenco delle patologie, comprendenti tetano, nevralgie, emorragie post-partum, dolore del parto, dismenorrea, convulsioni, dolori reumatici, asma, psicosi post-partum, tosse cronica, gonorrea, bronchite cronica, dolori gastrici, insonnia, per cui si poteva ricorrere alla somministrazione di preparati a base di cannabis. Nella seconda parte dell’Ottocento furono pubblicati più di 100 articoli scientifici in Europa e negli Stati Uniti riguardo l’uso terapeutico della cannabis. Nel 1886 H. C. J. Wood sostenne ne 'Treatise on Therapeutics' che la cannabis poteva essere usata per calmare stati di irrequietezza e malessere generale, per alleviare le sofferenze in malattie incurabili, come la tisi all’ultimo stadio, e infine come blando sonnifero. Nel 1887 H. A. Hare ne 'Therapeutic Gazette' riportò che la cannabis poteva essere usata nelle nevralgie, nella tosse irritativa, nonché come tranquillante-analgescico nei malati di tisi e infine anche come un efficace anestetico locale, particolarmente in odontoiatria. Nel 1890 J.R. Reynolds ne 'The Lancet' riassunse 30 anni di esperienza con la cannabis, e la ritenne “incomparabile” per efficacia nell’insonnia senile, utile come analgesico nelle nevralgie, inclusa quella del trigemino (*tic douloureux*), nella tabe, nell’emicrania e nella dismenorrea (ma non nella sciatica, nella lombaggine e in genere nell’artrite, né nella gotta e nei “dolori isterici”), molto efficace negli spasmi muscolari di natura sia epilettoidale che coreica (non nella vera epilessia) ed invece di incerto valore nell’asma, nella depressione e nel delirio alcolico. In questi anni molti laboratori furono in grado di elaborare estratti o tinture di cannabis come il Merck in Germania, il Burroughs-Wellcome in Inghilterra, il Bristol-Meyers Squibb, il Parke-Davis e l’Eli Lilly negli Stati Uniti. In Italia a partire dal Novecento vennero riportati nella farmacopea ufficiale (F.U.) sia l’estratto che la tintura di cannabis indica.

Nel 1924 le indicazioni terapeutiche della cannabis vennero riassunte in tre attività principali ne “*Sajous's Analytic Cyclopedia of Practical Medicine*” :

1. sedativa o ipnotica: nei casi di insonnia, delirium tremens, tetano, rabbia, bronchiti, tubercolosi polmonare, gonorrea, spasmi della vescica;
2. analgesica: nei casi di menopausa, tumore del cervello, neuralgia, ulcera gastrica, dolore non dovuto a lesione, disturbi uterini, neuriti multiple, eczema, reumatismi acuti, dismenorrea, infiammazione cronica, menorrea, emorragie postparto, dolore dentale;
3. altri: stimolante l’appetito, dispepsia, diarrea, dissenteria, colera, nefrite, ematuria, diabete melito, palpitazioni cardiache, impotenza negli uomini.

A partire dai primi anni del XX secolo si ebbe un'inversione di marcia da parte dell'opinione pubblica e dei governi e la pianta venne messa al bando negli Stati Uniti con l'emanazione del Marijuana Tax Act del 1936. Questa legge non ne vietava la vendita, il consumo o la coltivazione ma tramite una tassazione molto elevata e pene severe per chi trasgrediva ne impediva di fatto l'utilizzo sia per scopo ricreativo che terapeutico. Uno dei maggiori promotori di questa legge fu l'ispettore del Federal Bureau of Narcotics (FBN) Harry Anslinger, che a partire dal 1931 si era prodigato in campagne promozionali contro la cannabis, accusata di essere colpevole di danni gravi al cervello e dei più efferati omicidi commessi nel paese e definita dagli organi di stampa "assassina della gioventù", o "erba del diavolo". Bisogna però contestualizzare questa legge all'interno di un determinato periodo storico dove la criminalità, l'abuso di sostanze stupefacenti e di alcol erano piaghe sociali di enorme rilevanza, quindi anche se non supportata da evidenze scientifiche questa legge ha avuto l'importanza e la forza di porre un freno all'illegalità dilagante. In Italia si cercò di arginare l'abuso di questa sostanza tramite due interventi legislativi (legge n.396/1923 e legge n.1145/1934) impedendone di fatto però l'utilizzo anche in ambito terapeutico come dimostrato dall'eliminazione dalla farmacopea italiana nel 1942. Dalla seconda metà del XX secolo vi fu un aumento esponenziale dell'interesse da parte della comunità scientifica per i costituenti chimici della cannabis e per il loro ruolo all'interno dell'organismo umano e di conseguenza un *boom* di scoperte, sintesi *ex novo* e pubblicazioni scientifiche. Nel 1964 Gaoni e Mechoulam isolarono prima il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), il più importante principio attivo della cannabis, e negli anni seguenti la maggior parte dei cannabinoidi. Nel 1971 fu pubblicato il libro 'Marijuana reconsidered' ad opera di Lester Grinspoon, attualmente professore associato emerito di psichiatria presso l'Università di Harvard, nel quale fu presentata, sulla base dell'analisi della letteratura scientifica allora presente, una visione alternativa sull'utilizzo voluttuario e terapeutico della cannabis in aperto contrasto con la politica proibizionistica vigente. Nel 1986 Howlett pubblicò uno studio sul meccanismo d'azione del THC che doveva agire tramite un recettore di membrana associato alla proteina G, meccanismo simile a quello degli oppioidi. Nel 1990 Matsuda isolò e clonò il recettore (accoppiato a proteina G come previsto) dalla corteccia cerebrale di ratto. Scoprì poi che il legame con THC attivava la adenilciclasi, inibiva i canali del calcio e facilitava quelli del potassio. Successivamente verranno riconosciuti due sottogruppi di recettori, CB1 (Tom Bonner,1990) e CB2 (Sean Munro,1993). Nel 1992 Devane isolò dal cervello del

maiale il primo endocannabinoide e lo chiamò anandamide (= beatitudine)<sup>5</sup>. Ad oggi il potenziale terapeutico della cannabis è molto vasto e in continuo sviluppo, infatti grazie a una ricerca sempre più completa si stanno ottenendo importanti riscontri scientifici su possibili utilizzi in determinate patologie. Ciò è confermato anche in Italia dall'inserimento nella tabella II, sezione B, del decreto del Presidente della Repubblica 9 ottobre 1990, n. 309 di medicinali di origine vegetale a base di Cannabis (sostanze e preparazioni vegetali, inclusi estratti e tinture) come pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 33 dell'8-2-2013. Insieme alla ricerca sulle nuove frontiere terapeutiche della cannabis bisogna però concentrare gli sforzi sulla determinazione dei vari aspetti tossicologici che sono la causa della sua classificazione come stupefacente. Il consumo di cannabis a scopo ricreativo, soprattutto se in giovane età, quando i processi neuronali sono in costruzione, può portare a danni permanenti al cervello come verrà ampiamente discusso nei capitoli successivi.

## **1.2. Utilizzi terapeutici e aspetti farmacologici della cannabis**

Negli ultimi decenni si è accumulato un certo volume di ricerche sulle attività farmacologiche della cannabis e sulle sue possibili applicazioni in ambito terapeutico, di seguito descritte<sup>6</sup>.

*Nausea e vomito.* In seguito a uno studio randomizzato di controllo (RCT), dove veniva somministrato THC orale e placebo in 22 pazienti affetti da cancro, è stato dimostrato che il THC è statisticamente superiore al placebo. RCT successivi hanno confermato che il THC naturale e sintetico è invariabilmente superiore al placebo. Confronti con antiemetici disponibili negli anni 1970 e 1980 suggeriscono che il THC è o equivalente in efficacia o migliore.

*Sclerosi multipla e patologie neurologiche.* La terapia farmacologica della spasticità muscolare è in genere solo moderatamente efficace ed è limitata da effetti collaterali. La spasticità è un elemento centrale della sclerosi multipla (SM), con paralisi cerebrale e lesioni del midollo spinale. Tremore, atassia ed incontinenza contribuiscono alla alta incidenza di ansia e depressione in pazienti affetti da queste condizioni. La cannabis è

---

<sup>5</sup> Cappuccino, *Dolce Vita*, 12/2005.

<sup>6</sup> Robson, *Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids*, 2001

stata spesso usata per trattare il dolore, lo spasmo muscolare, i crampi e l'atassia fin dal XIX secolo, e molti malati moderni ne hanno riportato benefici.

*Perdita di appetito e peso in pazienti con tumori ed AIDS.* Molte persone affette da AIDS hanno affermato che fumare marijuana inibisce la nausea, migliora l'appetito, riduce l'ansia, allevia i dolori, migliora il sonno ed inibisce la candidosi orale. L'effetto stimolante dell'appetito della cannabis è stato confermato in volontari a digiuno e non a digiuno in un RCT di THC per via orale con l'alcol, anfetamine e placebo.

*Dolore.* I cannabinoidi sono analgesici efficaci in modelli animali con meccanismi non-oppiacei predominanti. Cinque piccoli studi randomizzati mostrano che il THC è significativamente superiore al placebo e produce una analgesia correlata alla dose con un picco di circa 5 ore, paragonabile per durata alla codeina.

*Riduzione della pressione intraoculare.* Sono stati presentati molti rapporti secondo i quali la marijuana può alleviare i sintomi del glaucoma. Uno studio pilota di marijuana fumata e THC orale (15 mg) in 11 pazienti affetti da glaucoma ha trovato una riduzione della pressione intraoculare media (IOP), del 30% in sette soggetti e nessuna risposta in quattro.

*Insonnia, ansia e depressione.* Il nabilone (1 mg tre volte al giorno) ha prodotto notevoli miglioramenti nella Scala di Ansietà di Hamilton in 20 pazienti ansiosi rispetto al placebo ( $p < 0.001$ ).

*Epilessia.* L'effetto dei cannabinoidi sull'attività convulsiva in animali da laboratorio è complicato. Il cannabidiolo è un potente anticonvulsivante, ma il suo profilo varia da specie a specie. THC può produrre convulsioni in grandi dosi ma si comporta da anticonvulsivante in alcuni modelli. Una mancanza di stereospecificità suggerisce che il meccanismo non può essere correlato ad un recettore singolo, ma che devono essere coinvolti sistemi della serotonina, dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico, dell'acetilcolina o delle prostaglandine.

*Asma.* Studi controllati in volontari con asma mostrano che il THC assunto per via orale e aerosol, ha attività broncodilatatoria paragonabile al salbutamolo, anche se l'insorgenza dell'attività è più rapida con quest'ultimo.



Figura 1

Basandosi sulla capacità della cannabis di danneggiare le cellule provocandone la morte si è ipotizzato che i cannabinoidi possano agire anche sulle cellule tumorali. Si sono quindi concentrate le ricerche sui percorsi cellulari attivati in seguito al legame dei cannabinoidi ai propri recettori sulla membrana cellulare.

## Capitolo 2

### I tumori

Il tumore viene definito come una massa anormale di tessuto che cresce in eccesso ed in modo scoordinato rispetto ai tessuti normali, e che persiste in questo stato dopo la cessazione degli stimoli che hanno indotto il processo<sup>7</sup>. All'interno di esso la divisione cellulare incontrollata è accompagnata dalla disattivazione dei processi di morte cellulare che portano ad una sorta di "immortalità" e all'instabilità genetica<sup>8</sup>. Il cancro è una delle maggiori cause di morte nelle nazioni sviluppate, in Italia la sopravvivenza dopo 5 anni dall'esordio della malattia oncologica è di circa il 40% ed è responsabile di circa il 30% dei decessi totali. A prima vista, i dati sull'incidenza dell'ultimo centinaio d'anni sembrano indicare una progressione della malattia nei paesi occidentali, ma in realtà il tumore è, per lo più, una patologia che si manifesta in età avanzata e, nell'ultimo secolo, sia il progresso della scienza medica, sia il miglioramento della qualità della sanità pubblica hanno portato a un deciso aumento della durata della vita; di conseguenza molte più persone raggiungono un'età in cui è probabile ammalarsi di cancro. Persone che esercitano determinate professioni sono maggiormente esposte a sostanze chimiche cancerogene. Esempi sono l'esposizione all'amianto, che è stato definitivamente collegato allo sviluppo del cancro al polmone, pleurico e peritoneale, al radon, alla fuliggine, al catrame, al cromo esavalente e ai composti contenuti nichel. Le amine aromatiche βnaftilammina e 4-aminobifenile sono note per indurre il cancro alla vescica, invece l'esposizione al benzene è stato collegato allo sviluppo di leucemia. I tumori possono essere di due tipi: benigni o maligni. Entrambi mostrano capacità proliferative incontrollate, ma quelli maligni si distinguono per la capacità di dedifferenziarsi, per l'invasività e per la capacità di metastatizzare. Per facilitare la comunicazione è stata decisa una classificazione della gravità dei vari stadi dei tumori TNM sulla base della dimensione della massa tumorale (T1- T4), del grado di coinvolgimento dei linfonodi (N1-N3), e della presenza o meno di metastasi distanti (M0-M1). La metastasi è un processo mediante il quale la cellula maligna lascia il sito originale per invadere nuovi tessuti tramite soprattutto la via sanguigna e linfatica.

---

<sup>7</sup> Kuma, Robbins Basic Pathology, 2007.

<sup>8</sup> Lembke, *Foye's principi di chimica farmaceutica*, 2010.

Poichè per creare tumori metastatici sono necessari molti stadi distinti ed indipendenti si parla di processo metastatico.

## 2.1. Patogenesi

Le caratteristiche che ci permettono di distinguere una cellula tumorale da una normale sono: proliferazione incontrollata, dedifferenziazione con perdita di funzione, invasività e metastasi. Una cellula normale diventa tumorale in seguito a una o più mutazioni del suo DNA che possono essere ereditate o acquisite, in più possono essere coinvolti dei fattori epigenetici che di per sé non sono in grado di generare una mutazione genetica, ma possono aumentarne la probabilità. Le due principali classi di geni coinvolti nell'alterazione cellulare sono:

- i proto-oncogeni, che sono normali, ubiquitari e coinvolti nella regolazione delle funzioni cellulari omeostatiche. Vengono modificati, tramite mutazioni puntiformi spontanee ereditate da mutazioni di linee germinali, riarrangiamenti cromosomici o attraverso aumento dell'espressione genica, formando dei geni oncogeni che possono sia sovraesprimere che sottoesprimere i regolatori biochimici provocando una crescita cellulare preferenziale e accelerata. A prescindere dal meccanismo mutazionale, quando gli oncogeni mutati sono stimolati dall'esposizione a cancerogeni chimici, ambientali o virali, producono proteine erroneamente espresse o espresse in tessuti inappropriati. Gli oncogeni fungono da regolatori della comunicazione cellulare con l'ambiente esterno;
- gli oncosoppressori, che sono in grado di sopprimere le mutazioni genetiche e fermare la crescita incontrollata. Essi, una volta inattivati, promuovono il cancro<sup>42</sup>. Due oncosoppressori ben conosciuti sono p53 e Rb (retinoblastoma). Quando uno dei due perde la sua funzione, il controllo sulla proliferazione viene alterato e le cellule acquistano immortalità.

Lo sviluppo del cancro avviene in 4 tappe:

- fase iniziale, nella quale l'esposizione all'agente cancerogeno provoca delle mutazioni irreversibili in un certo numero di geni;
- fase di avanzamento, dove le cellule mutate derivate da geni alterati crescono in modo preferenziale rispetto alle cellule normali. Essa può derivare

dall'esposizione all'agente per un lungo periodo o dallo stimolo da parte di acceleranti ambientali. Si tratta di una fase reversibile in cui il cancro può essere evitato tramite cambiamenti nella dieta o nello stile di vita;

- fase di trasformazione, che può durare dai 5 ai 20 anni dove si ha la trasformazione delle cellule mutate in cellule cancerose;
- fase di progressione finale dello sviluppo del cancro, che si basa sulla proliferazione cellulare, sullo sviluppo di colonie clonali, sull'invasione e distruzione del tessuto e sulla metastasi.

In queste ultime due fasi l'interazione della cellula normale con i proto-oncogeni e con gli oncosoppressori porta alla formazione di una cellula tumorale che avrà come caratteristiche principali:

- una proliferazione incontrollata. Essa avviene mediante la modificazione nei sistemi cellulari di trasduttori del ciclo cellulare, dell'espressione della telomerasi e di fattori di crescita con un aumento dei vasi sanguigni locali come risultato dell'angiogenesi tumore-dipendente. Si manifestano poi mutazioni a carico dei geni che codificano per i prodotti coinvolti nell'apoptosi, che stimolano processi di morte cellulare programmata. Essi sono un prerequisito per lo sviluppo del cancro, che subentra quindi in seguito all'inattivazione di fattori proapoptotici o all'attivazione di fattori antiapoptotici;
- Dedifferenziazione e perdita di funzione;
- Invasività. Le cellule tumorali non solo hanno perso le restrizioni che hanno le cellule normali, ma, in più, secernono enzimi che degradano la matrice extracellulare, permettendo loro di spostarsi;
- Metastasi.

## **2.2. Ciclo cellulare**

Il ciclo cellulare di una cellula è un punto fondamentale di controllo e sviluppo per la formazione di una cellula tumorale. Esso è composto da cinque fasi: fase G1, fase S, fase G0, fase M e citocinesi. L'evoluzione attraverso le varie fasi del ciclo cellulare risulta essere regolata dalle chinasi ciclina-dipendenti o CDK (Cyclin-dependent Kinases), una famiglia di proteina chinasi che sono attive se associate alle subunità

proteiche cicline; queste ultime sono proteine che si accumulano in fasi del ciclo specifiche e che non solo attivano le CDK, ma ne determinano anche la specificità di substrato. Esempi di cicline sono per esempio la ciclina D1 e la ciclina E, la prima si lega con la CDK2, la seconda con la CDK4 e CDK6. Entrambe le cicline, in seguito a mutazioni, si possono trovare sovraesprese in cellule tumorali stimolando la progressione del ciclo cellulare. Il complesso CDK-cicline può essere inibito o tramite la proteina chinasi Wee1 con l'ausilio della fosfatasi Cdc25, o da una classe di otto proteine note come CKI (Cdk-dependent kinase inhibitor proteins). Quest'ultime in caso di sviluppo di mutazioni diventano fattori di rischio importanti per alcuni tumori, come nel caso di mutazioni del gene CDKN1A (p21) e CDKN1B (p27). Sono presenti anche altre proteine che fungono da controllori, e nel caso di mutazioni bloccano il ciclo cellulare. Esempi sono:

- *proteina retinoblastoma* (Rb), che è un regolatore chiave nella transizione dalla fase G1 a fase S associato alle Cdk 2, Cdk 4 e Cdk 6. Rb è una proteina che agisce come soppressore tumorale bloccando la cellula in uno stadio del ciclo cellulare quando è defosforilata, oppure stimolando la proliferazione e il ciclo cellulare nel caso in cui sia fosforilata. Nel primo caso lega e inibisce il fattore di trascrizione E2F, costituito da una proteina E2F che interagisce con una famiglia di polipeptidi DP, in maniera tale da bloccare la cellula in fase G1.
- *Proteina p53*, regolatore del ciclo cellulare e soppressore tumorale. E' costituita da 393 aa con la possibilità di distinguere tre domini: N-terminale, centrale e C-terminale. Esso si attiva in seguito ad un danno al DNA, grazie alla fosforilazione da parte di ATM, migra nel nucleo e si lega a p21 attivandola e di conseguenza inibisce il complesso cdk4-cdk6/ciclina D bloccando così il ciclo cellulare.

### **2.3. Classi terapeutiche dei farmaci antitumorali**

La parola antineoplastico significa "contro la nuova crescita". In generale il meccanismo d'azione citotossica per tutti gli agenti antineoplastici è l'interferenza con la sintesi cellulare o la funzione del RNA, del DNA e delle proteine essenziali per la

vita della cellula. Tutti gli agenti antineoplastici sono tossici, in quanto progettati per uccidere le cellule ed è per questo che un possibile utilizzo dei cannabinoidi potrebbe rappresentare una svolta fondamentale nella terapia oncologica. Le classi più importanti sono:

- agenti che formano legami crociati con il DNA. Questi farmaci sono costituiti da strutture elettrofile estremamente reattive. I gruppi neutrofili di varie basi del DNA attaccano facilmente il farmaco elettrofilo, con conseguente irreversibile alchilazione o complessazione della base del DNA. Tra questi farmaci i più utilizzati sono le mostarde azotate (mecloretamina, melfelan, clorambucile) e le nitrosouree (carmustina, streptozocina, procarbazine e temozolomide), gli agenti alchilanti vari (busulfano, cisplatino);
- antibiotici. Gli antibiotici antineoplastici sono una vasta categoria di composti naturali o semisintetici che bloccano la trascrizione del DNA, tagliando e/o inducendo punti di mutazione nel filamento del DNA e/o inibendo enzimi critici per il processo di replicazione. Tra questi farmaci i più utilizzati sono le antracicline (doxorubicina, epirubicina e valrubicina) e gli anticorpi vari (mitomicina e dactinomicina);
- antimetaboliti. Gli antimetaboliti interrompono la sintesi de novo del DNA inibendo la formazione dei nucleotidi che compongono questi polimeri essenziali per la vita. L'obiettivo primario di questa classe di farmaci sono di solito gli enzimi, che limitano la velocità di biosintesi dei nucleotidi. Tra questi farmaci i più utilizzati sono gli antagonisti pirimidinici, che inibiscono la sintesi di dTMP e si dividono in inibitori diretti della timidilato sintetasi (5-fluorouracile, floxuridina) e inibitori indiretti della timidilato sintetasi (metotressato e pemetrexed). Poi vi sono gli antagonisti purinici che inibiscono l'amidofosforibosil transferasi (mercaptopurina e tioguanina) e gli inibitori della DNA polimerasi dell'elongazione del filamento di DNA (gembitabina, clofarabina e citarabina);
- antimitotici. Gli antimitotici vanno ad agire sui microtuboli. I farmaci principali appartengono alla famiglia dei taxani e agli alcaloidi della vinca;

- inibitori della topoisomerasi. I farmaci principali sono camptotecine (irinotecan cloridrato, topotecan cloridrato), epidodofillotossine (etoposide e teniposide);
- agenti antitumorali de metilanti il DNA.

I meccanismi di difesa principali a cui ricorre la cellula in presenza di mutazioni geniche sono l'apoptosi e l'autofagia, ed è proprio su di essi che vanno ad agire i cannabinoidi come ipotizzato dalle ultime ricerche.

## 2.4. Apoptosi

L'**apoptosi**, è stata ampiamente studiata e il suo contributo nella patogenesi del cancro è ben documentato. E' definita come un processo di morte cellulare fisiologico geneticamente programmato, strettamente regolato e ATP-dipendente, che viene indotto da geni pro-apoptotici, come proteina p53, proteine della famiglia bcl-2(Bax,Bad e Bid) e Heat shock protein (Hsp10, Hsp60 e Hsp90) e inibito da geni anti-apoptotici, come proteine della famiglia bcl-2(Bcl-2 e bcl-XL), IAPs e Heat shock protein (Hsp27, Hsp72 e Hsp90). Un passo fondamentale nella morte cellulare per apoptosi è dovuta all'attivazione delle caspasi(vedi Figura2) appartenenti alla famiglia delle proteasi. Le **caspasi** (Cysteinil Aspartate-specific Proteases) sono proteine ricche di residui di cisteina che, una volta attivate, idrolizzano le proteine bersaglio a livello di residui dell'acido aspartico. Sono presenti nella cellula in uno stato inattivo, lo zimogeno o procaspasi, che si trasforma in una caspasi attiva dopo taglio proteolitico e in seguito ad attivazione tramite quattro possibili vie<sup>9</sup>:

- via dei recettori di superficie(estrinseca);
- via mitocondriale(intrinseca);
- Via del reticolo endoplasmatico (ER stress);
- Via della p53 (danni al DNA).

---

<sup>9</sup> Tarugi, *Patologia. Apoptosi*,2013.

Nell'uomo esistono 11 tipi di caspasi : 3 vengono dette iniziatrici, 5 vengono dette effettrici e 3 sono coinvolte nell'attivazione di citochine<sup>10</sup>. Le iniziatrici scindono in modo selettivo substrati proteici e pertanto rendono inattive molte proteine che sono indispensabili per la sopravvivenza della cellula. I loro bersagli possono essere le proteine di adesione presenti tra le cellule, le proteine del citoscheletro, PARP (poliADPribosil-polimerasi) che comporta l'inibizione della replicazione e della riparazione del DNA, la membrana nucleare, la membrana cellulare e il DNA. Nella *via intrinseca-mitochondriale* in seguito a stimolo apoptotico si ha la formazione di pori non selettivi con aumento della permeabilità mitocondriale che porta alla fuoriuscita di citocromo C e AIF(apoptosis inducing factor).

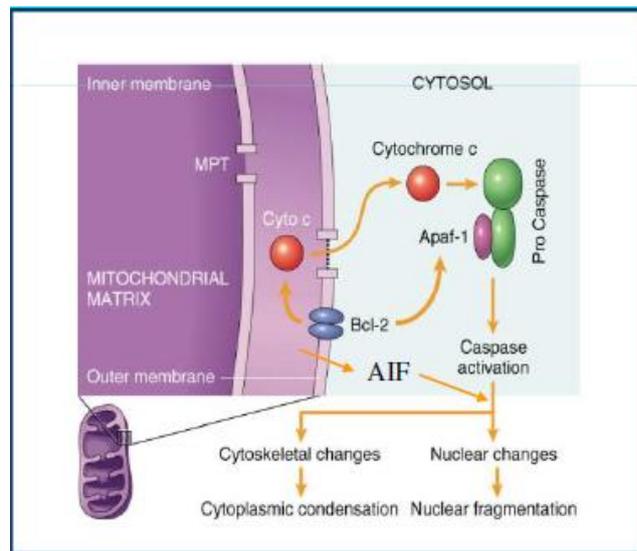


Figura 2

AIF viene trasportata successivamente nel nucleo e provoca un processo di apoptosi caspasi-indipendente. Il citocromo C, insieme al fattore APAF1, si legano alla procaspasi-9 formando un complesso detto apoptosoma che provoca l'attivazione della caspasi 3, iniziando la catena di eventi che poi porterà alla comparsa dei segni morfologici dell'apoptosi, quali il blebbing della membrana e la frammentazione del DNA. Quest'ultimo fenomeno è dovuto a un bersaglio proteico che normalmente si lega ad una endonucleasi del DNA, bloccandola e sequestrandola nel citoplasma. Quando la caspasi 3 è idrolizzata, l'endonucleasi entra nel nucleo e taglia il DNA. Questo spiegherebbe la tipica frammentazione del DNA osservata nelle cellule in apoptosi. La

<sup>10</sup> Artal-Sanz, *Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration*, 2005.

perdita della normale forma cellulare è invece determinata dall'attivazione da parte di una caspasi della proteina che idrolizza l'actina, componente fondamentale del citoscheletro. Nella *via estrinseca* invece l'apoptosi è attivata tramite il TNF e il ligando Fas. I TNF sono rilasciati dai macrofagi, dai linfociti T e B e dalle cellule natural killer, e si legano ai recettori TNF provocando una citotossicità non antigene-specifica con l'eliminazione delle cellule neoplastiche e infettate. I ligandi Fas, espressi dai linfociti T citotossici e dalle cellule soggette a turnover, si legano ai recettori Fas provocando una citotossicità antigene-specifica con eliminazione delle cellule infettive e delezione dei linfociti autoreattivi.

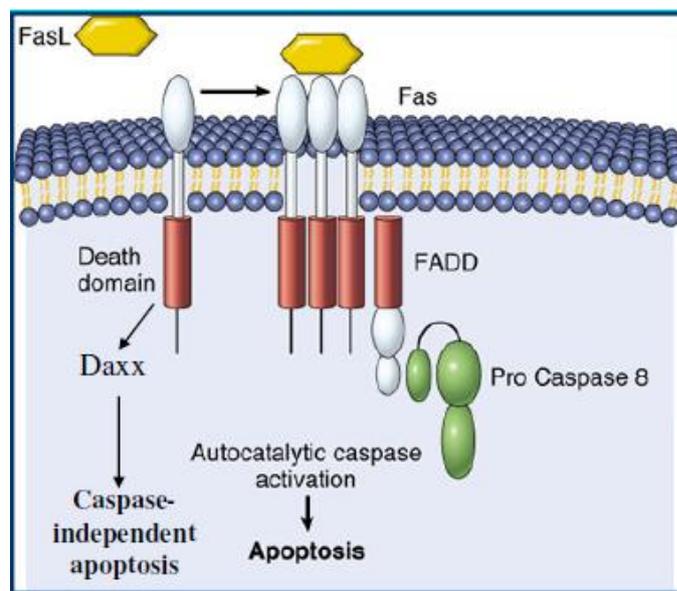


Figura 3

E' noto che le cellule tumorali mostrano un'attivazione costitutiva dei fattori di sopravvivenza che sostengono la proliferazione cellulare deregolata e contrastano gli stimoli di morte, quindi inibendoli si può stimolare l'apoptosi. I fattori di sopravvivenza che molto spesso sono correlati alla tumorigenicità sono la survivina, appartenente alla famiglia delle proteine inibenti l'apoptosi (IAP), e AKT. La survivina è una proteina dimerica con una struttura ad  $\alpha$  elica al COOH terminale la cui espressione è regolata dal ciclo cellulare. E' espressa ad elevati livelli durante lo sviluppo embrionale, ma il gene che la codifica rimane quiescente nella maggior parte dei tessuti differenziati e può essere presente in tre isoforme derivate da uno splicing alternativo: survivina full-length(142aa) e survivina-2B(165aa), localizzate nel citoplasma, e survivina- $\Delta$ Ex-3 (137aa) localizzata nel nucleo. La survivina agisce sostenendo la sopravvivenza delle cellule tramite inibizione diretta della caspasi-3, interazione con la caspasi-9 e

inibizione del complesso pro-apoptotico Smac/DIABLO<sup>11</sup>. La survivina è uno dei geni antiapoptotici trascrizionalmente repressi da p53 che è un fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare e svolge la funzione di oncosoppressore<sup>12</sup>. L'AKT è regolata dall'asse PI3K/AKT/mTOR. e dall'asse MAPK / ERK.

**Asse PI3K/AKT/mTOR.** Il capostipite di questa via, la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K) comprende una famiglia di enzimi coinvolti in diversi meccanismi cellulari come la crescita, la differenziazione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, ed è quindi lampante la sua funzione all'interno dello sviluppo di una cellula tumorale<sup>13</sup>. Le PI3-chinasi, che sono associate a recettori di membrana quale proteina G o tirosin-chinasi, sono distinte in tre classi (classe I, II e III) in base ai domini proteici che le costituiscono e ne determinano la specificità. La classe I è quella più completa e comprende una serie di elementi chiave nella segnalazione cellulare. Essa catalizza il passaggio di un gruppo  $\gamma$ -fosforico dell' ATP sulla posizione D3 del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato che è in grado di reclutare sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini come l'AKT. La classe I si può distinguere in 2 sottoclassi :

- **classe Ia**, sono costituite da due subunità, 85kDa e 110 kDa, e attivate dal recettore ad attività tirosinica-chinasica (RTK) che tramite i suoi residui di fosfotirosina lega i domini SH2 trovati in tutte le isoforme p85. Vi è chiaramente una variazione nella forza e durata del segnale risultante sulla base dell'effettore legante il recettore;
- **classe Ib**, sono costituite da due subunità, 110 $\gamma$  kDa e 101 kDa, attivate da recettori di membrana associati a proteine G eterotrimeriche.

Le conseguenze fisiologiche dell'attivazione della classe I sono: crescita, sopravvivenza, traffico intracellulare, e motilità cellulare. Esse avvengono tramite processi di assorbimento dei nutrienti, sintesi macromolecolare e produzione di ATP. Inoltre svolgono un ruolo anti-apoptotico nella cellula in quanto fosforilano, inattivandoli, alcuni membri della famiglia di geni Bcl-2 che codificano per proteine che possono

---

<sup>11</sup> Ambrosini, *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving*, 1998.

<sup>12</sup> Mirza, *Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway*, 2002.

<sup>13</sup> Stein, *Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment*, 2001.

avere sia attività proapoptotica che antiapoptotica. La PI3-chinasi tramite la p110 e la subunità regolatrice p85 interagisce con il recettore convertendo il PIP2 (fosfoinositolo difosfato) a PIP3 (fosfoinositolo trifosfato) e attiva la fosfoinositide chinasi-dipendente (PDK1). PDK1 e PIP3 interagiscono tra loro causando dei cambiamenti conformazionali che permetteranno alla PDK1 di attivare l'AKT(vedi Figura 4). AKT, che si trova nel citoplasma in forma inattiva, subisce grazie all'interazione con PI3K una variazione conformazionale che gli consente la fosforilazione del suo residuo Thr308 da parte della PDK1 e della Ser473 da parte del complesso mTORC2 così da ottenere una fosforilazione, e quindi un'attivazione, completa. L'AKT è una serina/treonina chinasi, nota anche come proteina chinasi B, presente in tre isoforme (AKT1/ $\alpha$ , 2/ $\beta$  e 3/ $\gamma$ ). Una volta attivata è in grado di inibire l'AMPK e di stimolare l'induzione della crescita cellulare tramite fosforilazione di Tsc2 che attiva Rheb. Nella sua forma attiva (Rheb-GTP) attiva mTOR che a sua volta stimola crescita, angiogenesi, utilizzo del glucosio (tramite l'incremento dei trasportatori di membrana) e resistenza all'apoptosi (fosforilazione di Bad che comporta una sua inibizione). Un aumento di AKT può essere stimolato dallo shock termico, dall'ipossia, dallo stress ossidativo, dall'ipoglicemia e dalla luce ultravioletta.

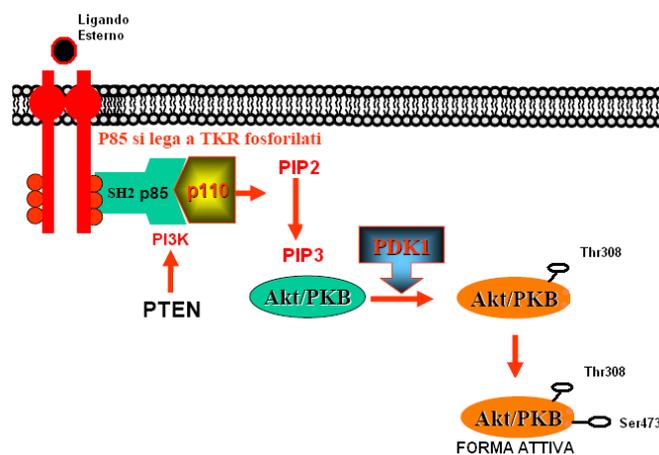


Figura 4

La via principale attraverso cui l'asse PI3K/AKT/mTOR viene inattivato è la defosforilazione dei prodotti delle PI3K che fungono da secondi messaggeri per l'attivazione di AKT. Negli ultimi anni diversi studi hanno mostrato come il percorso PI3K/AKT sia regolato anche mediante defosforilazione della stessa AKT. Le PI3-chinasi giocano un ruolo importante in alcuni tumori umani, anche se al momento è

difficile stimare quanto sia diffusa, come si possa trattare e quali tipi di cancro siano più colpiti.

**Asse Ras-Raf-MEK-ERK o MAPK / ERK**, che consiste in una serie di proteine che permettono il passaggio del segnale tramite fosforilazione o defosforilazione dalla membrana citoplasmatica al DNA del nucleo della cellula. Il segnale si origina a partire da recettori tirosin-chinasici associati alla membrana cellulare e alla proteina G con cui si legano determinati ligandi. La dimerizzazione di due recettori tirosin-chinasici, che si fosforilano a vicenda, permette loro di legarsi alla proteina Grb2, tramite il dominio SH2, e, tramite il dominio SH3, alla proteina SOS attivandola. SOS migra sulla membrana legandosi al RAS e provocando la sostituzione di GDP con GTP. La forma attivata di Ras (Ras-GTP) stimola la cascata Raf1-Mek1/2-Erk 1/2, tramite il legame all'N-terminale della Ser/Thr chinasi Raf, che trasmetterà segnali di proliferazione e di sopravvivenza. Il segnale delle MAPK coinvolge la famiglia ERK, JNK e p38 che sono un gruppo di serina/treonina chinasi che convertono gli stimoli degli stress extracellulari in diverse, a volte opposte, risposte cellulari, tra le quali l'arresto del ciclo cellulare, la morte cellulare per apoptosi e la produzione di citochine, attraverso la fosforilazione di specifici obiettivi. Ogni sottofamiglia MAPK è attivata da una specifica chinasi della MAP chinasi (MAPKK) a monte, la quale fosforila residui di treonina e tirosina all'interno di una sequenza conservata T-X-Y. L'attivazione dei membri della famiglia MAPK determina la fosforilazione di differenti molecole effettrici tra le quali MAPKAPK1, MAPKAP-K2/3, Mnk1/2, fattori di trascrizione come c-jun, ATF-2, MEF2c e CHOP, i quali influenzano le caratteristiche delle cellule. Le MAPK sono proteine che regolano la crescita, la divisione e la morte delle cellule. Esse rappresentano una cascata di eventi di fosforilazione che includono tre chinasi pilota: Raf, MEK (MAP kinase kinase) ed ERK (MAP kinase) che attivano la proliferazione cellulare o l'apoptosi sulla base della durata dello stimolo<sup>14</sup>.

---

<sup>14</sup> Sini, *Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto*, 2008.

## 2.5. Autofagia

L'autofagia è un processo catabolico che, a livello basale, rappresenta il principale meccanismo di regolazione del turnover dei componenti del citoplasma e di rimozione selettiva degli organelli danneggiati. Espleta le sue funzioni attraverso la degradazione, tramite lisosomi, di uno o più costituenti cellulari con la formazione di vescicole a doppia membrana, che inglobano, isolano e separano dal resto della cellula il materiale da degradare<sup>15</sup>. Il percorso autofagico è stato riconosciuto svolgere un ruolo significativo nella morte cellulare ed è quindi un bersaglio ideale nelle cellule tumorali. L'autofagia è ottenuta attraverso tre percorsi: l'autofagia indotta da chaperonine, dove proteine particolari sono accompagnate verso i lisosomi dalle chaperonine hsp90 e hsc70, la microautofagia e la macroautofagia. Queste ultime due differiscono per le modalità di trasporto del materiale da degradare all'interno del lume lisosomiale, per il tipo di materiale trasportato e per la sua regolazione e possono essere ulteriormente classificate in forme canoniche e non canoniche. La microautofagia è stata tradizionalmente considerata come una forma atta a garantire il turnover della vita delle proteine in condizioni basali. Durante il suo svolgimento, i lisosomi incorporano e digeriscono regioni del citosol, comprese le proteine e gli organelli citoplasmatici, tramite invaginazioni o sporgenze e senza la formazione intermedia di vacuoli autofagici. La macroautofagia è responsabile della degradazione delle proteine solubili e degli organuli in condizioni di stress e implica la formazione di vacuoli con doppia membrana (autofagosomi) in grado di sequestrare porzioni del citoplasma e di traslocarli ai lisosomi. Ad oggi sono stati identificati più di 30 geni correlati al processo autofagico (ATG) con i loro percorsi relativi. Alcuni, come Atg1, sono coinvolti in fasi a monte della formazione dell'autofagosoma; altri, come ad esempio Beclin-1 (Atg6), svolgono il loro ruolo come parte di un complesso di base che contiene 34 proteine vacuolari per lo smistamento (VPS34); altri ancora, come ad esempio LC-3, una lipoproteina, sono inseriti nella superficie esterna e interna della autofagosomi, e sono essenziali per la biogenesi delle grandi vescicole a doppia membrana. La macroautofagia si sviluppa in quattro stadi:

- fase d'induzione. E' regolata da mTOR, una chinasi che funge da sensore dei livelli di energia cellulare e degli amminoacidi disponibili. I segnali che

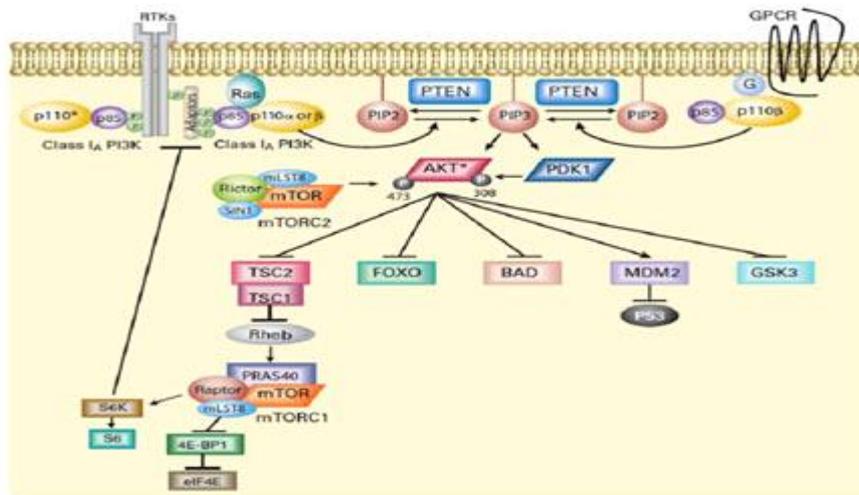
---

<sup>15</sup> Treccani, *Enciclopedia italiana. Autofagia*, 2010.

inducono autofagia determinano inattivazione di mTOR, formazione del complesso atg13-atg1 e induzione di vari geni che codificano proteine coinvolte nell'espansione dell'autofagosoma;

- formazione dell'autofagosoma. Il materiale citoplasmatico di varia natura è inglobato nell'autofagosoma grazie all'azione di diverse attività enzimatiche e di un sistema costituito dai prodotti dei geni Atg (Autophagy-related gene). Questo è costituito dalla proteasi atg8 (lc3 nei mammiferi, una proteina simile all'ubiquitina), dalla proteasi atg4 e dal complesso atg12-atg5. Si ritiene che l'interazione tra la proteina p62 (e tutto ciò che a essa si accompagna) e lc3 rappresenti il segnale specifico e necessario per indirizzare elementi citosolici a degradazione mediante autofagia;
- fase di riconoscimento e fusione dell'autofagosoma al lisosoma. E' assicurata, da diverse proteine tra cui le SNARE (proteine di membrana che favoriscono l'aggancio delle vescicole);
- demolizione del corpo autofagico. Mentre la membrana esterna dell'autofagosoma si fonde con quella del lisosoma il resto è degradato dalle idrolasi lisosomiali. Le sostanze che erano presenti all'interno dell'autofagosoma sono riassorbite nel vacuolo e rese disponibili per le cellule.

A livello molecolare, l'autofagia è regolata da numerosi fattori proteici, che sono coinvolti in fasi chiave del meccanismo e su cui è possibile intervenire per stimolarne l'attivazione bloccando di fatto lo sviluppo della cellula tumorale. L'asse PI3K/AKT/mTOR e l'AMP chinasi sono le due vie principali coinvolte nel controllo autofagico. Nel primo caso si può agire su mTOR(vedi Figura5) che è un repressore dell'autofagia, perché è responsabile dell'iperfosforilazione di Atg1, un evento che comporta l'inibizione della formazione del complesso di induzione. mTOR viene stimolato da AKT tramite la fosforilazione e inibizione del complesso TSC1/TSC2, che è, a sua volta, responsabile dell'inattivazione mTOR.



da: Courtney et al. *J Clin Onc*, 2010

Figura 5

L'altro percorso cruciale coinvolto nell'autofagia è sostenuto dall'AMPK, un enzima coinvolto nella regolazione dell'omeostasi cellulare ed attivato da un aumento intracellulare del rapporto AMP / ATP come conseguenza di un deficit energetico. L'aumento di AMP comporta un cambiamento conformazionale sulla subunità  $\gamma$  dell'AMPK, grazie al legame di due AMP sui due domini presenti sulla subunità  $\gamma$ , che permette quindi l'esposizione del sito attivo (Thr172) alla subunità  $\alpha$ . Questo evento è responsabile per l'inibizione di mTOR, che provoca un aumento dell'autofagia e la fosforilazione di p53 che ha come conseguenza un arresto del ciclo cellulare. L'autofagia è stimolata anche dall'ipossia, dai ROS e da ER-stress.

Nel tentativo di spiegare l'esatto ruolo dell'autofagia nel processo di cancro, Eisenberg-Lerner e Kimchi hanno recentemente presentato un modello in cui il suo ruolo dipende dalla fase della vita cellulare: fase precancerosa, cellula trasformata e tumore solido. Nelle prime due fasi l'autofagia potrebbe accelerare lo sviluppo del tumore, mentre nei tumori solidi, quando l'apoptosi è assente, il programma di autofagia potrebbe essere antitumorigenico. È stato dimostrato che l'autofagia può intraprendere una complessa interazione con l'apoptosi: in relazione al tipo di cellula, potrebbe o servire come percorso di sopravvivenza cellulare sopprimendola, o innescare un percorso di morte in collaborazione con essa o sostituendosi ad essa nel caso sia difettosa.

## Capitolo 3

### Cannabis, fitocannabinoidi ed endocannabinoidi

#### 3.1. Morfologia e Tassonomia della Cannabis

La cannabis sativa è una pianta erbacea dioica annua, di notevoli dimensioni, che può raggiungere i 4 metri, appartenente alla famiglia delle cannabaceae e all'ordine delle Urticales<sup>16</sup>. È dotata di un fusto eretto, più o meno ramificato, sottile e scanalato longitudinalmente. Ha foglie palmato-composte con penne lanceolate allungate e strette con margine seghettato ma di tipo diverso a seconda dell'inserimento nel fusto: opposte e composte da 5-7 foglioline seghettate alla base (vedi Figura 6); alterne, semplici o segmentate all'apice<sup>17</sup>. Sulle foglie e sulle brattee sono presenti rispettivamente peli protettori unicellulari a parete liscia, estremità ricurva, base slargata e contenente un cristallo di carbonato di calcio e peli secretori con piede pluricellulare e testa secretrice 8-16 cellulare globosa. Quest'ultimi sono ricchi di olio essenziale resinoso e costituiscono quindi una parte fondamentale della droga. I fiori sono piccoli e raggruppati in infiorescenze maschili e femminili: gli staminiferi in grappoli di cime ascellari mentre quelli pistilliferi si trovano all'ascella delle brattee raggruppate all'estremità dei rami. La pianta germina in primavera e fiorisce in estate inoltrata, mentre i frutti compaiono in autunno sotto forma di acheni ovoidi, frutti secchi indeiscenti nei quali l'unico seme aderisce al pericarpo per un solo punto. Tutte le piante femminili e maschili contengono cannabinoidi e la concentrazione aumenta nell'ordine: gambi, in minima parte, foglie grandi, foglie piccole, fiori e brattee<sup>18</sup>.



A	Infiorescenza della pianta maschile	7	Fiore pistillato con ovaie
B	Infiorescenza della pianta femminile	8	Seme con bracteolo
1	Fiore staminato	9	Seme senza bracteolo
2	Organo riproduttivo del fiore staminato	10	Seme (visione laterale)
3	Organo riproduttivo del fiore staminato	11	Seme (sezione trasversale)
4	Grani di polline	12	Seme (sezione longitudinale)
5	Fiore pistillato con bracteolo	13	Seme (senza pericarpo)
6	Fiore pistillato senza bracteolo		

Figura 6

<sup>16</sup> Leporatti, *Testo atlante di anatomia vegetale e delle piante officinali*, 1997.

<sup>17</sup> Bruni, *Farmacognosia generale e applicata*, 2005.

<sup>18</sup> Dewick, *Chimica biosintesi e bioattività delle sostanze naturali*, 2000.

Per lungo tempo si sono distinte due specie sulla base di una classificazione proposta dai due studiosi canadesi Small e Cronquist nel 1976: la sub-specie *cannabis sativa* destinata ad uso tessile, in quanto tramite macerazione e battitura è possibile ottenere una fibra molto resistente, e la sub-specie *cannabis indica* destinata ad un uso voluttuario e terapeutico a causa dell'elevata concentrazione di principi attivi. Oggi invece sulla base dell'analisi chimica delle concentrazioni dei due cannabinoidi principali, il  $\Delta^9$ -tetraidocannabinolo (THC) e il cannabidiolo (CBD), nonché sulla base dell'anatomia della pianta, si possono identificare tre varietà<sup>19</sup> (vedi Figura7) confermando quindi la classificazione risalente al 1924 del botanico russo D.E Janichewsky, diffusa in occidente negli anni settanta del Novecento da Richard Schultes<sup>20</sup>:

1. *Cannabis sativa*: ha dimensioni piuttosto ragguardevoli, potendo raggiungere un'altezza fino a 4 metri. Presenta una forma slanciata con cime ampie e dilatate, internodi allungati, ramificazione apicale, foglie di colore verde chiaro, mentre la produzione di resina non è particolarmente abbondante ma ha una buona percentuale sia di THC che di CBD. E' dotata di caratteristiche intermedie rispetto alla specie *indica* e *ruderalis* ed è coltivabile nelle regioni settentrionali con clima temperato umido. Il periodo di fioritura varia tra le 9 e le 12 settimane;
2. *Cannabis indica*: non supera i 2 metri di altezza, è caratterizzata da una forma tarchiata, le foglie sono di colore verde scuro. La droga, ad alto tenore di THC (>1%) e basso contenuto di CBD, è la composizione prevalente della cannabis originaria di paesi caldo umidi e ricca di resina, con periodo di fioritura compreso tra le 6 e le 9 settimane;
3. *Cannabis ruderalis*: arriva a malapena al metro di altezza, la percentuale di THC è molto bassa, invece quello di CBD è elevato (<0,3%). Sono coltivate per fini tessili nelle regioni settentrionali il periodo di fioritura è molto breve, nell'ordine delle 4 settimane, e non dipende dal periodo di esposizione al sole.

Viene così confermata la tesi di Linneo che già nel 1753 parlò di *cannabis sativa* in studi condotti su piante che crescevano nell'Europa Settentrionale. Bisogna sottolineare

---

<sup>19</sup> Scheda tecnica Cannabis e derivati, Sistema Nazionale di Allerta Precoce, Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri, 2010.

<sup>20</sup> Grinspoon, *Marijuana Reconsidered*, 1994.

però che le tre tipologie, nonostante le variazioni genetiche, subiscono delle modificazioni nel contenuto di principi attivi e nelle loro caratteristiche, in base al clima presente; quindi per esempio piante in grado di produrre grandi quantità di resina e originarie di zone con clima temperato, se esposte ad un clima tipico delle regioni settentrionali, diminuiranno la produzione di resina.

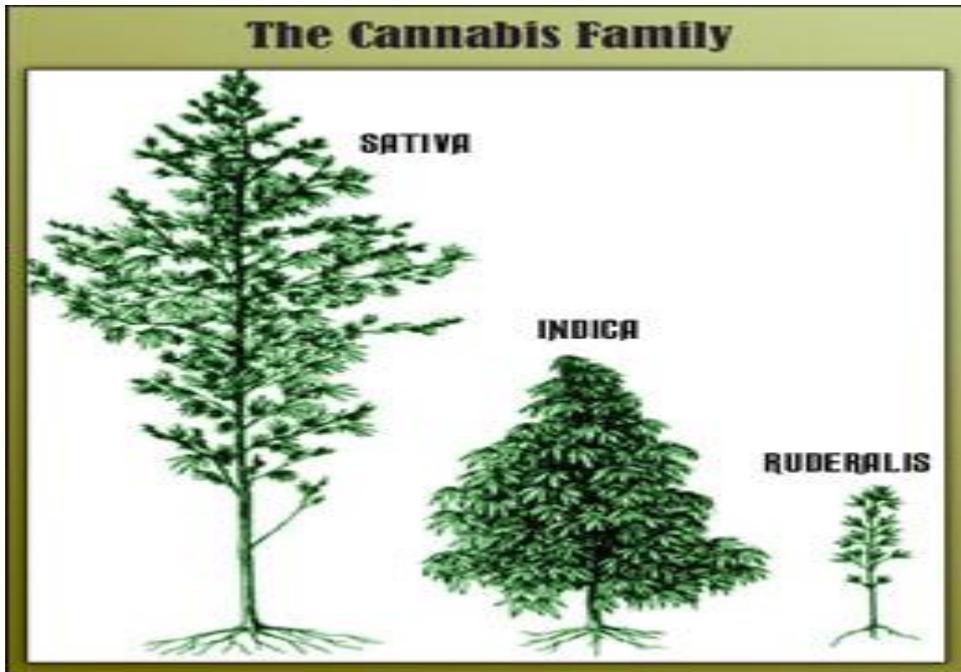


Figura 7

Sono state poi proposte varie equazioni per una determinazione più precisa del contenuto dei vari composti. La più diffusa è l'equazione di Haller :

$$\text{THC} + \text{CBN}/\text{CBD} > 1$$

- THC=  $\Delta^9$  tetraidrocannabinolo
- CBN= cannabinolo
- CBD= cannabidiolo

### 3.2. Costituenti chimici

I composti chimici presenti all'interno della cannabis sono molti e appartengono a varie classi: si possono avere cannabinoidi, terpeni, zuccheri, idrocarburi, steroidi, flavonoidi, aminoacidi e composti azotati. Il numero totale di costituenti chimici all'interno della

pianta è stato aggiornato nel 1980 (480 composti), nel 1995 (483 composti) e nel 2005 (489 composti)<sup>21</sup>(vedi Figura8).

Chemical Class	1980	1995	2005
Cannabinoids	61	66 <sup>3</sup>	70
CBG type	6	6	7
CBC type	4	4	5
CBD type	7	7	7
$\Delta^9$ -THC type	9	9	9
$\Delta^8$ -THC type	2	2	2
CBL type	3	3	3
CBE type	5	5	5
CBN type	6	7	7
CBND type	2	2	2
CBT type	6	9	9
Misc type	11	12	14
Nitrogenous compounds	20	27	27
Amino acids	18	18	18
Proteins, enzymes and glycoproteins	11	11	11
Sugars and related compounds	34	34	34
Hydrocarbons	50	50	50
Simple alcohols	7	7	7
Simple aldehydes	12	12	12
Simple ketones	13	13	13
Simple acids	20	20	20
Fatty acids	12	23	23
Simple esters and lactones	13	13	13
Steroids	11	11	11
Terpenes	103	120	120
Non-cannabinoid phenols	16	25	25
Flavonoids	19	21	23
Vitamins	1	1	1
Pigments	2	2	2
Elements	0	9	9
<b>Total</b>	<b>423<sup>1</sup></b>	<b>483<sup>2</sup></b>	<b>489</b>

Figura 8

La **Classificazione** prevede una distinzione tra:

- **Cannabinoidi o Fitocannabinoidi,**

quest'ultimo è un termine reso necessario per distinguere i cannabinoidi presenti all'interno della pianta di cannabis, rispetto ai cannabinoidi di nuova sintesi (nabilone, acido aiulemico e dexamabinolo) e a quelli presenti all'interno del corpo umano chiamati endocannabinoidi (anandamide, 2-arachidonoilglicerolo).

<sup>21</sup> ElSohly, *Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids*, 2005.

I fitocannabinoidi sono definiti come composti terpenofenolici, caratterizzati da una struttura contenente 21 atomi di carbonio, chimicamente connessi alla famiglia dei terpeni (composti costituiti da subunità di C10 isoprene). La struttura chimica 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, infatti con la prima il THC viene definito come  $\Delta$ -1-tetraidrocannabinolo ( $\Delta$ -1-THC), mentre con la seconda diventa  $\Delta$ -9-tetraidrocannabinolo  $\Delta$ -9-THC.

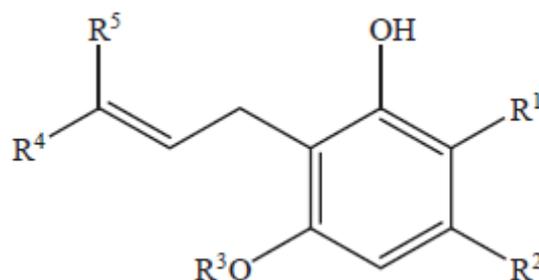
Biosintesi dei fitocannabinoidi: la sintesi inizia con l'incorporazione del geranil pirofosfato con C10 polichetide (catena laterale propilica) per ottenere CBGV cannabigerovarina, o geranil pirofosfato con C12 polichetide (catena laterale pentilica) per raggiungere cannabigerolo (CBG). Secondo gli studi sono presenti due alleli che ci permettono di ottenere o la via CBGV o la via CBG. La biosintesi del THC, del cannabidiolo (CBD), del cannabicromene (CBC) sono controllati da tre enzimi che fanno riferimento a un singolo allele: T, D e C rispettivamente. I tre enzimi possono utilizzare a piacere la via del propile o del pentile sulla base del substrato presente. E' stato scoperto che la biosintesi di CBD e THC sono controllate da due alleli co-dominanti che codificano per le isoforme della stessa sintesi con differente specificità per convertire il precursore comune CBG in CBD o THC<sup>22</sup>.

I fitocannabinoidi finora scoperti sono 74 e sono classificati in:

- Cannabigerolo (CBG) (otto derivati) (vedi Figura9). Il cannabigerolo è stato il primo composto estratto sottoforma di sostanza pura da Mecholaum nel 1964 dalla resina di marijuana. Il CBG deriva dal suo precursore l'acido cannabigerolico (CBGA), che è invece il primo cannabinoide che si origina all'interno della pianta durante lo sviluppo. Sono componenti di per sé inattivi chimicamente rispetto al  $\Delta$ 9 tetraidrocannabinolo, ma sono caratterizzati da una buona attività antibatterica soprattutto contro Gram +. Sono 8 componenti, tra di essi vi è l'analogo del CBG con catena laterale propilica e il derivato monometil etere, l'ultimo isolato in ordine cronologico è l'acido cannabigenerolico ed è l'unico che è in forma trans gli altri hanno una geometria cis;

---

<sup>22</sup> ElSohly, *Marijuana and the cannabinoids*, 2007.

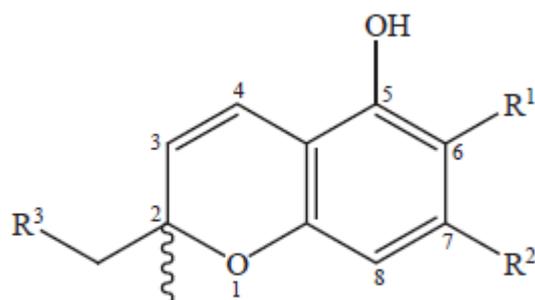


CBG-type cannabinoids

Compound	<i>cis/trans</i>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>
Cannabigerolic acid A [( <i>E</i> )-CBGA-C <sub>5</sub> A]	<i>cis</i>	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me
Cannabigerolic acid A monomethyl ether [( <i>E</i> )-CBGAM-C <sub>5</sub> A]	<i>cis</i>	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	Me	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me
Cannabigerol [( <i>E</i> )-CBG-C <sub>5</sub> ]	<i>cis</i>	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me
Cannabigerol monomethyl ether [( <i>E</i> )-CBGM-C <sub>5</sub> ]	<i>cis</i>	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	Me	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me
Cannabigerovarinic acid A [( <i>E</i> )-CBGVA-C <sub>3</sub> A]	<i>cis</i>	COOH	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me
Cannabigerovarin [( <i>E</i> )-CBGV-C <sub>3</sub> ]	<i>cis</i>	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Me
Cannabinerolic acid A [( <i>Z</i> )-CBGA-C <sub>5</sub> A]	<i>trans</i>	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H	Me	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Figura 9

- Cannabicromene (CBC) (sei derivati) (vedi Figura 10). Il cannabicromene è stato estratto e purificato insieme ai composti CB-C<sub>5</sub> da Mecholaum nel 1966. Gli acidi CBC, gli acidi cannabicromenici e gli acidi cannabicromevarinici sono caratterizzati da un'attività ottica  $[\alpha]_D +4.8^\circ$  e  $-4.8^\circ$  in cloroformio, ma nonostante ciò hanno caratteristiche racemiche. Questo è provato anche dal fatto che entrambi gli acidi sono acidi A, come si evince dai dati dello spettro IR e dalla comparazione con composti di sintesi. L'isolamento dell'analogo C<sub>3</sub> del CBC è stato riportato da tre distinti gruppi<sup>22</sup>:
  1. De Zeeuw et altri isolarono il composto utilizzando l'analisi GC-MS e gli diedero il nome di cannabivaricromene, ma fecero un errore disegnando una catena laterale con un isopropile sul C<sub>3</sub>;
  2. Shoyama et altri isolarono il composto cannabicromevarina con una catena laterale n-propile sul C<sub>3</sub> e identificarono quindi un'attività di rotazione di  $[\alpha]_D +58^\circ$  (cloroformio);
  3. Morita e Ando riuscirono a separare e ad isolare un CBC C<sub>3</sub> con una catena laterale 4metil-2pentil sul carbonio in posizione 2, invece negli altri componenti CBC è stata trovata una catena laterale 4metil-3pentil sul C<sub>2</sub>;



CBC-type cannabinoids

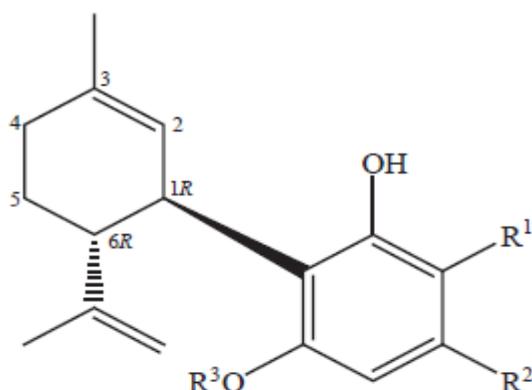
Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
(±)-Cannabichromenic acid (CBCA-C <sub>5</sub> A)	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
(±)-Cannabichromene (CBC-C <sub>5</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
(±)-Cannabichromevarinic acid (CBCVA-C <sub>3</sub> A)	COOH	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
(±)-Cannabivarichromene (CBCV-C <sub>3</sub> /CBCV- <sup>2</sup> C <sub>3</sub> )	H	<i>n/i</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
(+)-Cannabichromevarin (CBCV-C <sub>3</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
2-Methyl-2-(4-methyl-2-pentenyl)-7-propyl-2 <i>H</i> -1-benzopyran-5-ol	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>2</sub> CH=CHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

Figura 10

- Cannabidiolo (CBD) (sette derivati) (vedi Figura 11). Il cannabidiolo è stato isolato per la prima volta nel 1940 da Adam e altri la sua configurazione assoluta è stata stabilita nel 1969, mentre il CBDA, isolato nel 1955, è stato il primo acido cannabinoidale isolato. Sono stati descritti sette tipi di cannabinoidi CBD con diversa catena laterale sul C1 e C5. Tutti i composti CBD sono caratterizzati da una geometria *trans* e ipoteticamente da una rotazione ottica negativa, come per esempio la cannabidivarina che ha una  $[\alpha]_{D=}$  -139.5° utilizzando il cloroformio. Il CBD e il CBDA sono i cannabinoidi più abbondanti nelle piante da fibra (piante industriali). IL CBD è il secondo composto più efficace per attività (dopo il THC); ha un'azione ansiolitica e riduce gli effetti sgradevoli del THC tramite un'azione antipsicotica e protettiva<sup>23</sup>. Possiede attività analgesiche e antinfiammatorie mediate dall'inibizione della ciclossigenasi e lipossigenasi. In vitro il cannabidiolo stimola il rilascio della prostaglandina PGE2 dalle cellule sinoviali, inibisce la sintesi del leucotriene TXB4 nelle cellule polimorfonucleate, analogamente al

<sup>23</sup> Morgan, *Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis*, 2008.

tetraidrocannabinolo<sup>24</sup>. Con il tetraidrocannabinolo condivide anche la capacità di agire sul sistema nervoso centrale, anche se in minor quantità. E' in grado di inibire il citocromo P450 3A11 che è uno dei fattori della trasformazione del THC nella forma psicoattiva 11-idrossi THC;



#### CBD-type cannabinoids

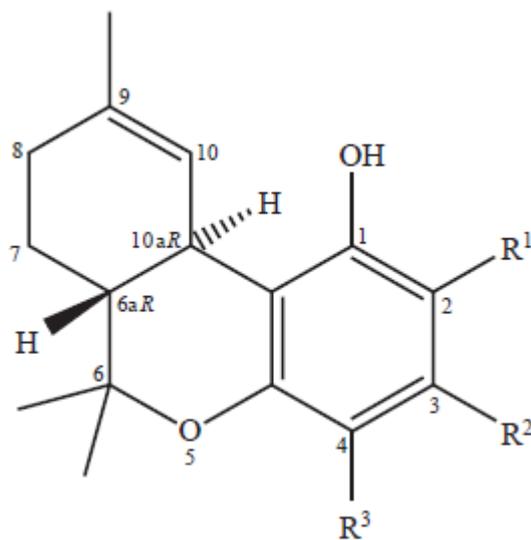
Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Cannabidiolic acid (CBDA-C <sub>5</sub> )	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H
(-)-Cannabidiol (CBD-C <sub>5</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H
Cannabidiol monomethyl ether (CBDME-C <sub>5</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	Me
Cannabidiol-C <sub>4</sub> (CBD-C <sub>4</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H
Cannabidivarinic acid (CBDVA-C <sub>3</sub> )	COOH	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H
(-)-Cannabidivarin (CBDV-C <sub>3</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H
Cannabidiolcol (CBD-C <sub>1</sub> )	H	CH <sub>3</sub>	H

Figura 11

- *Δ9-trans-tetraidrocannabinolo* (*Δ9*-THC) (vedi Figura12). Il *Δ9* tetraidrocannabinolo è stato isolato per la prima volta nel 1942, ma è solo nel 1964 che è stato possibile determinarne la struttura grazie a Gaoni e Mechoulam che, tramite la tecnica della risonanza magnetica nucleare (NMR), riuscirono ad individuare la configurazione *-trans*, la posizione del doppio legame e la rotazione ottica pari a  $[\alpha]_D = -140^\circ$ . La configurazione assoluta del tetraidrocannabinolo è stata determinata come *trans*-(6aR,10aR), comparandola con d-(+)-gliceraldeide e (-)-CBD. Il precursore del *Δ9* THC è l'acido THC A,

<sup>24</sup> Evans, *Inhibition of A23187-induced release of leukotriene B<sub>4</sub> in mouse whole blood Ex vivo and human polymorphonuclear cells in vitro by the cannabinoid analgesic cannabidiol*,1991.

mentre l'acido THC B è presente in quantità molto minori all'interno della pianta. Sono stati quindi riconosciuti 9 tipi di cannabinoidi THC anche se non è certo se gli acidi in C4 e in C1 siano acidi di tipo A o B. E' il composto con maggiore attività presente all'interno della cannabis sativa, l'isomero (-)-trans del THC è della 6 alla 100 volte più potente dell'isomero (+)-trans entrambi vanno ad agire sul recettore CB1;



$\Delta^9$ -trans-THC-type cannabinoids

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta^9$ -THCA-C <sub>5</sub> A)	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H
Tetrahydrocannabinolic acid B ( $\Delta^9$ -THCA-C <sub>5</sub> B)	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	COOH
Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC-C <sub>5</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	H
Tetrahydrocannabinolic acid-C <sub>4</sub> ( $\Delta^9$ -THCA-C <sub>4</sub> A and/or B)	COOH or H	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H or COOH
Tetrahydrocannabinol-C <sub>4</sub> ( $\Delta^9$ -THC-C <sub>4</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H
Tetrahydrocannabivarinic acid A ( $\Delta^9$ -THCVA-C <sub>3</sub> A)	COOH	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H
Tetrahydrocannabivarin ( $\Delta^9$ -THCV-C <sub>3</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H
Tetrahydrocannabiorcolic acid ( $\Delta^9$ -THCOA-C <sub>1</sub> A and/or B)	COOH or H	CH <sub>3</sub>	H or COOH
Tetrahydrocannabiorcol ( $\Delta^9$ -THCO-C <sub>1</sub> )	H	CH <sub>3</sub>	H

Figura 12

E' possibile provvedere alla sintesi *ex novo* del  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo tramite la reazione del p-menta-2,8-dien-1-olo e olivetolo in presenza di trifloruro di boro e magnesio solfato così da ottenere o  $\Delta^1$ -tetraidrocannabinolo o  $\Delta^6$ -tetraidrocannabinolo(vedi Figura 13):

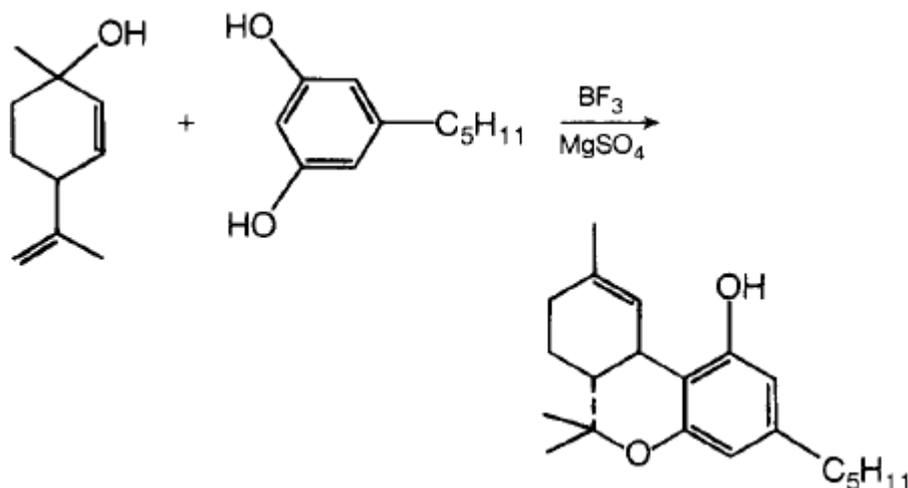
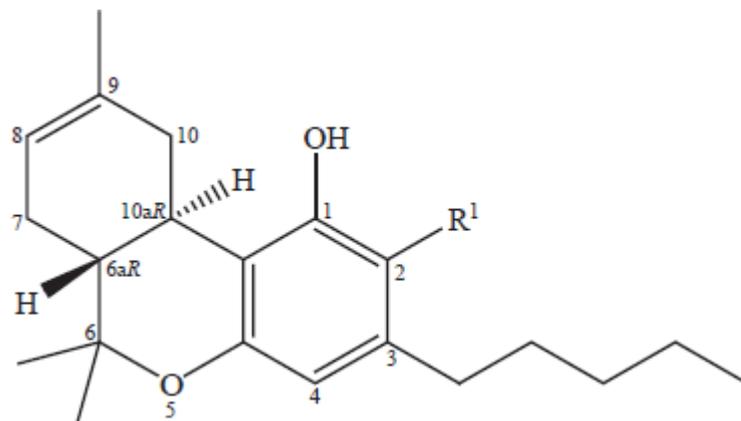


Figura 13

- *Δ8-trans-tetraidrocannabinolo* ( $\Delta 8$ -THC) (due derivati) (vedi Figura 14). Questo gruppo è costituito da due soli componenti chiamati  $\Delta 8$ -trans-tetraidrocannabinolo e acido  $\Delta 8$ -trans-tetraidrocannabinolico. Essi sono caratterizzati da una configurazione assoluta simile alla loro copia  $\Delta 9$  i.e. trans-(6aR,10aR). Nonostante non sia stata scoperta nessuna rotazione ottica per l'acido  $\Delta 8$ -trans-tetraidrocannabinolico, il  $\Delta 8$ -trans-(6aR,10aR)-THCVA-C3 A di origine sintetica ha riportato un valore di  $[\alpha]_{D=}$   $-268^\circ$  (in cloroformio); ciò indica che l'analogo C5-omologo potrebbe essere caratterizzato da una attività ottica negativa. Il  $\Delta 8$ -THC ha una attività inferiore approssimativamente del 20% rispetto al  $\Delta 9$  THC;



$\Delta^8$ -*trans*-THC-type cannabinoids

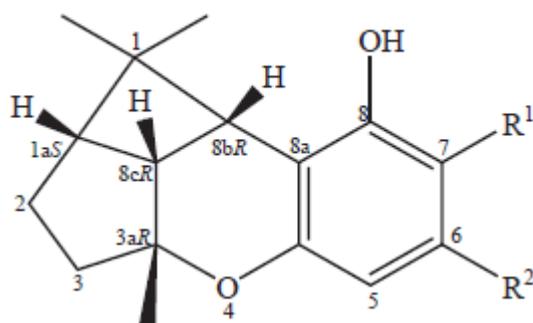
Compound	R <sup>1</sup>
(-)- $\Delta^8$ - <i>trans</i> -(6a <i>R</i> ,10a <i>R</i> )-Tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta^8$ -THCA-C <sub>5</sub> A)	COOH
(-)- $\Delta^8$ - <i>trans</i> -(6a <i>R</i> ,10a <i>R</i> )-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC-C <sub>5</sub> )	H

Figura 14

- Cannabicyclolo (CBL) (tre componenti) (vedi Figura15). In un primo momento si pensava che avesse una struttura simile al THC e infatti venne chiamato THC III, successivamente venne isolato (1967); così fu rivista la struttura e rinominato cannabicyclolo/cannabipinolo. La conversione fotochimica del cannabicomene in cannabicyclolo suggerisce un'altra revisione della struttura e un'altra origine del composto<sup>12</sup>. Il cannabicyclolo proveniente dalla pianta non sembra possedere attività ottica, nonostante venga riportato in alcuni studi una  $[\alpha]_{D=}$  -3°; ciò potrebbe essere dovuto o all'irradiazione naturale nella pianta o a un'alterazione nell'estratto grezzo della pianta. Quest'ultima struttura fu confermata tramite NMR e analisi tramite i raggi X, anche se la configurazione assoluta rimane ancora sconosciuta. E' costituito da un ciclopentano con struttura planare e forma con l'anello aromatico un angolo di 79°. Tutti gli atomi dell'anello diidropiranoico (tranne l'ossigeno) fanno parte del piano dell'anello aromatico. Il ciclopentano adotta una conformazione a busta, con C-6 fuori dal piano<sup>25</sup>. L'acido cannabicyclolico (CBLA-C5 A) è stato isolato e identificato come acido A del cannabicyclolo tramite l'analisi NMR dell'estere metilico e la comparazione tra il cannabicyclolo e il prodotto di decarbossilazione. La

<sup>25</sup> Mechoulam, *Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Cannabis*, 1974.

conversione fotochimica di CBCAC5 a CBLA-C5 A è stata ampiamente dimostrata e, insieme al fatto che CBLA-C5 A è stata ritrovata e raccolta in una grande quantità di fase vegetativa e comparata con una raccolta fatta in fase riproduttiva, suggerisce che l'acido CBLA-C5 non sia una sostanza naturale ma un'alterazione prodotta dalla naturale irradiazione dell'acido CBCA-C5 durante il deposito. Cannabiciclovarina (CBLV-C3) venne scoperto tramite GC-MS e più tardi isolato come otticamente inattivo con aghi incolori. Questa struttura venne confermata tramite comparazione con il composto sintetico CBLV-C3 ottenuto per irradiazione del CBCV-C3, ma di questi composti è conosciuta solo la configurazione relativa;



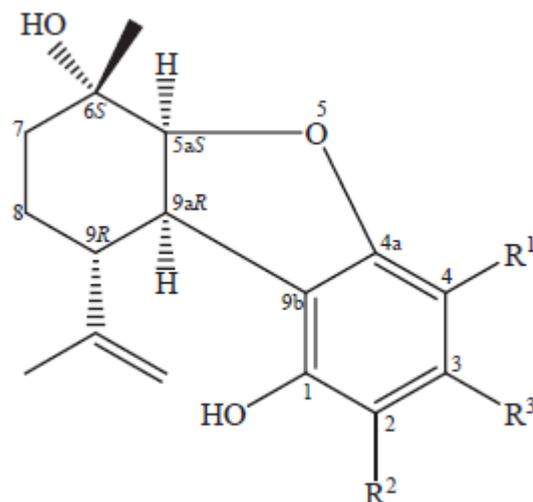
CBL-type cannabinoids

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
(±)-(1 <i>aS</i> ,3 <i>aR</i> ,8 <i>bR</i> ,8 <i>cR</i> )-Cannabicyclic acid (CBLA-C <sub>5</sub> A)	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(±)-(1 <i>aS</i> ,3 <i>aR</i> ,8 <i>bR</i> ,8 <i>cR</i> )-Cannabicyclol (CBL-C <sub>5</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(±)-(1 <i>aS</i> ,3 <i>aR</i> ,8 <i>bR</i> ,8 <i>cR</i> )-Cannabicyclovarin (CBLV-C <sub>3</sub> )	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Figura 15

- Cannabielsoina (CBE) (cinque derivati) (vedi Figura 16). I composti di tipo CBE sono stati poco frequentemente trattati e quindi vi erano delle diatribe sulla loro composizione e struttura. Essi possono essere sintetizzati a partire da CBD e acido CBD tramite successiva foto-ossidazione o pirolisi. Ma è stato anche riportato che CBE e l'acido CBE (con gli analoghi C3 e C5) siano contenuti all'interno della pianta e dell'hashish. La prima volta che furono menzionati in letteratura risale al 1973 ma non sono state riportate ulteriori informazioni in merito. La composizione assoluta è stata finalmente stabilita tramite sintesi di CBE C5 usando come materiale di partenza il cannabidiolo diacetato e tramite

comparazione con l'acido CBE naturale decarbossilato. Non si menziona e non è stata trovata un'attività di rotazione ottica, ma gli esteri metilici degli acidi CBE-C5 mostrano un valore positivo nel cloroformio. La configurazione assoluta per questi composti è (5a*S*,6*S*,9*R*,9a*R*);

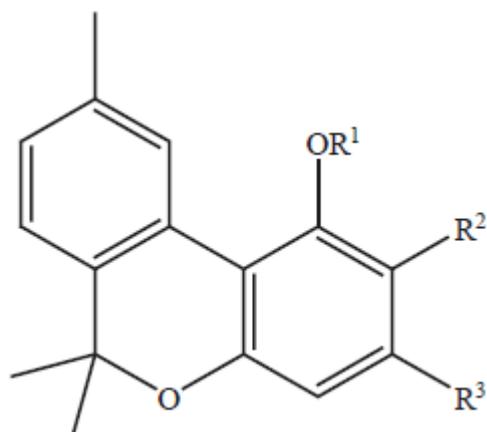


CBE-type cannabinoids

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
(5a <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9a <i>R</i> )-Cannabielsoic acid A (CBEA-C <sub>5</sub> A)	COOH	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(5a <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9a <i>R</i> )-Cannabielsoic acid B (CBEA-C <sub>5</sub> B)	H	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(5a <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9a <i>R</i> )-C <sub>3</sub> -Cannabielsoic acid B (CBEA-C <sub>3</sub> B)	H	COOH	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
(5a <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9a <i>R</i> )-Cannabielsoin (CBE-C <sub>5</sub> )	H	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(5a <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i> ,9a <i>R</i> )-C <sub>3</sub> -Cannabielsoin (CBE-C <sub>3</sub> )	H	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Figura 16

- Cannabinolo (CBN) (sette derivati) (vedi Figura 17). Sono dei derivati aromatizzati del THC e sono stati isolati da differenti derivati di cannabis. La concentrazione di CBN nei prodotti aumenta durante il riposo dei materiali, invece la concentrazione di Δ<sup>9</sup> THC diminuisce ma in differenti quantità rispetto al cannabinolo;

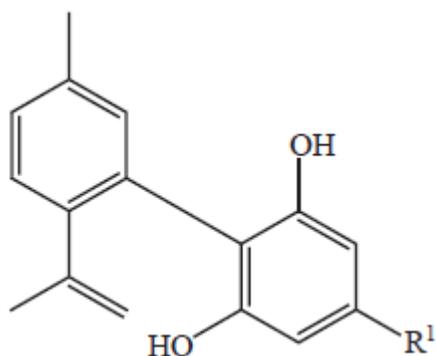


CBN-type cannabinoids

Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Cannabinolic acid A (CBNA-C <sub>5</sub> A)	H	COOH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
Cannabinol (CBN-C <sub>5</sub> )	H	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
Cannabinol methyl ether (CBNM-C <sub>5</sub> )	CH <sub>3</sub>	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
Cannabinol-C <sub>4</sub> (CBN-C <sub>4</sub> )	H	H	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
Cannabivarin (CBN-C <sub>3</sub> )	H	H	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Cannabinol-C <sub>2</sub> (CBN-C <sub>2</sub> )	H	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Cannabiorcol-C <sub>1</sub> (CBN-C <sub>1</sub> )	H	H	CH <sub>3</sub>

Figura 17

- Cannabinodiolo (CBND) (due derivati) (vedi Figura 18). Sono dei derivati aromatizzati del CBD e sono stati menzionati per la prima volta nel 1972. Lo scienziato Van Ginneken utilizzò il termine Cannabinodiolo per un composto isolato tramite GC-MS dall'hashish ma in seguito fu dimostrato non essere una associazione corretta, e il cannabinodiolo venne sintetizzato a partire dal CBND-C<sub>5</sub>. Il composto scoperto da Van Ginneken venne chiamato cannabifurano(CBF-C<sub>5</sub>). Si scoprì che il cannabinodiolo in natura è prodotto a partire da una conversione fotochimica del cannabinolo.



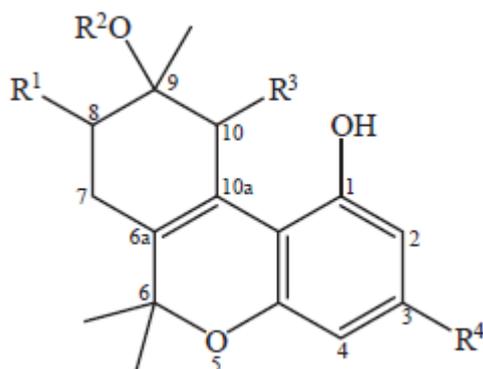
CBND-type cannabinoids	
Compound	R <sup>1</sup>
Cannabinodiol (CBND-C <sub>5</sub> )	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
Cannabinodivarin (CBVD-C <sub>3</sub> )	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>

Figura 18

- Cannabitriolo (CBT) (nove derivati) (vedi Figura19). E' stato isolato per la prima volta da Obata and Ishikawa (1966), la struttura venne determinata da Chan et al. (1976), che riportarono una rotazione ottica a  $[\alpha]_D = -107^\circ$ . L'isolamento e la caratterizzazione strutturale del (+)-cannabitriolo  $\{[\alpha]_D +7-\}$  sono state eseguite tramite una singola analisi ai raggi X del +/-cannabitriolo da McPhail e altri, confermando così le strutture del (+) e del (-)cannabitriolo, definendo le configurazioni relative e constatando che tutti i derivati del cannabitriolo scoperti fino a quel momento erano dotati di una configurazione – trans. L'isomero (+)cis del trans-cannabitriolo fu isolato nel 1978, ma non furono isolati separatamente gli isomeri cis (-)e (+). Il (+/-)-trans-Cannabitriolo-C3 e il CBT-C3-omologo caratterizzati da una stereochimica sconosciuta vennero identificati mediante GS-MS da Harvey nel 1985 in un estratto di cannabis conservato all'interno di etanolo<sup>26</sup>. Il derivato C10-etossilico ( $[\alpha]_D = -10$ ) del (T)-transcannabitriolo-C5 venne isolato nel 1977 e l'omologo C3 nel 1985. L'isomero 8,9-diidrossile del cannabitriolo appare come un olio giallo otticamente inattivo, ma la configurazione assoluta e relativa rimane sconosciuta. Harvey menzionò la presenza del metil-cannabitriolo nell'estratto che analizzò tramite monitoraggio selettivo di ioni, ma non sono disponibili

<sup>26</sup> Harvey, *Examination of a 140 year old ethanolic extract of Cannabis: identification of new cannabitriol homologues and the ethyl homologue of cannabinol*, 1985.

ulteriori dettagli. L'estere tetraidrocannabintriolo acido cannabidiolico (estere C9-OH) è l'unico estere riportato come cannabinoide naturale<sup>26</sup>;

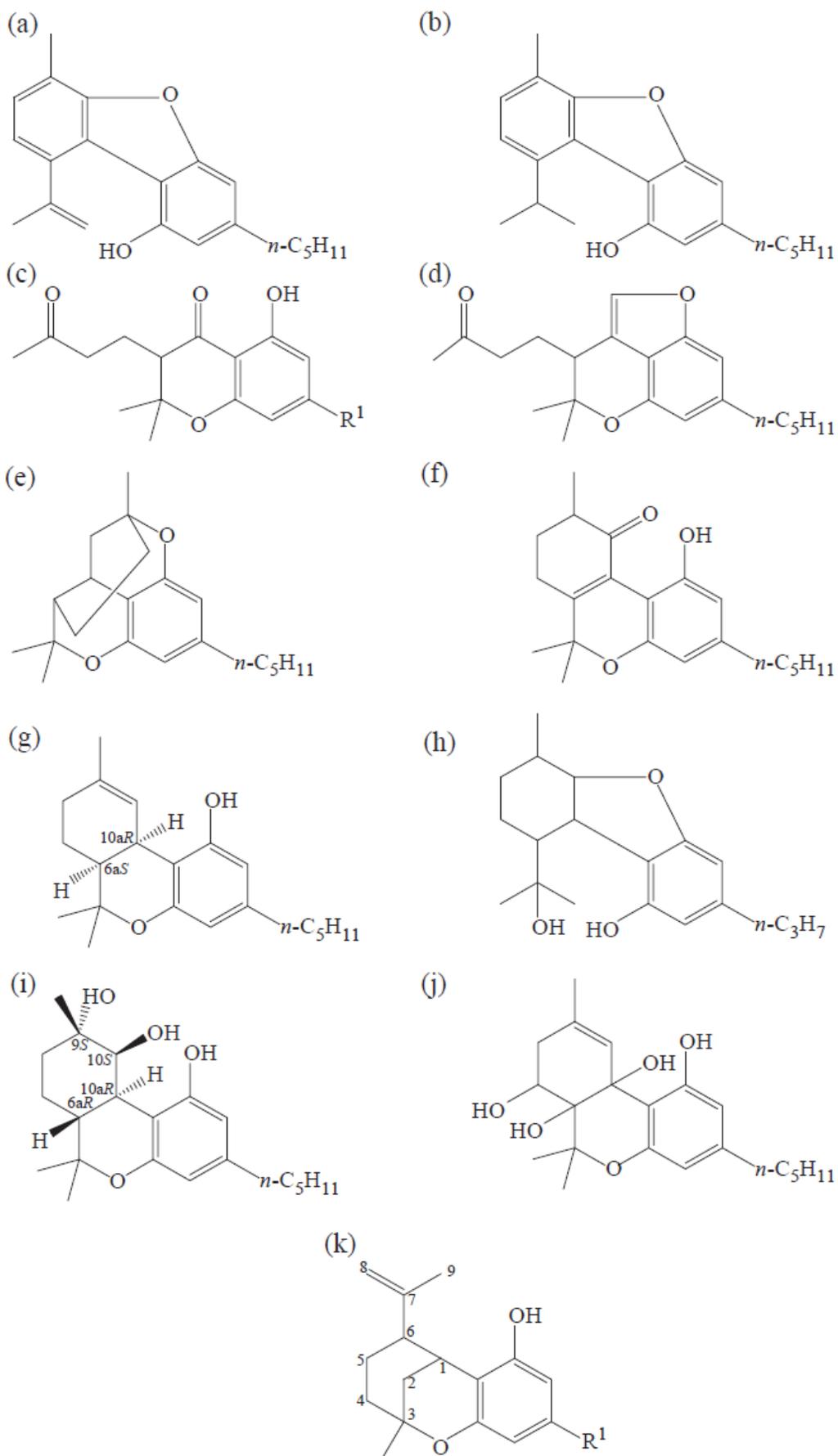


CBT-type cannabinoids				
Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
(-)- <i>trans</i> -Cannabitriol [(-)- <i>trans</i> -CBT-C <sub>5</sub> ]	H	H	OH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(+)- <i>trans</i> -Cannabitriol [(+)- <i>trans</i> -CBT-C <sub>5</sub> ]	H	H	OH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(±)- <i>cis</i> -Cannabitriol [(±)- <i>cis</i> -CBT-C <sub>5</sub> ]	H	H	OH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
(±)- <i>trans</i> -Cannabitriol-C <sub>3</sub> [(±)- <i>trans</i> -CBT-C <sub>3</sub> ]	H	H	OH	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
CBT-C <sub>3</sub> -homologue (unknown stereochemistry)	H	H	OH	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
(-)- <i>trans</i> -10-Ethoxy-9-hydroxy-Δ <sup>6a(10a)</sup> -tetrahydrocannabinol [(-)- <i>trans</i> -CBT-OEt-C <sub>5</sub> ]	H	H	OEt	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
<i>trans</i> -10-Ethoxy-9-hydroxy-Δ <sup>6a(10a)</sup> -tetrahydrocannabivarin-C <sub>3</sub> [ <i>trans</i> -CBT-OEt-C <sub>3</sub> ]	H	H	OEt	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
8,9-Dihydroxy-Δ <sup>6a(10a)</sup> -tetrahydrocannabinol [8,9-Di-OH-CBT-C <sub>5</sub> ]	OH	H	H	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
Cannabidiolic acid tetrahydrocannabitriol ester (CBDA-C <sub>5</sub> 9-OH-CBT-C <sub>5</sub> ester)	H	CBDA-C <sub>5</sub> ester	OH	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>

Figura 19

- Cannabinoidi eterogenei (14derivati) (vedi Figura 20). Il deidrocanbifurano (DCBF-C5), il cannabifurano (CBF-C5), il cannabicromanone (CBCN-C5) e il 10-oso-Δ6a(10a)-tetraidrocannabinolo (OTHC) vennero isolati nel 1975 e seguiti dall'isolamento del cannabicromanone-C3 (CBCN-C3) e cannabicumaronone-C5 (CBCON-C5), anche se la configurazione assoluta di questi composti rimane sconosciuta. Il cannabicitrano (CBT-C5) venne sintetizzato e nominato cannabis-citrilidene e isolato dall'hashish libanese, ma la configurazione del cannabicitrano è sconosciuta. Il (-)-Δ9-cis-(6aS,10aR)-Tetraidrocannabinolo [(-)-cis-Δ9-THC-C5], l'isomero cis del D9-THC, è stato rinvenuto in campioni di marijuana come uno dei maggiori contaminanti semplici. La forma (+)-enantiomero e la miscela racemica dell'isomero cis non è stata ancora isolata. Il cannabiglendolo-C3 (8-idrossi-isoesaidrocanbivarina o OH-iso-HHCV-C3) venne isolata da una variante di cannabis indiana cresciuta nel Mississippi e identificata tramite spettrometro e comparazione con il C5 omologo sintetico. Il (-)-cannabiripsolo-C5 [(-)-CBR-C5] venne isolato da una variante di cannabis del Sud Africa da Boeren e altri nel 1979 e dall'analisi spettrometrica si evinse che il composto isolato poteva essere il diidro-derivato

del 9,10-diidrossi- $\Delta$ 6a(10a)-tetraidrocannabinolo. I centri chirali identificati sono 4, quindi sono possibili 16 stereoisomeri, ma partendo dal fatto che la stereochimica al C6 e C10 è la stessa del  $\Delta$ 9 THC, si deduce che in realtà sono presenti 4 stereoisomeri. La sintesi di questi 4 isomeri dimostrò che il cannabiripsolo-C5 è infatti (-)-(6aR,9S,10S,10aR)-9,10-diidrossiesaidrocannabinolo. Sono presenti due composti cannabiripsolo-C5 [CAS 99623-72-0] e cannabiripsolo-C3 [CAS 99623-73-1] nella letteratura, che però creano confusione in quanto sono frutto di un errore nella determinazione delle strutture<sup>26</sup>. Questa struttura dovrebbe avere un doppio legame tra C6 e C10, facendo quindi diventare il composto un 9,10-diidrossi- $\Delta$ 6a(10a)-tetraidrocannabinolo e non un cannabiripsolo. Il (-)-cannabitetrolo [(-)-6a,7,10a-triidrossi-D9-tetraidrocannabinolo] venne identificato da ElSohly et altri nel 1984 che riportò l'attività ottica pari a  $[\alpha]_{D=}$  -51, la configurazione assoluta del composto è invece ancora sconosciuta. E' stato poi riportato nelle bibliografia un ultimo cannabinoide eterogeneo chiamato (T)-D7-cis-isotetraidrocannabivarina-C3. L'analisi tramite NMR e tramite il modello di Dreiding suggerisce che i C1 e C6 hanno una configurazione cis. Questo potrebbe indicare una configurazione 1,2-cis-(1R,3R,6S). L'analisi GC-MS dell'olio di hashish portò all'identificazione del(-)- $\Delta$ 7-trans-(1R,3R,6R)-isotetraidrocannabivarina-C3 e (-)-D7-trans-(1R,3R,6R)-isotetraidrocannabinolo-C5;



Miscellaneous-type cannabinoids

Compound	Fig. 12	R <sup>1</sup>
Dehydrocannabifuran (DCBF-C <sub>5</sub> )	(a)	–
Cannabifuran (CBF-C <sub>5</sub> )	(b)	–
Cannabichromanone (CBCN-C <sub>5</sub> )	(c)	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
Cannabichromanone-C <sub>3</sub> (CBCN-C <sub>3</sub> )	(c)	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Cannabicooumaronone-C <sub>5</sub> (CBCON-C <sub>5</sub> )	(d)	–
Cannabicitran (CBT-C <sub>5</sub> )	(e)	–
10-Oxo-Δ <sup>6a(10a)</sup> -Tetrahydrocannabinol (O THC)	(f)	–
(–)-Δ <sup>9</sup> -(6a <i>S</i> ,10a <i>R-cis</i> )-Tetrahydrocannabinol [(–)- <i>cis</i> -Δ <sup>9</sup> -THC-C <sub>5</sub> ]	(g)	–
Cannabiglendol-C <sub>3</sub> (OH- <i>iso</i> -HHCV-C <sub>3</sub> )	(h)	–
(–)-(6a <i>R</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,10a <i>R</i> )-9,10-Dihydroxyhexa- hydrocannabinol [(–)-Cannabiripsol-C <sub>5</sub> ]	(i)	–
(–)-6a,7,10a-Trihydroxy-Δ <sup>9</sup> -tetrahydrocannabinol [(–)-Cannabitetrol]	(j)	–
(±)-Δ <sup>7</sup> - <i>cis</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>S</i> )-Isotetrahydrocannabivarin-C <sub>3</sub>	(k)	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
(–)-Δ <sup>7</sup> - <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-Isotetrahydrocannabivarin-C <sub>3</sub>	(k)	<i>n</i> -C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
(–)-Δ <sup>7</sup> - <i>trans</i> -(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-Isotetrahydrocannabinol-C <sub>5</sub>	(k)	<i>n</i> -C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>

Figura 20

- **Costituenti non cannabinoidi:**

- **Terpeni:** La pianta di cannabis sativa contiene 140 tipi differenti di terpenoidi. Essi sono costituiti da sub-unità di isoprene (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) e possono andare a formare monoterpeni (C<sub>10</sub>), sesquiterpeni (C<sub>15</sub>), diterpeni (C<sub>20</sub>) e triterpeni (C<sub>30</sub>). I terpeni possono essere idrocarburi aciclici, monociclici o policiclici con sostituenti come alcoli, eteri, aldeidi, chetoni e esteri. L'olio essenziale può essere ottenuto tramite distillazione in corrente di vapore. La quantità di terpeni dipende dal tipo di campione (fibre, droga), dall'impollinazione, dal sesso, età e parte della pianta, coltivazione (indoor o outdoor), condizione, umidità e dal deposito post raccolto<sup>22</sup>. Per esempio le gemme fresche che provengono dalla varietà afgana contengono una quantità di olio pari al 0.29%. Dopo il trattamento per essiccazione e deposito il contenuto si è ridotto, dopo una settimana al 0.20% dopo 3 mesi al 0.13%. I monoterpeni vengono persi di più rispetto ai sesquiterpeni, ma non sono i terpeni che si perdono di più in assoluto nel processo di essiccazione. Da una coltivazione outdoor si possono ottenere 1,3 L per tonnellata, mentre da quella indoor se ne ottiene 1L per tonnellata. La quantità di olio in cannabis non impollinata è pari a 18L/ha, che è più del doppio della quantità che si può ottenere dalla cannabis impollinata (8L/ha). Tramite

l'analisi GC/MS di gemme fresche di cannabis coltivata *indoor* si sono individuati 68 componenti, di questi 57 sono stati identificati: il 92% sono monoterpeni, tra questi si hanno mircene (67%) e limonene (16%), il 7% sesquiterpeni e 1% altro (chetoni, esteri). Invece per quanto riguarda il contenuto di terpeni all'interno dell'olio essenziale di cannabis coltivata *outdoor* si avrà che la concentrazione dei monoterpeni varia dal 47.9% al 92.1%, e tra questi si hanno  $\beta$ -mircene, *trans*-cariofillene,  $\alpha$ -pinene, *trans*-ocimene e  $\alpha$ -terpinolene, i sesquiterpeni variano dal 5.2% al 48.6%. Gli estratti di cannabis provenienti da piante con elevato contenuto di principi attivi conterranno una quantità di cariofillene ossidato minore rispetto alle piante coltivate per un utilizzo da fibra. Negli olii essenziali di 5 tipi diversi di cannabis europea i terpeni principali sono: mircene (21.1–35.0%),  $\alpha$ -pinene (7.2–14.6%),  $\alpha$ -terpinolene (7.0–16.6%), *trans*-cariofillene (12.2.–18.9%) e  $\alpha$ -humulene (6.1–8.7%). Altri terpeni presenti solo in tracce sono sabinene,  $\alpha$ -terpinene, 1,8-cineole (eucaliptolo), pulegone,  $\gamma$ -terpinene, terpineol-4-ol, bornil acetato,  $\alpha$ -copaene, alloaromadendrene, viridiflorene,  $\beta$ -bisabolene,  $\gamma$ -cadinene, *trans*- $\beta$ -farnesene, *trans*-nerolidolo,  $\beta$ -bisabololo. I terpeni contenuti all'interno della pianta di cannabis sativa sono in grado di modulare l'attività del recettore del THC o modularne la farmacocinetica<sup>27</sup>. L'attività antinfiammatoria e antibiotica dei terpeni è conosciuta e sfruttata da tempo, infatti il  $\beta$ -Myrcene, il più abbondante monoterpene nella cannabis, ha delle proprietà analgesiche, antiinfiammatorie, antibiotiche e antimutageniche. Il  $\beta$ -cariofillene, il più comune sesquiterpene, presenta un'attività anti-infiammatoria, citoprotettiva (mucosa gastrica) e antimalarica<sup>28</sup>;

- *Idrocarburi*: I 50 idrocarburi contenuti all'interno della cannabis sono n-alcani con catene che vanno da C9 a C39 con gruppi laterali 2 metiliche, 3metiliche e alcuni alcani dimetilici. Gli alcani presenti in concentrazione abbondante sono: eptacosani, 2,6-dimetiltetradecano, pentacosano, escosano ed entriacontano. L'alcano ottenuto in quantità maggiore dalla distillazione in corrente di vapore da olio essenziale è l'alcano nonacosano e l'n-C29 (10.7% e 55.8%);

---

<sup>27</sup> Meschler, *Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses*, 1999.

<sup>28</sup> McPartland, *Cannabis and cannabis extracts: greater than the sum of their parts?*, 2001.

- Composti azotati: I composti azotati contenuti all'interno della cannabis sativa sono 70, tra questi sono stati identificati:
  - due tipi di alcaloidi del genere spermidine;
  - coline basiche, trigonelline, muscarine isoleucine betoine e neurine;
  - 8 composti ammidici tra cui abbiamo l'N-trans feniloiltiramina, N-p-cumaroiltiramina, N-transcalfeoltiramina;
  - 5 derivati lignanamidi tra cui i più importanti sono la cannabisina A,B,C e D;
  - 20 amine semplici, tra cui si possono avere piperidine, ordenine, metil amine etilamine e pirrolidine;
  - 3 proteine edestina, zeatina e zeatidilnucleoside;
  - 6 enzimi che sono: adesinasi, glicosidasi, polifenolossidasi, peptidasi, perossidasi e adenosina-5fosfatasi.
  
- Carboidrati: I carboidrati presenti all'interno della pianta cannabis sativa sono per lo più zuccheri semplici e possono essere:
  - monosaccaridi, come fruttosio, galattosio, arabinosio, glucosio, mannosio e ramnosio;
  - disaccaridi, come sucrosio e maltosio;
  - polisaccaridi, come raffiniosio, cellulosa, emicellulosa, pectine e xilano.

In più si possono avere mannitolo, sorbitolo glicerolo inositolo e due aminozuccheri (glucosamina e galattosamina)
  
- Flavonoidi: Sono stati identificati 23 flavonoidi semplici, presenti sottoforma di C o O glicosidi del genere flavoni e flavonoli, agliconi come apigenina, luteolina, quercitina e chemferolo. L'orientina, la vitexina, la luteolina 7-O-glucoside e la apigenina 7-O-glucoside sono i flavonoidi presenti in maggior quantità all'interno di varietà di cannabis, dotate di basse concentrazioni di THC. Le cannflavina A e B sono invece presenti in tutte le specie di cannabis. L' apigenina, un flavonoide trovato in quasi tutte le piante, è caratterizzata da una elevata affinità per i recettori delle benzodiazepine, esprimendo quindi un'attività ansiolitica;
  
- Acidi grassi: All'interno dell'olio dei semi sono presenti 33 tipi differenti di acidi grassi principalmente insaturi, tra questi si hanno: l'acido linoleico, presenti in quantità intorno al 53-60%, l'acido  $\alpha$  linolenico, l'acido  $\gamma$  linolenico, l'acido stearidanoico, l'acido eicosanoico e l'acido cis-valenico. Tra gli acidi

grassi saturi invece si hanno: l'acido palmitico(6-9%), l'acido stearico (2-3.5%), l'acido arachidonico (1-3%), l'acido miristico, l'acido lignoceric, l'acido eptanoico e l'acido isoarachidonico. Non vi è una variazione significativa dello spettro degli acidi grassi all'interno delle diverse varietà di cannabis contenenti diverse quantità di THC;

- Fenoli: Sono conosciuti 34 tipi di fenoli: 9 caratterizzati da una struttura spiroindanica (cannabispirano, isocannabispirano), 9 diidrostilbenica (cannabistilbene I, cannaistilbene II), 3 diidrofenantrenica (cannitrene I e cannitrene II), eter metilfenolica e di glicosidi fenolici (glucoside floroglucinolo).
- Alcoli semplici, aldeidi, chetoni, esteri e lattoni : sono presenti:
  - o 7 alcoli ( tra i quali sono presenti metanolo, etanolo);
  - o 12 aldeidi (tra i quali sono presenti acetaldeide, isobutaldeide, pentenale);
  - o 13 chetoni (tra i quali sono presenti 2eptanone, acetone, 2-metil2epto-6one);
  - o 21 acidi (tra i quali sono presenti acido arabinico, acido azealico, acido gluconico).
- Altri: In questa categoria sono compresi 11 fitosteroli tra i quali sono presenti il campesterolo, ergosterolo,  $\beta$  sitosterolo e stigmasterolo. L'unica vitamina è quella K, mentre tra i pigmenti abbiamo carotene e xantofilla. Infine gli elementi presenti sono: Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn e Hg.

### 3.3. Farmacocinetica e metabolismo

La farmacocinetica, che viene definita come la relazione che esiste fra diverse concentrazioni di un farmaco all'interno dell'organismo durante e nel periodo successivo alla somministrazione, e il metabolismo (dal greco μεταβολή = cambiamento), l'insieme delle reazioni chimiche che avvengono nell'organismo con lo scopo di detossificare le sostanze esogene, sono di fondamentale importanza per l'individuazione e la stesura di possibili piani terapeutici . Il metabolismo implica due tipi di reazioni chimiche<sup>29</sup>:

- Reazioni di fase I, con attività catabolica, si basano sul sistema P450 monossigenasi. Esse permettono l'ossidazione dei farmaci tramite la formazione di un ciclo catalitico che richiede ossigeno molecolare, NADPH e NADPH-P450

---

<sup>29</sup> Rang, *Farmacologia*, 2009.

riduttasi, l'enzima P450 e il substrato e che permette il passaggio dell'atomo di ossigeno al farmaco con formazione di un gruppo idrossilico e acqua;

- Reazioni di fase II, con attività anabolica, comprendono la coniugazione, che di norma dà luogo a prodotti inattivi. Affinchè queste reazioni avvengano, è necessario che nel farmaco sia presente un gruppo adatto (es: idrossilico, tiolico, amminico ecc), oppure venga introdotto tramite le reazioni di fase I. Così tale gruppo sarà suscettibile di una reazione di coniugazione, per esempio il legame con un gruppo costituente. I coniugati più comuni sono quelli che derivano dall'introduzione di un gruppo glucuronato, solfato, metilico, acetato, oppure glicina.

E' importante comprendere la farmacocinetica dei cannabinoidi e la loro disposizione nei fluidi biologici e tessuti, sia per la loro utilità terapeutica, sia perché è una delle sostanze d'abuso più antiche e più comunemente usate nel mondo, e il suo utilizzo può avere conseguenze in termini di tossicità, di patologie e di alterazioni comportamentali. Le vie di somministrazione dei cannabinoidi con attività terapeutica possono esser<sup>30</sup>:

- via inalatoria, quindi per assorbimento polmonare, il picco ematico si ha entro 3-10 minuti. In questo caso la biodisponibilità dipende dalla durata dell'aspirazione, dall'intensità dell'aspirazione e dalla quantità di tempo in cui si trattiene all'interno dei polmoni l'inalato;
- via orale, il picco ematico si avrà nel giro di un 1-2 ore, ma in alcuni casi può essere ulteriormente ritardato in seguito ad un assorbimento più lento. La biodisponibilità si attesta intorno al 10-14% per quanto riguarda il THC e lievemente inferiore per il cannabidiolo e il cannabinolo. Glicolato e olio di sesamo migliorano la biodisponibilità orale di THC, tuttavia vi è una notevole variabilità nelle concentrazioni di picco e nei dati di assorbimento, anche quando il farmaco è somministrato nello stesso veicolo. È interessante notare che sono stati osservati frequentemente due picchi di THC a causa della circolazione enteroepatica;
- via rettale, Brenneisen e altri hanno valutato le concentrazioni di THC nel plasma in due pazienti ai quali sono stati prescritte supposte di THC emisuccinato e Marinolo per disturbi spastici. In questi tests<sup>31</sup> la somministrazione di 2,5-5 mg di THC ha prodotto concentrazioni plasmatiche

---

<sup>30</sup> Pertwee, *Cannabinoids*, 2004.

<sup>31</sup> Brenneisen, *The effect of orally and rectally administered delta-9-tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients*, 1996.

massime di 1,1-4,1 ng / ml e il picco ematico si è raggiunto entro 1-8 ore. La biodisponibilità della via rettale è risultata essere approssimativamente il doppio di quella della via orale, a causa di un maggior assorbimento e di un inferiore metabolismo di primo passaggio;

- via sublinguale e via topica, sono vie che possono essere utilizzate per evitare il metabolismo di primo passaggio epatico. I metodi di somministrazione per queste vie sono ancora in fase di sperimentazione e si sta cercando un mezzo per aumentare la biodisponibilità.

I cannabinoidi principali su cui si sono concentrati gli studi farmacocinetici e metabolici sono tre: il  $\Delta^9$ -trans-tetraidrocannabinolo, il cannabinolo(CBN) e il cannabidiolo(CBD). Il  $\Delta^9$ -trans-tetraidrocannabinolo ( $\Delta^9$ -THC) può essere assunto principalmente per inalazione dalla combustione della sigaretta, o per vaporizzazione e per via orale. Nel primo caso (per inalazione) il 30% del THC viene distrutto per pirolisi; questo processo non avviene nel caso si utilizzi un vaporizzatore, la cui biodisponibilità sistemica è del 23-27% nei consumatori abituali e del 10-14% nei consumatori occasionali. E' ormai un dato inoppugnabile che l'assunzione di cannabis tramite la sigaretta comporti la formazione di carcinomi a livello polmonare. Nel caso dell'assunzione per via orale invece, a causa dell'elevato metabolismo epatico, la biodisponibilità si riduce tra il 4 e il 12 %<sup>32</sup>. Una volta assunto, essendo caratterizzato da un'elevata lipofilia, viene distribuito tramite il sangue ai tessuti altamente perfusi come il cuore, il fegato, i polmoni, la milza e il cervello. Proprio a livello epatico il  $\Delta^9$ -THC è metabolizzato ad opera del complesso di enzimi CYP 450 , che catalizzano reazioni di FASE I; queste includono idrossilazioni alliliche ed alifatiche, ossidazioni di alcoli a chetoni e acidi, beta-ossidazioni e degradazioni della catena laterale pentilica e reazioni di FASE II, prevedendo la coniugazione con l'acido glucuronico<sup>33</sup>. Tra le reazioni di FASE I si ha l'idrossilazione del THC al C9 ad opera del citocromo P450 2C9 con la formazione del metabolita 11-OH-THC, che è ritenuto il vero composto psicoattivo e la reazione di catalizzazione da parte del citocromo P450 3A4 con la formazione di 8- $\beta$ -OH-THC, dell'esoidrocannabinolo epossidico e di altri metaboliti minori. E' d'uopo sottolineare però che sono stati identificati più di 100 metaboliti del THC, compresi derivati di-e tri-idrossilici, chetoni, aldeidi e acidi carbossilici. La successiva ossidazione dell'11-OH-

---

<sup>32</sup> Grotenhermen ,*Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids*, 2003.

<sup>33</sup> Priyamvada Sharma, *Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications*, 2012.

THC produce il metabolita inattivo 11-nor-9-carbossi- $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THCCOOH) (vedi Figura 21). Il THCCOOH e il suo coniugato glucuronide sono i principali prodotti finali di bio-trasformazione in molte specie, compreso l'uomo. Il metabolismo di fase II di THCCOOH comporta l'aggiunta sul C11 o sull'idrossile del fenolo di acido glucuronico e meno comunemente, solfato, glutazione, amminoacidi e acidi grassi. È anche possibile avere due parti di acido glucuronico collegati a THCCOOH, sebbene l'impedimento sterico del gruppo idrossilico fenolico potrebbe essere un fattore di inibizione. L'aggiunta del gruppo glucuronide migliora la solubilità in acqua facilitando l'escrezione renale, ma la clearance di questi metaboliti polari è bassa a causa di un esteso legame proteico.

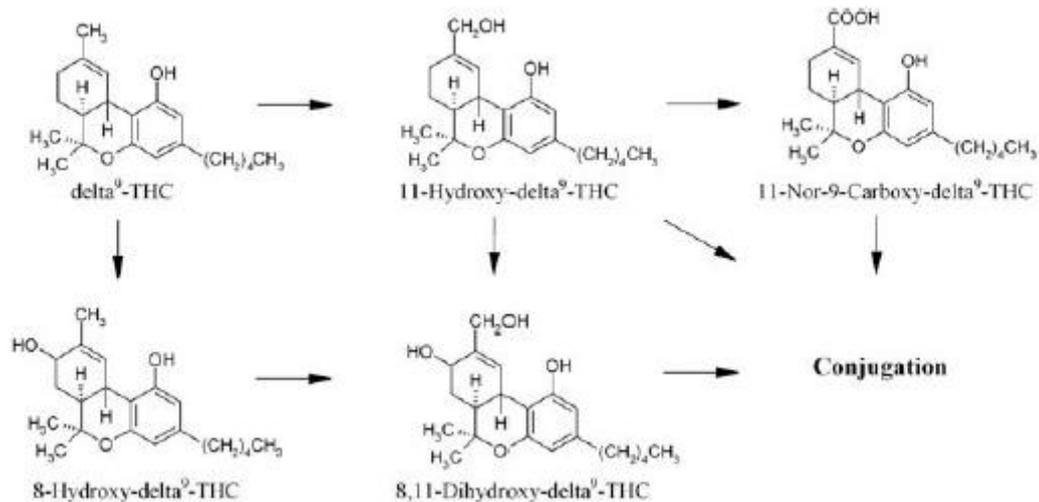


Figura 21

Altri tessuti possono contribuire al metabolismo di THC, in quanto i sistemi del citocromo P450 si possono trovare principalmente nel fegato, nell'intestino tenue, nel sangue periferico, nel midollo osseo e nei mastociti, nonché in minori concentrazioni nel cervello, nel pancreas, nella cistifellea, nella vescica, nei reni, nella pelle, nelle ghiandole salivari, e nei testicoli. Nel cervello le concentrazioni più elevate degli enzimi citocromo P450 sono state trovate nel tronco cerebrale e cervelletto, dove avviene l'idrossilazione del C4 del pentile, ottenendo dei metaboliti farmacologicamente attivi ma la cui attività è ancora in fase di studio. Nel tratto gastrointestinale gli enzimi (esterasi non specifiche,  $\beta$ -glucuronidasi e solfatasi) idrolizzano il THC. Invece nel polmone interviene un enzima che idrolizza la catena laterale del THC. Si è certi della attività di un sito metabolico extraepatico quando la

clearance corporea totale supera il flusso di sangue al fegato, o se la clearance metabolica non varia in seguito a disfunzione epatica. La distribuzione nei vari organi e nei distretti periferici (tessuto adiposo), insieme al metabolismo a 11-OH-THC, THCCOOH e altri analiti provocano un rapido abbassamento delle concentrazioni di THC nel plasma. La percentuale di rimozione media dal plasma è stata riportata essere 11,8 +/- 3 L/h per donna e 14,9 +/- 3,7 L/h per uomo. Si può fare una distinzione poi tra consumatori occasionali e abituali: 36L/h per i primi e 60L/h per i secondi. Il lento rilascio di THC dai tessuti lipidici e la significativa circolazione enteroepatica contribuiscono alla lunga emivita nel plasma del THC, segnalato come più grande di 4,1 giorni nei consumatori cronici di cannabis. Si è infatti constatato che l'emivita aumenta con la frequenza di utilizzo: quindi in consumatori occasionali sarà mediamente di 1,3 giorni, in consumatori abituali sarà tra i 5 e i 13 giorni. Il suo metabolita THC-COOH è rintracciabile nel siero dalle 3,5 alle 74,3 ore dopo l'assunzione. A causa dell'elevata lipofilia il THC subisce un alto riassorbimento a livello tubulare, che comporta una bassa escrezione renale di droga non modificata e, in più, è in grado di attraversare rapidamente la placenta e di concentrarsi nel latte materno.

Il cannabidiolo (CBD) è un costituente naturale della cannabis sativa; possiede elevate potenzialità farmacologiche ed è in fase di studio per diverse applicazioni terapeutiche. E' stato infatti segnalato per l'attività neuroprotettiva, analgesica, sedativa, antiemetica e anti-infiammatoria. Inoltre è stato riportato che CBD blocca l'attività ansiogena del THC ed è utile nel trattamento di malattie autoimmuni. Già queste potenziali applicazioni terapeutiche giustificherebbero gli studi sul CBD; in più un aspetto importante da risolvere è la capacità del CBD di alterare la farmacocinetica del THC, come si è evinto da alcuni dati<sup>34</sup>. Il metabolismo del cannabidiolo è simile a quello del THC, con una ossidazione primaria del C9 a frazioni idrossiliche e a derivati di acidi carbossilici e un'ossidazione della catena laterale. Come THC, CBD è sottoposto ad un significativo metabolismo di primo passaggio, anche se, a differenza del THC, una gran parte della dose viene escreta immodificata nelle feci. E' stato riscontrato che CBD in vitro funge da inibitore degli enzimi epatici microsomiali farmaco-metabolizzanti e inibisce il metabolismo dell' esobarbital nell'uomo. Alcuni studi hanno riferito che CBD sia in grado di inibire selettivamente la formazione del metabolita THC in vitro<sup>34</sup> ; altri invece sono solo in grado di rallentare il metabolismo di 11-OH-THC a

---

<sup>34</sup> McArdle, *Selective inhibition of delta-9-tetrahydrocannabinol metabolite formation by cannabidiol in vitro*, 2001.

THCCOOH<sup>35</sup>. Comunque la co-somministrazione di CBD non influenza significativamente la clearance totale (volume di plasma contenente la quantità di sostanza che viene rimossa dal corpo nell'unità di tempo), il volume di distribuzione e l'emivita di eliminazione dei metaboliti del THC. La biodisponibilità del CBD, seguendo la via di assorbimento polmonare, è in media del 31% (range tra l'11% e il 45%) rispetto al farmaco somministrato per via endovenosa<sup>30</sup>. In alcuni studi in cui è stata effettuata una somministrazione di estratti di cannabis (dove la quantità di THC e CBD era equivalente) per via sublinguale, si sono osservate concentrazioni plasmatiche inferiori del CBD rispetto al THC e un diverso tempo di massima concentrazione .

E' stata comunque osservata una levata variabilità da paziente a paziente<sup>36</sup>. Il cannabinolo (CBN) è un costituente naturale della cannabis sativa con un'attività pari al 10% di quella del THC. Il metabolismo di CBN è simile a quello del THC con l'idrossilazione del C9 si ottiene il metabolita primario, ma poiché è costituito da un anello aggiuntivo aromatico, viene metabolizzato meno ampiamente e più lentamente del THC. La biodisponibilità media di una dose di CBN affumicato, cioè assunto via inalatoria, è del 41% con un range tra l'8% e il 77%.

Il 65% dei composti assunti dalla somministrazione di cannabis sono escreti tramite le feci, il 20% tramite le urine e la maggior parte di essi (80-90% dei metaboliti)<sup>37</sup> è escreto entro 5 giorni sottoforma di idrossilati e carbossilati<sup>38</sup>. Nelle urine sono stati trovati 18 metaboliti acidi della cannabis e la maggior parte è coniugata con l'acido glucuronico, che incrementa la solubilità in H<sub>2</sub>O. Il metabolita maggiore ritrovato nelle urine è il THC-COOH, coniugato con il glucuronide, e la cui emivita è di 30 ore dopo 7 giorni e di 44-60 ore dopo 12 giorni di monitoraggio. Nelle feci invece è l'11-OH-THC.

---

<sup>35</sup> Hunt, *Evidence that cannabidiol does not significantly alter the pharmacokinetics of tetrahydrocannabinol in man*, 1981.

<sup>36</sup> Guy, *A phase I, double blind, three-way crossover study to assess the pharmacokinetic profile of cannabis based medicine extract (CBME) administered sublingually in variant cannabinoid ratios in normal healthy male volunteers (GWPK0215)*, 2004.

<sup>37</sup> Nahas, *Marihuana and Medicine*, 1999.

<sup>38</sup> Wall, *Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women*, 1983.

### 3.4. Tossicologia

La cannabis è nota da molto tempo per gli effetti fisiologici e sul comportamento. A livello comportamentale l'utilizzo di cannabis può comprendere sensazione di euforia, rilassamento, alterata percezione del tempo, mancanza di concentrazione e difficoltà di apprendimento. A livello fisiologico invece gli effetti includono rapidi cambiamenti nella frequenza cardiaca e nella pressione sanguigna diastolica, riduzione della soffusione congiuntivale, secchezza della bocca e della gola, aumento dell'appetito, vasodilatazione e diminuzione della frequenza respiratoria, il che comporta in caso di abuso danni polmonari e alterazione dell'EEG. Sintomi come irritabilità, ansia, desiderio e sonno disturbato sono stati segnalati nel 61-96% dei consumatori di cannabis durante l'astinenza. L'utilizzo cronico di cannabis può portare ad una dipendenza ed è associato a una vasta gamma di disturbi psichiatrici. Anche se non vi è una chiara relazione tra l'uso di cannabis e psicosi vi è una forte evidenza che l'uso di cannabis può precipitare la schizofrenia o esacerbare i sintomi; può anche aggravare i sintomi della psicosi. L'uso di cannabis (30-50mg per via orale e di 8-30 mg affumicato) può causare una particolare psicosi mania-simile e più in generale agire come agente degenerante in pazienti affetti da disturbi bipolari. Si è notato che in molti paesi sviluppati, le persone con gravi disturbi mentali sono più propensi all'abuso e alla dipendenza da sostanze psicoattive, in particolare di cannabis, rispetto alla popolazione generale<sup>33</sup>. La capacità di apprendimento e la memoria sono gravemente influenzate dall'uso acuto della cannabis. Per esempio è stato ripetutamente riferito che l'intossicazione acuta da cannabis provochi forti cambiamenti nello stato mentale soggettivo, con effetti negativi sul rendimento neuropsicologico quale l'apprendimento portando ad una diminuita attenzione e ad una riduzione dell'attenzione e della memoria di lavoro. Negli studi che indagano gli effetti acuti tra i consumatori non pesanti, dosaggi più elevati di tetraidrocannabinolo (THC) sono stati associati a deficit in compiti di pianificazione e di controllo degli impulsi con effetti persistenti per quattro settimane dall'uso. Confrontati con individui astinenti, i consumatori di cannabis mostrano deficit nelle abilità verbali, nel riconoscimento visivo, un ritardo nel richiamo visivo e nei compiti di memoria prospettica a breve e a lungo termine. Il deficit cognitivo associato all'uso di cannabis è risultato essere reversibile e in correlazione all'esposizione recente alla sostanza, anche se il consumo a lungo termine (per più di 15 anni) è stato dimostrato essere causa di una lieve e permanente compromissione del rendimento cognitivo, principalmente nella capacità di conservare nuove informazioni. Dal punto di

vista tossicologico e le evidenze in letteratura indicano che l'esposizione ai fitocannabinoidi può alterare la sequenza di eventi prevista per lo sviluppo dei neurotrasmettitori e può incidere negativamente sulla sopravvivenza e sulla maturazione delle cellule nervose. Numerosi studi mostrano che i fitocannabinoidi possono indurre diversi gradi di danno alle cellule del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Recenti scoperte hanno infatti rivelato che proprio il  $\Delta 9$ -THC induce la morte cellulare con frammentazione del DNA nell'ippocampo. Le aree dell'encefalo primariamente coinvolte nel funzionamento cognitivo includono la corteccia frontale, l'ippocampo e il cervelletto ed è stato dimostrato che l'uso di cannabis altera il funzionamento di queste aree cerebrali ricche di recettori cannabinoidi<sup>39</sup>. Gli effetti dell'uso di cannabis sulla fertilità sono incerti, infatti in alcuni casi è stato evidenziato un abbassamento del livello del testosterone e della produzione di spermatozoi, in altri il contrario; si è dedotto quindi che l'utilizzo potrebbe avere un effetto inibitore con complicazioni riproduttive soprattutto in persone a rischio infertilità<sup>40</sup>. I maggiori rischi di tossicità cronica sono legati al fumo e riguardano l'apparato cardio-circolatorio, principalmente in soggetti ipertesi affetti da patologia cerebro-vascolare o da arteriosclerosi coronarica, e respiratorio. Essi potrebbero essere evitati in terapia tramite l'assunzione per via orale.

### 3.5. Recettori dei Cannabinoidi

Una volta all'interno del nostro organismo i cannabinoidi vanno ad interagire su specifici recettori di membrana: il CB1, clonato negli USA da Tom Bonner nel 1990 e presente principalmente nel SNC, e il CB2, clonato da Sean Munro nel Regno Unito nel 1993 e trovato nelle cellule immunitarie e nei tessuti. I recettori **CB1** sono stati trovati in molti mammiferi compreso l'uomo tramite tecniche di autoradiografia e di mappatura immunoistochimica. Essi compaiono durante i primi stadi dello sviluppo cerebrale<sup>41</sup> e sono localizzati nelle aree di materia bianca, cioè aree composte dagli assoni dei neuroni e nelle zone di proliferazione cellulare<sup>42</sup>. Con lo sviluppo le più alte concentrazioni di recettori si trovano nella corteccia cerebrale, in particolare nei gangli

---

<sup>39</sup> Herkenham, *Cannabinoid receptor localization in brain*, 1990.

<sup>40</sup> Porter, *Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 2011.

<sup>41</sup> Begbie, *Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo*, 2004.

<sup>42</sup> Berrendero, *Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period*, 1999.

basali, nel cervelletto e nel prosencefalo limbico (ipotalamo, ippocampo e cingolo anteriore) e sono relativamente assenti nei nuclei del tronco cerebrale. I recettori CB1 sono scarsamente correlati con la distribuzione dell'anandamide, infatti mentre il FAAH, suo enzima degradativo, si trova principalmente a livello postsinaptico, i recettori CB1 si trovano presinapticamente; questa distribuzione anatomica ben si correla con il ruolo attribuito recentemente agli endocannabinoidi di messaggeri sinaptici retrogradi. I recettori **CB2** invece sono distribuiti a livello periferico dove si accumulano principalmente nelle cellule B, nei macrofagi maturi, nelle tonsille, nella milza e in altre cellule appartenenti al sistema immunitario. Essi sono dotati della stessa attività dei CB1, ma non sono in grado di modulare i canali ionici.

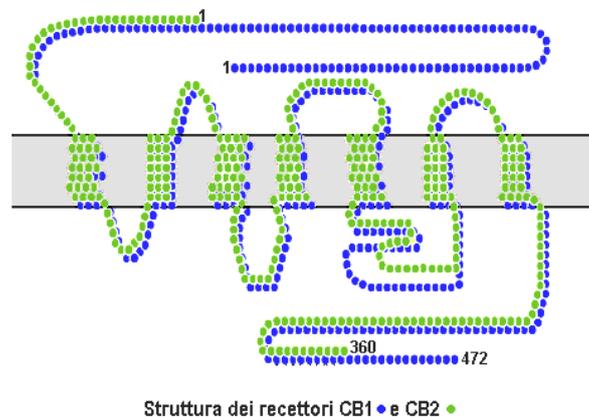


Figura 22

I cannabinoidi legandosi con i recettori CB1/CB2 possono modulare positivamente o negativamente la cascata in base al legame con Gi, o con Gs. Le proteine G sono costituite da tre subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Le  $\beta$  e  $\gamma$  sono associate in un unico complesso, le  $\alpha$  invece sono dotate di attività enzimatica tramite il legame con GDP. La modulazione predominante è quella negativa, in quanto quella positiva è legata all'interazione eterodimerica tra il recettore CB1 e il recettore dopaminico D2. La proteina Gi, attivata dai cannabinoidi, inibisce l'adenilato ciclasi provocando un abbassamento della concentrazione di AMPc, stimola l'apertura dei canali del potassio di tipo-A interni, la chiusura dei canali del calcio di tipo N,P e Q (vedi Figura 23) e dei canali del potassio di tipo D. In aggiunta ci sono studi in cui è riportato che, in seguito ad un'attivazione dei recettori CB1 e CB2, si possano aumentare le concentrazioni di calcio libero

intracellulare sia tramite l'asse proteina G/PLC/IP3 sia tramite la transattivazione della Tirosin-chinasi, la Fosforilazione della PKC e la regolazione del MAPK. Quindi tramite questi meccanismi i cannabinoidi possono regolare l'attivazione di diverse proteine chinasi intracellulari quali MAPK (mitogen activated protein), ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases type 1 and 2), JNK (c-jun N-terminal kinase), PKB (protein kinase B), FAK(Focal Adesion inase), PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) e una chinasi di adesione focale, che è fosforilata su residui di tirosina e svolge un ruolo nella plasticità sinaptica. L'inibizione di PI3K, che è attivata dalla subunità  $\beta\gamma$  dopo distacco da  $\alpha$ -GTP, è una delle vie più importanti per l'attività antitumorale dei cannabinoidi insieme all'attivazione della cascata MAPK/ERK.. MAPK può attivare la fosfolipasi A2, innescare la cascata dell'acido arachidonico e la produzione di prostaglandine e ridurre la sintesi del recettore del fattore di crescita in alcuni tessuti, attivando l'azione antiproliferativa dei cannabinoidi. Il recettore CB1 si può accoppiare infine ad enzimi capaci di idrolizzare la sfingomieline, un componente ubiquitario della membrana presente sul lato esterno negli astrociti e glioma, ma non nei neuroni primari. L'idrolisi della sfingomieline rilascia fosfocolina e ceramide che fungono da secondi messaggeri. La ceramide, infatti, attiva la Raf-1 che promuove la via delle ERK 1/235 e di conseguenza tutta la cascata delle chinasi e di fattori promotori come ad esempio JNK, p38 e MAPK<sup>43</sup>.

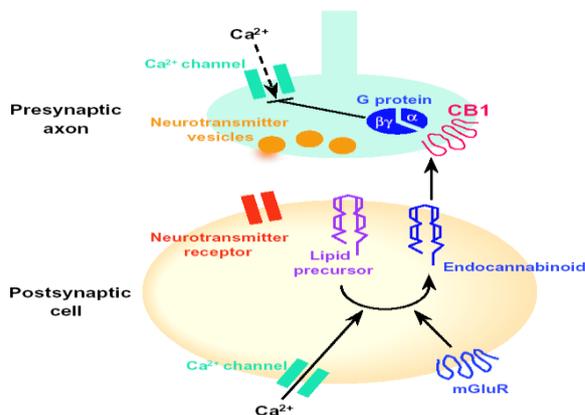


Figura 23

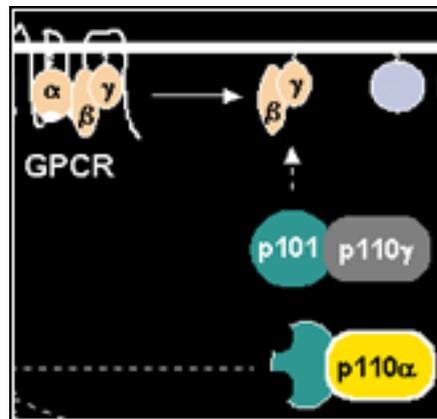


Figura 24

<sup>43</sup> Pinna, *Sintesi e attività cannabinergica di nuove molecole a struttura 1H-4-Diidropirazolo[3,4-a]pirrolizina, 1H-4,5-Diidropirazolo[4,3-g] indolizina e 1H-4,5,6-Tetraidropirazolo[3,4-c]pirrolo*, 2010.

Oltre ai recettori CB1 e CB2 sono stati individuati anche i recettori **GPCRSS** e **TRPV1** (vedi Figura 25). I primi, che sono espressi nell'ippocampo e nella parete dei vasi sanguigni, Sono definiti "recettori orfani" in quanto non si è ancora riusciti a caratterizzarli completamente. I secondi appartengono a un sistema, detto vanilloide, in grado modulare un percorso biochimico complesso comprendente diversi recettori TRP con diversi sottogruppi in base alla disposizione nei tessuti. E' un recettore tetramero costituito da 4 subunità ciascuna costituita da 6 subunità. E' attivato dagli agonisti cannabinoidi, dalla capsaicina che si lega sulla Tyr in posizione 511 e Ser in posizione 512 sul versante citoplasmatico legante i domini transmembrana TM2 e TM3, da un pH < 5, tramite la Tyr 667, e da una T > 46°C, grazie agli aminoacidi del tratto 735-808 dell'estremità carbossiterminale. Questi recettori si trovano espressi nelle radici dorsali del midollo spinale e nel SNC (ipotalamo e ippocampo). In più possono comportarsi da mediatori allosterici sui recettori nicotinici, oppioidi, NMDA e 5-HT e attivare la fosfolipasi provocando una liberazione di acido arachidonico e un aumento della produzione di eicosanoidi, con quindi una diminuzione della ciclossigenasi.

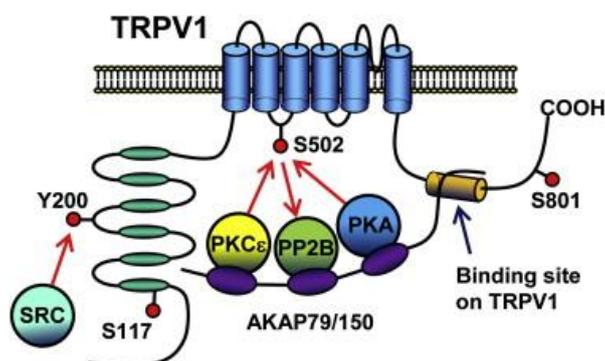


Figura 25

### 3.5.1. Agonisti e antagonisti sui recettori cannabinoidi

Sulla base della struttura chimica, gli agonisti dei recettori cannabinoidi sono essenzialmente divisi in quattro gruppi principali:

- gruppo classico. E' costituito da derivati del dibenzopirano che sono o derivati dei composti della cannabis (fitocannabinoidi) o loro analoghi sintetici. Esempi sono i fitocannabinoidi  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^8$ -THC e cannabinolo ed tra i cannabinoidi sintetici, l'11-idrossi- $\Delta^8$ -THC-dimetileptile (HU-210), il JWH-133, L-

nantradolo e desacetil-1-nantradolo. Il  $\Delta^9$ -THC si comporta come un agonista parziale per entrambi questi tipi di recettori, esibisce meno efficacia nei confronti del CB2 rispetto a recettori CB1, al punto che all'interno di un sistema biologico si è comportato da antagonista del recettore CB2;

- gruppo non classico. E' costituito da analoghi biciclici e triciclici del  $\Delta^9$ -THC con la mancanza di un anello pirano;
- gruppo degli aminoalchilindoli. Hanno strutture che sono completamente differenti da quelle degli altri cannabinoidi. Infatti, i risultati di esperimenti condotti con CB1 mutanti suggeriscono che R-(+)-WIN55212 (WIN55212-2), il più diffuso indagato dei aminoalchilindoli, si lega in modo diverso con il recettore CB1 rispetto ai cannabinoidi classici, non classici o eicosanoidi;
- gruppo degli eicosanoidi. Hanno marcatamente strutture diverse sia dagli aminoalchilindoli che dai cannabinoidi classici e non classici. Importanti membri di questo gruppo sono gli endocannabinoidi: arachidonoiletanolamide (anandamide), O-arachidonoiletanolamina (virodamina), 2-arachidonoil glicerolo. L'anandamide assomiglia al (-)- $\Delta^9$ -THC nella sua affinità per i recettori CB1 e si comporta come parziale agonista con i recettori CB1 e CB2, presentando un'attività intrinseca inferiore nel CB2 rispetto al CB1. E' stato anche scoperto che, come (-)- $\Delta^9$ -THC, anandamide può comportarsi come antagonista del recettore CB2 in almeno un sistema di saggio biologico.

Molti agonisti dei recettori cannabinoidi mostrano marcata stereoselettività in saggi farmacologici, che riflettono la presenza di centri chirali in questi composti. Per esempio i cannabinoidi classici e non classici con la stessa stereochimica assoluta (-)- $\Delta^9$ -THC in 6a e 10a, trans (6AR, 10AR), sono enantiomeri più attivi del loro cis (6AS, 10AS).

Il primo antagonista del recettore CB1 selettivo il diarilpirazolo SR141716A è stato sviluppato dalla Sanofi Ricerche. Esso impedisce prontamente o inverte effetti indotti da cannabinoidi a recettori CB1, sia in vitro che in vivo e ha una affinità maggiore per i recettori CB1 che CB2. Manca di affinità significativa per una vasta gamma di recettori non-cannabinoidi e non presenta una rilevabile attività agonista sui recettori CB1 e CB2. Altri antagonisti CB1-selettivi stabiliti sono LY320135, AM251 e AM281.

I principali antagonisti selettivi del recettore CB2 sono il diarilpirazolo SR144528 e l'aminoalchilindolo 6-iodopravadoline (AM630). Entrambi legano con maggiore

affinità i recettori CB1 rispetto ai CB2. Per ottenere un diarilpirazolo con ancora maggiore selettività e affinità per CB2 rispetto a SR144528 è necessario sintetizzare un composto meno flessibile.

### **3.6. Sistema endocannabinoide**

Con il termine cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi si identifica una classe di messaggeri lipidici endogeni, accomunati dalla capacità di interagire con almeno uno dei recettori cannabinoidi a livello centrale o periferico, regolando alcune funzioni fisiologiche e comportamentali. La scoperta risale al 1992 quando Devane e altri, alla ricerca dei ligandi naturali dei recettori cannabinoidi, isolarono da estratti di cervello di maiale la sostanza lipidica N-arachidonoil-etanolamina (AEA) a cui venne dato il nome di anandamide (dal sanscrito ananda che significa serenità interiore). Una volta scoperto l'anandamide si è proceduto con la determinazione di tutti i componenti di quello che verrà chiamato sistema endocannabinoico.



Figura 26

Esso è costituito da:

- quattro agonisti dell'anandamide, derivati di acidi grassi polinsaturi<sup>44</sup>, quali le etanolamidi dell'acido omo-gammalinoleico e docosatetraenoleico, il 2-arachidonilglicerolo e il noladinetere (vedi Figura 27);
- dai recettori CB1, CB2, GPCRSS e TRPV1.

<sup>44</sup> Bellamoli, *Il sistema endocannabinoide e le sue funzioni*, 2010.

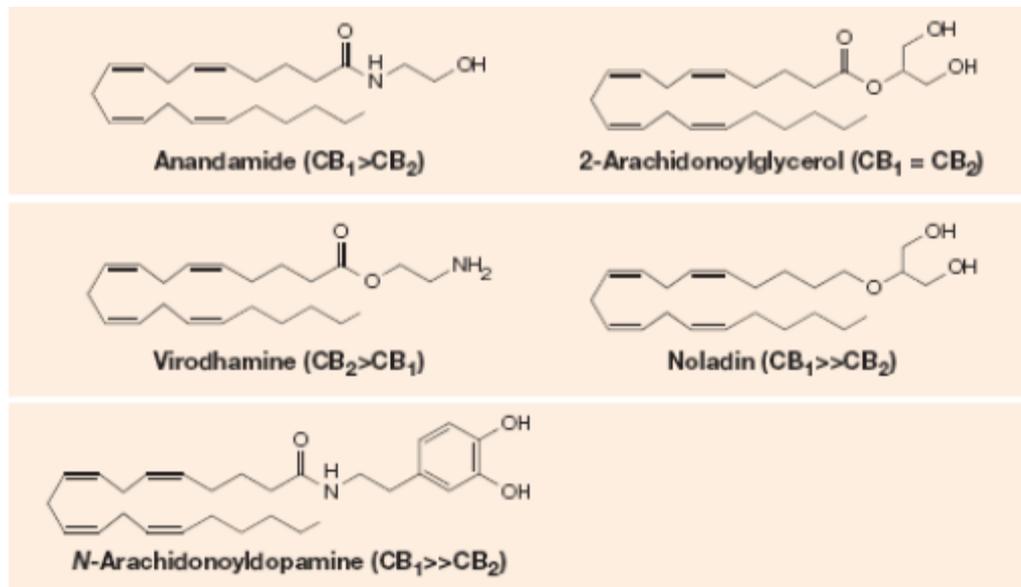


Figura 27

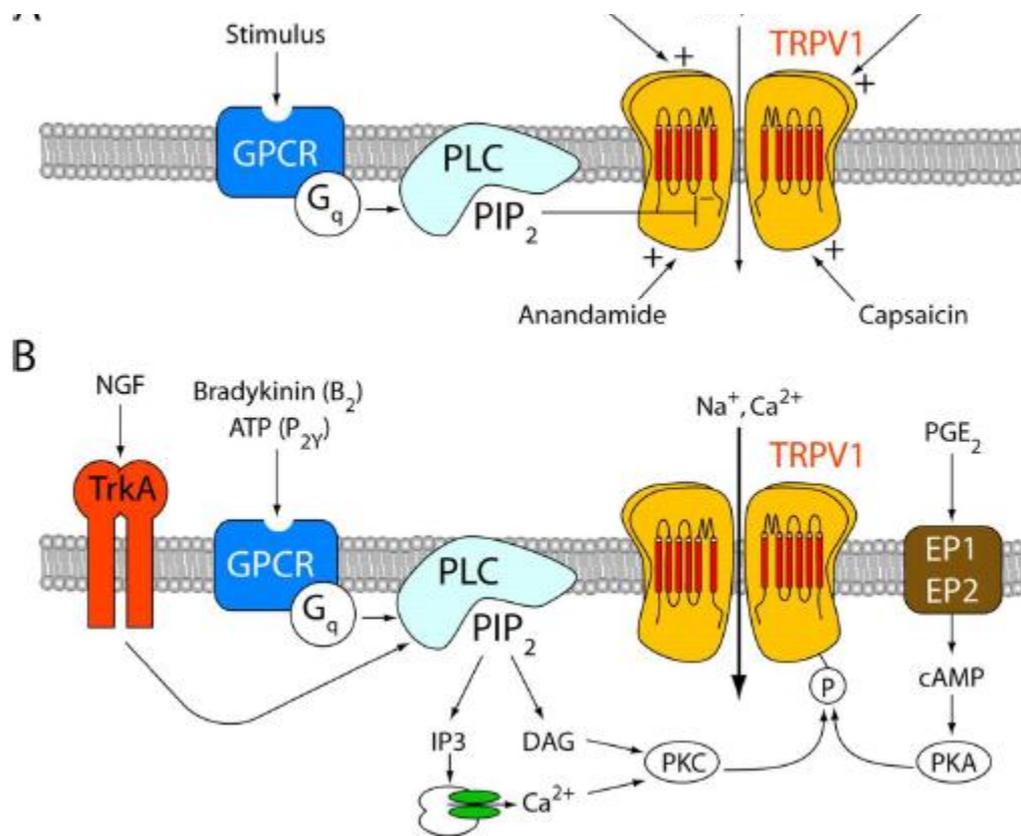


Figura 28

### 3.6.1. Biosintesi Endocannabinoidi<sup>45</sup>

Gli endocannabinoidi sono sintetizzati all'occorrenza dai neuroni nel plasmalemma, in seguito alla depolarizzazione della membrana e all'aumento intracellulare dei livelli del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Questi meccanismi sono indotti da determinati eventi e stimolano delle risposte e delle modificazioni a livello neuronale. L'AEA viene biosintetizzato a partire dal fosfolipide tramite due fasi di reazioni enzimatiche. La prima è responsabile della formazione di N-Arpe tramite il trasferimento di una catena acilica di grasso dalla posizione sn-1 dei glicerofosfolipidi al gruppo amminico di fosfatidiletanolamina. Questo processo non è stato ancora ben definito e potrebbe essere catalizzato sia da un enzima calcio-dipendente trans-N-aciltransferasi (NAT), sia da un NAT calcio-indipendente recentemente caratterizzato nel topo come una proteina lecitina-retinolo aciltransferasi-1 (RLP-1). In una seconda fase, l'idrolisi enzimatica di N-Arpe, catalizzata da una fosfolipasi D NAPE-selettiva, porta alla formazione di AEA e dell'acido fosfatidico. NAPE-PLD è molto diverso da altri enzimi PLD, in quanto esibisce una selettività per una particolare porzione di acido grasso sulla posizione N-sn-1, sn-2 e perciò è anche responsabile per la formazione di altri N-acil-etanolamina (NAE)(vedi Figura 29)

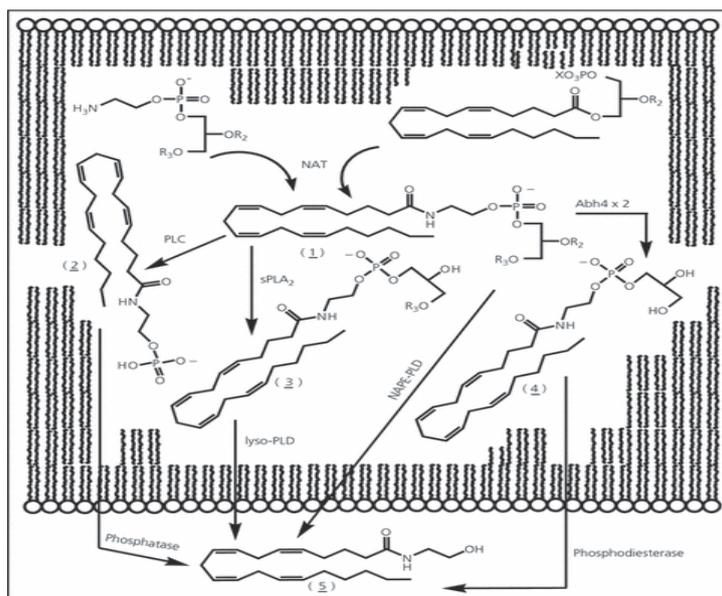


Figura 29

<sup>45</sup> Bisogno, *Endogenous Cannabinoids: Structure and Metabolism*, 2008.

Vi è uno stretto rapporto precursore-prodotto tra N-Arpe e AEA e i livelli di NAE possono essere regolati dalla sovraespressione nelle cellule del complesso NUCA-PLD. Recentemente, sono state riportate delle vie alternative:

- un percorso dipendente dalla fosfolipasi C per la conversione di N-Arpe a AEA tramite la formazione di fosfo-AEA come composto intermedio, e la sua defosforilazione grazie alla proteina tirosina fosfatasi N22 (PTPN22) con la formazione di AEA;
- percorso da N-Arpe a 2-liso-NUCA, mediante l'azione di un gruppo IB secretoria della fosfolipasi A2. Poi potrebbe essere convertito a AEA tramite una liso-fosfolipasi D selettiva;
- percorso identificato nel cervello di topo, dove  $\alpha$  /  $\beta$ -idrolasi 4 (Abh4) funge da fosfolipasi B /lisofosfolipasi per catalizzare la doppia deacilazione di NUCA, generando quindi la formazione di una glicerolo-fosfo-AEA intermedia, che viene poi convertito in AEA da una specifica fosfodiesterasi.

I più importanti precursori biosintetici del **2-AG** sono i DAG, che possono essere prodotti o dall'idrolisi di fosfoinositolo bifosfato (PIP2), catalizzate dalla fosfolipasi C PIP2-selettiva, o dall'idrolisi dell'acido fosfatidico (PA), catalizzate da un PA fosfoidrolasi. I DAG vengono poi convertiti in 2-AG da SN-1 selettivo-DAG lipasi. Sono stati isolati due isoenzimi sn-1 DAG lipasi (DAGL $\alpha$  e DAGL $\beta$ ), situati principalmente nella membrana plasmatica e stimolati da Ca<sup>2+</sup> e glutatione. Sembrano possedere una triade catalitica tipica di serina idrolasi e non mostrano una forte selettività per i DAG contenenti 2-arachidonato(vedi Figura 30). I ruoli proposti per il 2-AG sono di mediatore di crescita dei neuriti, durante lo sviluppo del cervello, segnalatore retrogrado in grado di mediare la soppressione della depolarizzazione indotta della neurotrasmissione e infine di plasticità eterosinaptica, nel cervello adulto. Recentemente è stata suggerita una via biosintetica responsabile della formazione 2-AG che non richiede l'attivazione sequenziale di PLC $\beta$  e DAGL<sup>46</sup>.

---

<sup>46</sup> Di Marzo, *Endocannabinoids: synthesis and degradation*, 2006.

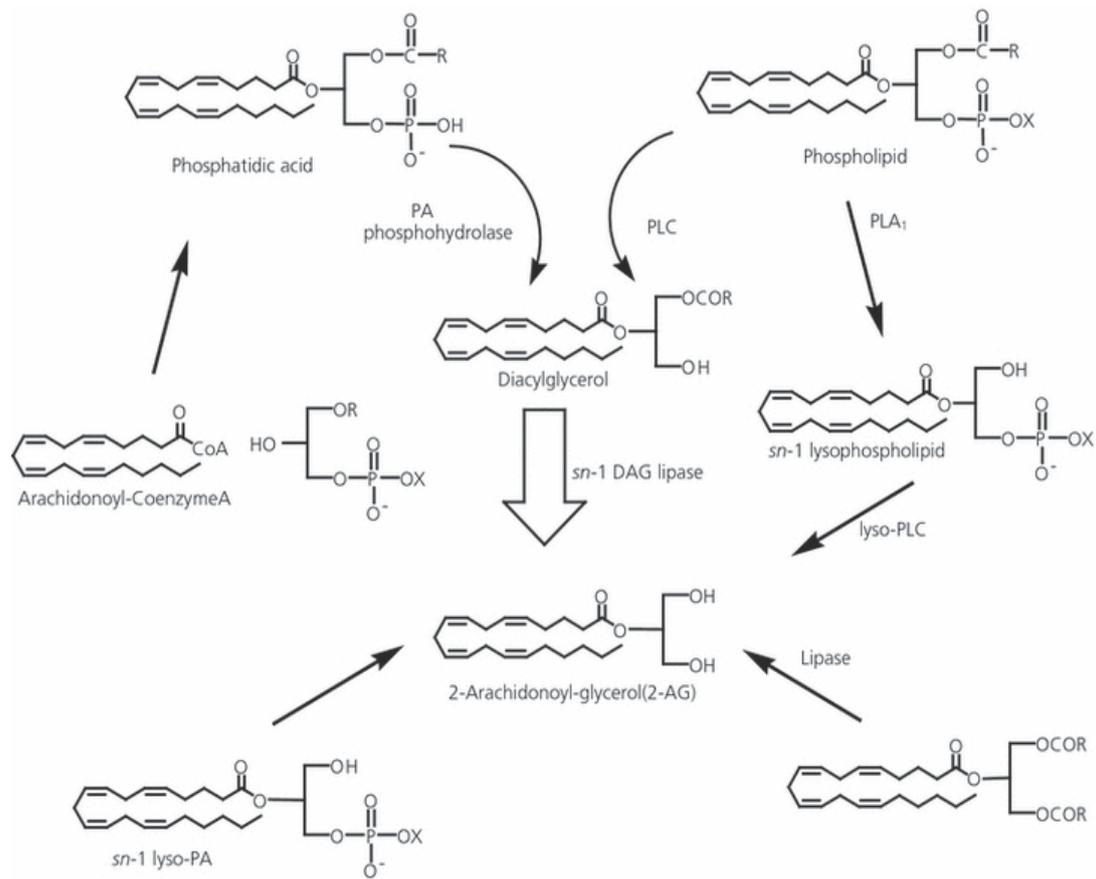


Figura 30

Secondo alcuni esperimenti condotti su topi la biosintesi basale di anandamide e di 2-AG è sotto il controllo tonico dei recettori accoppiati alle proteine G (proteine Gαq/Gα11) ma non si hanno ancora dati definitivi.

### 3.6.2. Rilascio<sup>47</sup> e meccanismo d'azione degli endocannabinoidi

Gli endocannabinoidi una volta sintetizzati nel plasmalemma possono o, essere accumulati all'interno delle vescicole e rilasciati tramite l'escrezione dai neuroni, o essere diffusi passivamente o, attraverso la facilitazione di alcune specifiche proteine leganti i lipidi, essere diffusi nel mezzo extracellulare. Una volta rilasciati, i nuovi endocannabinoidi possono viaggiare in direzione retrograda lungo la fessura sinaptica, legandosi anche ai recettori cannabinoidi sui terminali presinaptici. L'attivazione di recettori cannabinoidi CB1 comporta l'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi, con minor produzione del secondo messaggero cAMP, che comporta la chiusura dei canali Ca<sup>2+</sup>, inibendo l'ingresso di ioni Ca<sup>2+</sup>, e l'apertura dei canali del potassio (K<sup>+</sup>)

<sup>47</sup> Freund, *Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling*, 2003.

causando una iperpolarizzazione delle membrane. Inoltre è presente anche una attivazione di alcune chinasi, tra cui le MAP chinasi. L'azione svolta sui canali ionici comporta l'inibizione del rilascio di neurotrasmettitori dai terminali assonici, perciò gli endocannabinoidi hanno un ruolo importante in alcune forme di plasticità sinaptica sia a breve che a lungo termine<sup>48</sup>. Si è ipotizzato che gli endocannabinoidi vengano sintetizzati quando persiste un'intensa attività neuronale e che partecipino ad una sorta di meccanismo a feedback, dove la loro produzione nelle cellule postsinaptiche inibisce il rilascio di trasmettitori. Questo fenomeno, indicato come "plasticità mediata dagli endocannabinoidi"<sup>49</sup> è un meccanismo che serve sia ad attenuare, nel caso vi sia una riduzione del rilascio del neurotrasmettitore eccitatorio (come ad esempio il glutammato) che ad aumentare, nel caso vi sia una riduzione del rilascio di quello inibitorio (il GABA), l'eccitabilità neuronale. Una importante attività dei recettori CB1 infatti è quella di ridurre l'apertura dei canali presinaptici del calcio. Quando i canali del calcio vengono inibiti, il terminale presinaptico riduce il rilascio di neurotrasmettitori (principalmente glutammato o GABA). Quindi, quando un neurone postsinaptico è molto attivo, esso rilascia endocannabinoidi, i quali reprimono sia l'impulso inibitorio che eccitatorio sul neurone. I recettori cannabinoidi svolgono dunque una sorta di azione protettiva del Sistema Nervoso Centrale dalla sovrastimolazione o sovrainibizione esercitata da altri neurotrasmettitori. In conclusione la rapida induzione della sintesi di endocannabinoidi, il legame ai recettori e la loro successiva degradazione, suggerisce che questi composti agiscano nel cervello primariamente come neuromodulatori, piuttosto che come classici neurotrasmettitori<sup>50</sup>.

### 3.6.3. Degradazione degli endocannabinoidi<sup>45</sup>

La cessazione del segnale di AEA e 2-AG sembra coinvolgere un processo in due fasi che inizia con il trasporto attraverso la membrana plasmatica, seguito da idrolisi enzimatica rispettivamente in acido arachidonico e etanolamina e glicerolo. La fine dell'effetto di questi due mediatori lipidici avverrebbe attraverso il classico meccanismo di reuptake mediato da un trasportatore. Sebbene il trasportatore per l'AEA non sia ancora stato precisamente identificato, sfruttando la proprietà della selettività di

---

<sup>48</sup> Chevalleyre, *Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS*, 2006.

<sup>49</sup> Mackie, *Signaling via CNS Cannabinoid Receptors. Mol Cell Endocrinol*, 2008.

<sup>50</sup> Trezza, *Cannabis and the developing brain: Insights from behaviour. European Journal of Pharmacology*, 2008.

substrato si è riusciti a sintetizzare un composto inibitore del trasportatore, l'AM404, che quindi mantiene più a lungo l'AEA a livello dello spazio intersinaptico, aumentando il tono cannabinico endogeno. Il 2-AG viene rimosso anch'esso dallo spazio extracellulare attraverso una molecola trasportatrice che molto probabilmente è la stessa dell'AEA. Sono stati riportati quattro modelli molecolari che rappresentano le varie ipotesi segnalate per il passaggio AEA attraverso la membrana plasmatica<sup>51</sup>. In tre di questi modelli, dove l'idrolisi della AEA è la forza motrice del processo, l'anandamide è associata alla FAAH un'amide idrolasi che ha il compito di inibirla, e può o essere associata alla membrana plasmatica, o essere diffusa passivamente, o essere diffusa facilitatamente. In particolare, FAAH, potrebbe o legarsi all'AEA direttamente dallo spazio extracellulare regolando il gradiente di concentrazione, o guidare l'AEA presente all'interno tramite diffusione passiva, come composto lipofilo, o essere trasportato da un trasportatore di membrana. L'ultimo modello di captazione per endocitosi mediata da recettore proposto è responsabile del sequestro di AEA e il suo successivo rilascio avviene per idrolisi dalla FAAH. Una volta all'interno della cellula, gli endocannabinoidi sono rapidamente inattivati da un meccanismo di idrolisi catalizzata da due enzimi che sono stati anche clonati. FAAH, che è l'enzima meglio analizzato tra quelli coinvolti nella degradazione di entrambi AEA e 2-AG, è abbondantemente espresso in tutto il SNC. I neuroni FAAH-positivi nel cervello si trovano in prossimità di terminali nervosi che contengono recettori cannabinoidi CB1, sostenendo un ruolo prominente di questo enzima nella disattivazione degli endocannabinoidi. Inoltre è stato scoperto un nuovo enzima denominato FAAH-2, presentante solo il 20% di omologia con la FAAH, è espresso in diverse specie di mammiferi, ma non nei roditori. La valutazione della selettività per il substrato e la sua distribuzione tissutale hanno rivelato che i due enzimi hanno caratteristiche simili ma non identiche. Sebbene FAAH possa catalizzare l'idrolisi di 2-AG, i livelli di 2-AG, a differenza di quelli di AEA, non sono aumentati dall'inibizione di FAAH. Questa osservazione è in accordo con l'evidenza della scoperta dell'esistenza di altri enzimi catalizzanti l'inattivazione 2-AG e diversi da FAAH. Tra questi vi è MAGL, una lipasi dotata di un segmento elicoidale e di un coperchio mobile, che copre il sito catalitico. Il silenziamento della sequenza di RNA che codifica per l'espressione di MAGL migliora notevolmente l'accumulo nelle cellule

---

<sup>51</sup>Dickason-Chesterfield, *Pharmacological characterization of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase inhibitors*, 2006.

di 2-AG, ma non AEA, suggerendo un ruolo primario per MAGL solo nella degradazione del 2-AG.

#### 3.6.4. Effetti degli endocannabinoidi sull'organismo

- Nel SNC si ha:
- controllo dello stimolo dolorifico nell'amigdala, talamo;
- controllo dei disturbi psicomotori nei gangli basali;
- controllo della secrezione di ormoni pituitari, dei cicli di veglia, della termogenesi e dell'appetito nell'ipotalamo;
- controllo della plasticità sinaptica, disturbi del consolidamento della memoria, probabilmente dovuto ad una interferenza con il rilascio di acetilcolina, nell'ippocampo;
- controllo di tremori e spasticità;
- inibizione della sintesi e del rilascio di dopamina e GABA nello striatum;
- soppressione della locomozione nel globus pallidus;
- controllo della visione stereoscopica nella retina.

Il sistema endocannabinoide ha un ruolo importante in processi fondamentali dello sviluppo controllando la plasticità sinaptica (vedi Figura 31), ovvero la capacità del sistema nervoso di modificare l'efficienza del funzionamento delle connessioni tra neuroni (sinapsi), di instaurarne di nuove e di eliminarne alcune, in molte aree cerebrali comprese la neocorteccia, l'ippocampo, il cervelletto, e i gangli della base. Il signaling endocannabinoide ha un ruolo fondamentale nelle sinapsi con un chiaro continuum d'azione dallo stabilirsi delle sinapsi, all'inizio del neurosviluppo, alla funzione delle sinapsi nel cervello adulto. Il sistema endocannabinoide, infatti, è presente nel Sistema Nervoso Centrale fin dalle prime fasi di sviluppo cerebrale e possiede un ruolo rilevante nell'organizzazione cerebrale durante la vita pre e postnatale<sup>52</sup>. Come già accennato la densità dei recettori CB1 aumenta progressivamente durante lo sviluppo postnatale, con il picco poco prima dell'inizio della pubertà per poi diminuire fino a raggiungere i valori adulti. Recenti evidenze indicano che gli endocannabinoidi sono coinvolti nel controllo della neurogenesi, nella proliferazione dei progenitori neurali, nella migrazione e nella

---

<sup>52</sup> Fernandez-Ruiz, *The endogenous cannabinoid system and brain development*, 2000.

specificazione fenotipica dei neuroni immaturi influenzando la formazione di complessi network neuronali.

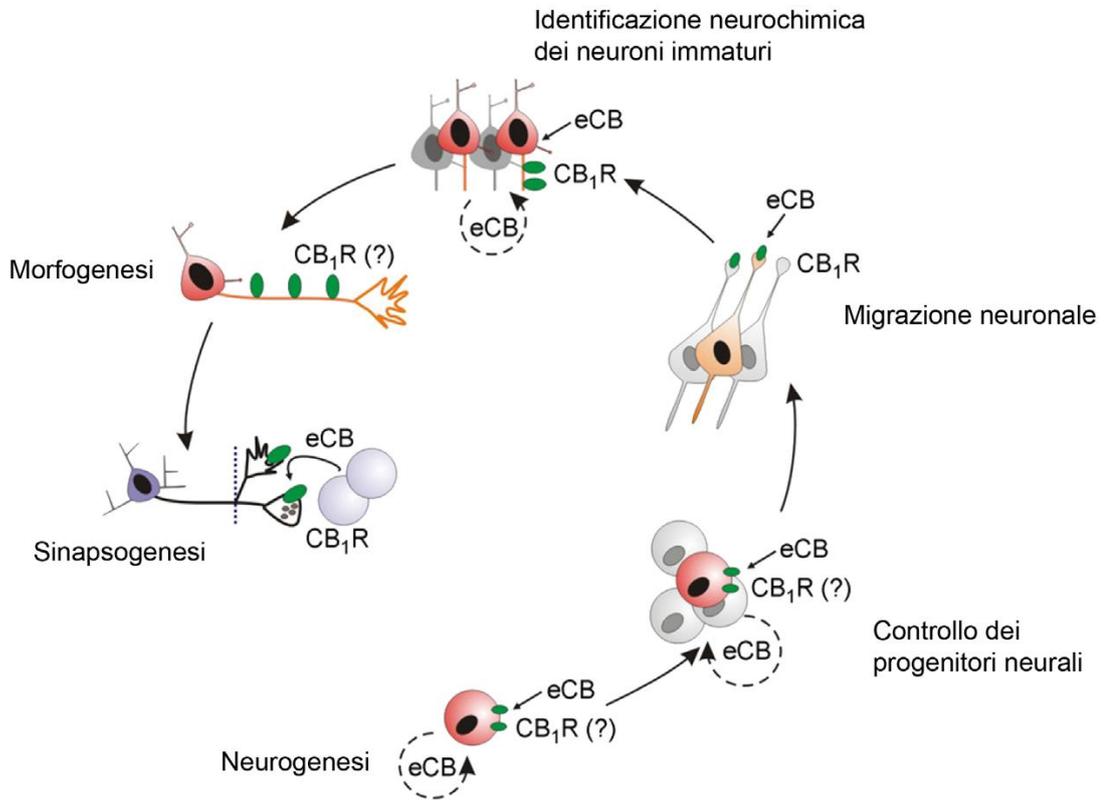


Figura 31

Sarebbero poi implicati in processi di neurosviluppo come la proliferazione, la migrazione, e la genesi delle sinapsi delle cellule nervose<sup>53</sup>. Inoltre la presenza dei recettori cannabinoidi CB1 durante lo sviluppo cerebrale è stato associato ad effetti neuroprotettivi nella maturazione del SNC e delle sue funzioni. Recentemente è stato dimostrato che il sistema endocannabinoide aiuti lo stabilirsi di connessioni di assoni a lunga distanza e agisca come indicazione di orientamento degli assoni locali per gli interneuroni GABAergici nel cervello in fase di sviluppo. La specifica e peculiare azione di regolazione retrograda svolta da questo sistema è estremamente importante per il mantenimento di una equilibrata attivazione neuronale.

<sup>53</sup> Berghuis, *Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor*, 2005

- Nel Sistema cardiovascolare si ha forte abbassamento della pressione sanguigna e del ritmo cardiaco; induzione di ipotensione durante shock emorragici o endotossici, vasodilatazione e stimolazione dell'aggregazione delle piastrine;
- Nel sistema immunitario si ha repressione della trascrizione e della secrezione dell'interleukina 2, stimolazione della sintesi dell'interleukina 6, inibizione della produzione del TNF  $\alpha$ , inibizione della sintesi di interferone- $\gamma$ , induzione dell'apoptosi nei linfociti e stimolazione del rilascio di serotonina.
- Nel Sistema riproduttivo si ha arresto dello sviluppo embrionale e induzione di apoptosi nei blastociti.
- Negli adipociti<sup>54</sup> il recettore CB1 è espresso anche negli adipociti primari e sembra essere coinvolto nella regolazione della lipogenesi. Agonisti CB1 aumentano la lipoproteina lipasi e se invece i recettori CB1 sono bloccati si ha un significativo aumento della produzione di adiponectina. L'adiponectina è secreta esclusivamente dal tessuto adiposo, con livelli plasmatici correlati negativamente con l'obesità. La modulazione del sistema endocannabinoide, mediante trattamento orale cronica con Rimonabant, contemporaneamente riduce il peso corporeo e stimola l'espressione mRNA adiponectina nel tessuto adiposo di ratti Zucker obesi.
- Nei muscoli è già stato dimostrato che la modulazione del sistema endocannabinoide regola l'assorbimento del glucosio attraverso la via fosfatidilinositolo-3-chinasi nelle cellule muscolari scheletriche.

Da questa rapida descrizione si evince come il sistema endocannabinoide sia coinvolto nella regolazione di funzioni cellulari fisiologiche e patologiche fondamentali nella maggior parte degli organi dell'organismo e come quindi possa diventare bersaglio di svariate terapie farmacologiche.

---

<sup>54</sup> Eduardo Tiberiça, *The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake*, 2010.

## Capitolo 4

### I cannabinoidi nell'attività antineoplastica

Una delle aree più interessanti e promettenti della ricerca attuale sui cannabinoidi riguarda la capacità di questi composti di controllare la sopravvivenza e la morte cellulare. Negli ultimi anni le indagini hanno suggerito la loro potenziale applicazione come farmaci antitumorali poiché, sia in modelli tumorali in vitro che in molti test in vivo, l'attivazione del sistema cannabinoide induce l'arresto del ciclo cellulare, l'inibizione della sopravvivenza cellulare e l'attivazione della segnalazione di morte cellulare programmata provocando quindi la morte della cellula tumorale. Le proprietà antitumorali dei cannabinoidi furono osservate per la prima volta più di 30 anni fa, quando Munson e altri dimostrarono che  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo(THC) era in grado di inibire la crescita di adenocarcinoma polmonare in vivo. Nonostante ciò si è proceduto, con ulteriori ricerche, all'analisi dei meccanismi coinvolti solo negli ultimi due decenni<sup>55</sup>. Il potenziale antitumorale di questa classe di composti può essere molto diverso in base ai vari sistemi tumorali e al meccanismo usato dai cannabinoidi per interagire con le cellule, cioè in base alla classe di recettori a cui si legano o in base alle specifiche vie intracellulari attivate. Per quanto riguarda l'interazione con la cellula bersaglio, come precedentemente descritto, i cannabinoidi possono interagire con recettori di tipo 1 o 2 (CB1 e CB2), con recettori associati a canali transitori potenziali vanilloide di tipo 1 (TRPV1), o direttamente con microdomini di membrana ricchi di colesterolo chiamati raft lipidici (vedi Figura 32). Quest'ultimi sono regioni della membrana cellulare rappresentate da accumuli di particolari proteine e lipidi, sono facilmente visibili in quanto presentano uno spessore maggiore (a causa di lipidi con code di acidi grassi di maggiore lunghezza rispetto ai consueti fosfolipidi) rispetto alle restanti parti del doppio strato fosfolipidico. Nelle zattere lipidiche si concentrano in particolare colesterolo, sfingolipidi e particolari proteine di membrana. L'interazione dei cannabinoidi con i diversi tipi di recettori spesso porta la cellula alle stesse sorti pur venendo attivate diverse cascate intracellulari di segnalazione.

---

<sup>55</sup> Sarfaraz, *Cannabinoid Receptor Agonist-induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells LNCaP Proceeds through Sustained Activation of ERK1/2 Leading to G<sub>1</sub> Cell Cycle Arrest*,2006.

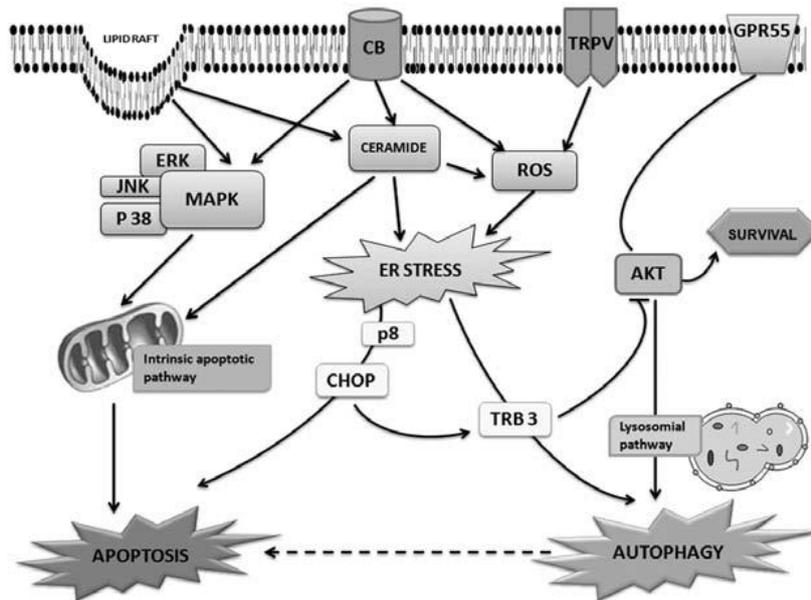


Figura 32

I recettori CB, una volta attivati, sono responsabili dell'aumento del livello di ceramide, dell'attivazione dell'asse ERK/MAPK, della diminuzione del livello di cAMP, attraverso l'inibizione dell'adenilato ciclasi, e dei ROS portando all'apoptosi canonica mediata dall'attivazione delle caspasi. Secondo studi recenti pubblicati da Oddi e altri, condotti tramite esperimenti di mutazioni sito-specifiche di residui di cisteina appartenenti a recettori CB1 palmitoilati, i recettori CB1 potrebbero interagire con le raft lipidiche creando quindi un effetto sinergico e potenziato nell'attivazione dei secondi messaggeri.

I recettori dei cannabinoidi TRPV1 provocano invece l'attivazione di meccanismi sovrapposti tra loro quali la via apoptotica mitocondriale e l'aumento del livello di ROS che comporta un determinato stress ossidativo. E' curioso notare che a volte gli effetti dei cannabinoidi non possono essere neutralizzati con l'aggiunta di antagonisti selettivi dei recettori cannabinoidi, quindi è ipotizzabile che sia presente un altro tipo di interazione tra cannabinoidi e la membrana cellulare anche se non sono stati ancora condotti studi in quest'ambito.

I raft lipidici interagiscono con l'anandamide in cellule stellate epatiche provocando una down-regulation della via di segnalazione PI3K/AKT con un possibile ruolo nel processo infiammatorio. Invece in cellule di carcinoma epatocellulare e cellule di

melanoma, l'interazione del cannabinoide sintetico WIN55, 212-2 con i raft lipidici promuove un percorso apoptotico caspasi-dipendente.

Un'eccezione è rappresentata da GPR55, un nuovo potenziale recettore cannabinoide, la cui attivazione è strettamente connessa alla proliferazione cellulare.

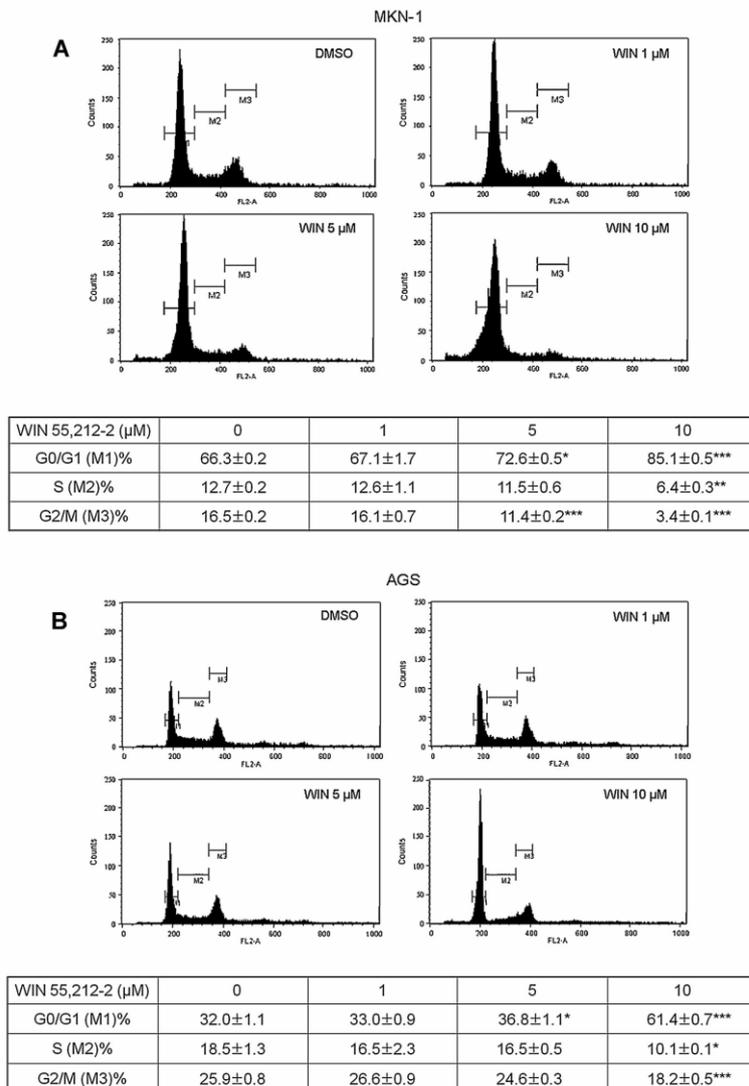
#### **4.1. Cannabinoidi e induzione di percorsi apoptotici e autofagici**

È difficile fare una distinzione netta tra percorso apoptotico e autofagico perché alcuni stimoli di morte possono attivare entrambi e il percorso intrapreso dipende dal profilo di espressione molecolare del tipo cellulare. Il cross-talk tra i due percorsi è quindi piuttosto complesso e talvolta contraddittorio, ma sicuramente determinante per l'identificazione del bersaglio nella terapia anti-tumorale, per l'induzione della morte della cellula tumorale e per la sopravvivenza dell'organismo. Qui di seguito verranno quindi riportate le analisi dei percorsi e dei composti chimici che portano all'attivazione della via apoptotica, della via autofagica e alle interazioni tra le due vie.

##### 4.1.1. Cannabinoidi e induzione di percorsi apoptotici

È ben noto che l'attivazione delle vie di morte debbano essere accompagnate dalla sottoregolazione di fattori di sopravvivenza. Una funzione centrale della segnalazione pro-sopravvivenza intracellulare è rappresentata dalla via PI3K/AKT, la cui importanza in diversi tipi di cancro è anche confermata da studi clinici. Questa chinasi è il nodo centrale del percorso PI3K/AKT/mTOR, segnalazione che attiva processi cruciali come la sopravvivenza cellulare, la crescita, la proliferazione, l'angiogenesi e la migrazione cellulare e infine l'invasione. Al contrario l'inibizione dell' AKT fosforilata porta all'arresto del ciclo cellulare, che precede la risposta apoptotica molto spesso mediata dal coinvolgimento del percorso intrinseco mitocondrio-dipendente. L'abbassamento della concentrazione dell' AKT-P è coinvolto nell'azione antitumorale dei cannabinoidi; infatti è stato riportato che agonisti dei cannabinoidi (WIN 55,212-2) sono in grado di indurre l'arresto del ciclo cellulare nella fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> grazie a un'inibizione di AKT-P mediata da MAPK. Per identificare il meccanismo molecolare con cui i cannabinoidi portano all'arresto del ciclo cellulare, è necessario analizzare la cascata attivata dalla proteina chinasi mitogeno-attivata (ERK, JNK e p38/MAPK) e i diversi percorsi che ne derivano. Questa cascata a monte si sviluppa tramite il legame dei cannabinoidi ai

recettori CB, che provocano la dimerizzazione di due recettori tirosin-chinasici e la successiva attivazione dell'asse Ras-Raf-MEK-ERK o MAPK. È stato dimostrato che la durata dello stimolo può essere fondamentale per il tipo di risposta cellulare. Infatti una attivazione transitoria della cascata ERK stimola la sopravvivenza e la proliferazione cellulare, mentre risultati a lungo termine per l'attivazione di ERK comportano una risposta apoptotica, come proposto dalla Galve-Roperh e altri nel glioma maligno e confermato in cellule del sarcoma di Kaposi. L'attivazione di ERK 1/2 è stata recentemente dimostrata anche nel cancro gastrico, in questo caso è legato all'arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1 del ciclo proliferativo, un evento che precede la risposta apoptotica. Sono state utilizzate linee cellulari gastriche tumorali AGS e MKN-1 coltivate in terreno RPMI 1640 supplementato con 10% di FBS inattivato al calore, 100 unità / ml di penicillina e 0,1 mg / ml di streptomina. Le cellule sono state mantenute in condizioni standard di coltura cellulare a 37,8 C e il 5% di CO2 in ambiente umido. Le cellule sono state seminate in piastre di coltura di 100 millimetri. Dopo una notte d'incubazione per sono state trattate con WIN 55,212-2 a dosaggi di 0, 1, 5 e 10 $\mu$ M o una quantità equivalente di DMSO per 24 h (vedi Figura 33).



**Figura 33**

Le cellule sono state poi lavate con PBS freddo, raccolte e disposte in ghiaccio per 5 minuti. Successivamente, utilizzando un tampone di lisi integrato con inibitori delle proteasi sono state centrifugate a 14.000 giri per 15 min. a 4°C. Il centrifugato, previa rimozione dei surnatanti, è stato diviso in provette da 1,5 ml e conservato a 70°C per la successiva analisi tramite Western Blot. Il trattamento con WIN 55,212-2 per 24 ore ha portato, tramite l'interazione con un recettore CB1 e successiva attivazione dell'asse MAPK/ERK, ad un aumento dose-dipendente dell'espressione della proteina fosfo-ERK1 / 2. Questa induce a sua volta un aumento del rapporto tra Kip1/p27 e Cip1/WAF1/p21. Kip1 è una proteina appartenente alla famiglia delle chinasi inibitrici ciclina-dipendente, codificata dal gene CDKN1B, che legandosi impedisce l'attivazione dei complessi ciclina E-CDK2, ciclina D-CDK4 e ciclina D-CDK6 e controlla quindi

la progressione del ciclo cellulare nella fase G<sub>1</sub>. È indicata come una delle più importanti inibitrici del ciclo cellulare. Cip1/WAF1 è una chinasi inibitrice 1 ciclina-dipendente, codificata dal gene CDKN1A, che si lega ed inibisce l'attività dei complessi ciclina-CDK2 o ciclina-CDK1, e quindi funziona come un regolatore del ciclo cellulare nella progressione in fase G<sub>1</sub>. L'espressione di questo gene è strettamente correlata anche alla proteina soppressore del tumore p53, proteina che media il ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub> e dipendente anch'esso dal legame dei cannabinoidi ai recettori. Si è osservato che sia le concentrazioni delle cicline D1 ed E, che quelle di Cdk 2, Cdk 4, e Cdk 6 si abbassano in seguito a trattamento con cannabinoidi. La sotto-regolazione di cdk4 / 6 porta alla fosforilazione ed inattivazione di pRb che a sua volta down-regola la famiglia E2F, e dei suoi eterodimeri DP-1 e DP-2, provocando l'inibizione della trascrizione di geni richiesti per la fase S. Nonostante non sia stato ancora completamente delucidato l'esatto meccanismo antiproliferativo di WIN 55,212-2, è chiaro che questo agonista può inibire lo sviluppo delle cellule soggette a cancro gastrico tramite l'arresto del ciclo cellulare<sup>56</sup>. Risultati interessanti sono stati ottenuti anche nell'astrocitoma dove i cannabinoidi inducono apoptosi in cellule che esprimono solo bassi livelli di recettori CB, mentre in cellule con alti livelli di recettore CB, i cannabinoidi sono inefficaci a causa della quantità elevata contemporanea della proteina pro-sopravvivenza fosforilata AKT. Questi risultati suggeriscono che l'accoppiamento dei recettori CB con AKT fosforilata (quando questi recettori sono espressi a livelli medi e alti) elimini la possibilità dei cannabinoidi di indurre apoptosi in cellule di astrocitoma. Pertanto, AKT è un bersaglio attraente per gli agenti antitumorali e studi clinici con inibitori di PI3K e AKT potrebbero riservare ulteriori risultati incoraggianti<sup>57</sup>. Studi condotti su diverse linee cellulari tumorali della prostata e ovariche hanno evidenziato che l'attivazione di ERK possa avvenire sia tramite segnalazione dal recettore cannabinoide presunto GPR55, con successiva attivazione di un loop/ciclo autocrino che sostiene la proliferazione cellulare, sia tramite recettori CB con stimolazione di una risposta apoptotica e antiproliferativa tramite l'attivazione delle subunità ERK1 / 2. In questo caso ERK provoca un'alterazione del ciclo cellulare e l'arresto in fase G<sub>1</sub>, grazie alla regolazione del rapporto bax/bcl-2 e all'attivazione delle caspasi con conseguente induzione dell'apoptosi. I membri della famiglia Bcl-2

---

<sup>56</sup> Park, *Antiproliferative Mechanism of a Cannabinoid Agonist by Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cancer Cells*, 2011.

<sup>57</sup> Calvaruso, *Cannabinoid-associated cell death mechanisms in tumor models (Review)*, 2012.

sono regolatori critici della via apoptotica e possono essere attivati da una up-regolazione della proteina p53. Bcl-2 è una molecola effettrice a monte della via apoptotica ed è identificata come un potente soppressore di apoptosi. Infatti Bcl-2 si trova ad alti livelli in più della metà di tutti i tumori umani e ha dimostrato di formare un complesso eterodimero con il membro antiapoptotico Bax, neutralizzando i suoi effetti proapoptotici. Pertanto alterazioni nei livelli di Bax e Bcl-2, con spostamento a favore del rapporto bax/bcl-2 ad opera della via ERK, sono considerati un fattore decisivo per la stimolazione dell'apoptosi: l'utilizzo di agonisti cannabinoidi su cellule tumorali della prostata porta a una diminuzione dell'espressione della proteina Bcl-2 e a un aumento dell'espressione della proteina Bax. Le caspasi sono delle proteasi preformate nelle cellule e normalmente presenti come proenzimi inattivi, che sono attivate durante l'apoptosi in una cascata di auto-amplificazione. Le caspasi effettrici colpiscono un insieme di proteine vitali e, quindi, avviano ed eseguono il degrado apoptotico della cellula. Agiscono tramite il rilascio dai mitocondri del citocromo C che, in risposta a vari stimoli apoptotici, una volta nel citosol, può legarsi ad APAF-1. In presenza di dATP o ATP il complesso APAF-1-citocromo C provoca l'attivazione della caspasi 9. Il trattamento delle cellule con cannabinoidi promuove quindi il rilascio di citocromo C e l'attivazione della caspasi 9, che attiva a sua volta le caspasi 3 e 6<sup>55</sup>.

#### 4.1.2. Cannabinoidi e induzione di percorsi autofagici

L'autofagia è un processo che può assumere ruoli diversi e contrari in base al destino della cellula: può innescare meccanismi di sopravvivenza, collaborare con l'apoptosi stimolando in sinergia la morte cellulare o sostituirsi ad esso iniziando un percorso autonomo di morte. E' importante osservare che l'attivazione del percorso autofagico è spesso mediato dalle stesse molecole che sono coinvolte nell'apoptosi. Studi recenti hanno evidenziato come sia effettivamente presente in diversi modelli tumorali sperimentali (cellulari umane di astrocitoma, culture primarie di cellule di glioma umano e varie linee cellulari umane di cancro di diversa origine, tra cui il cancro del pancreas, al seno, e al fegato) l'induzione da parte del  $\Delta$ 9-tetraidrocannabinolo (THC) dell'autofagia. Infatti in tumori in cui è stata inibita l'autofagia, si è osservata una elevata resistenza all'azione anti-tumorale del THC potendo quindi dedurre che questo processo è essenziale per l'attività antineoplastica di cannabinoidi. Sono stati studiati i meccanismi molecolari responsabili dell'attivazione dell'autofagia in seguito a somministrazione di THC e i risultati indicano che questo processo è stimolato tramite il

percorso di segnalazione stress-dipendente del reticolo endoplasmatico (ER). ER stress è una risposta adattativa che diventa attiva nella cellula quando il reticolo endoplasmatico è alterato. Il THC infatti provoca un accumulo precoce di ceramide sintetizzato ex novo (un evento che si svolge in ER), che porta a sua volta alla dilatazione di ER e all'inizio della traduzione del fattore  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) fosfato fosforilato, due tratti distintivi della risposta allo stress di ER. L'attivazione di questa risposta ER stress induce la sovra-regolazione di vari geni, tra cui la proteina dello stress-regolamentato p8 (anche chiamato candidato di metastasi 1, Com-1) e il suo target a valle, il pseudochinasi omologo 3 (TRB3), che sono coinvolti nell'azione antitumorale. L'inibizione genetica della p8 e TRB3 impedisce l'autofagia indotta dai cannabinoidi, nonché la morte cellulare, dimostrando che queste proteine svolgono un ruolo importante nel collegamento tra ER stress e autofagia nel contesto dell'azione dei cannabinoidi. Un passo fondamentale per l'induzione di percorso di segnalazione si basa sulla inibizione da parte dell'asse TRB3 del target AKT / mammifero del complesso rapamicina 1 (mTORC1). Infatti uno degli eventi cruciali per l'avvio dell'autofagia in molti modelli cellulari è l'inibizione della mTORC1, che svolge un ruolo centrale nel controllo della sintesi proteica, nella crescita cellulare e nella proliferazione cellulare attraverso la regolazione di diversi obiettivi a valle. mTORC1 si propone di regolamentare l'autofagia reprimendo l'attività di Atg1. Come risultato della sua posizione centrale nel controllo della omeostasi cellulare, mTORC1 integra segnali da ingressi diversi. Uno dei più importanti regolatori a monte della mTORC1 è la chinasi pro-sopravvivenza AKT, che fosforila e inattiva TSC2 (un inibitore della mTORC1 attivatore Rheb) e PRAS40. Pertanto l'attivazione di AKT stimola l'attività di mTORC1 e inibisce l'autofagia. Si è riscontrato che il trattamento con cannabinoidi, tramite il percorso di segnalazione sopra descritto ER stress, aumenti i livelli di TRB3 e promuova l'interazione inibitoria di questa proteina con AKT, che porta a sua volta a una inibizione di mTORC1. Per ottenere questi risultati in vivo si è proceduto con la somministrazione di THC in cellule U87MG derivate, da tumori xenotrapianti, e in fibroblasti embrionali di topo (MEF) derivati da p8 + / + e p8- / - trasformati tramite la proteina mutata RasV12 e l'oncogene E1A. I tumori sono stati indotti in topi per iniezione sottocutanea di  $10 \times 10^6$  cellule U87MG in PBS integrato con 0,1% di glucosio o di  $10 \times 10^6$  p8 + / + o p8- / - RasV12/E1A MEF trasformato in DMEM contenente 10% FBS. I tumori sono stati lasciati crescere fino a raggiungere un volume medio di 200-250 mm<sup>3</sup> (2 settimane per le cellule U87MG e 10 giorni per il MEF

trasformato) e gli animali sono stati assegnati in modo casuale a diversi gruppi. A questo punto, il veicolo o il THC (15 mg / kg / die) in 100 ml di PBS, supplementato con 5 mg /ml di BSA sgrassati e dializzato, sono stati somministrati giornalmente in una singola iniezione peritumorale. I tumori sono stati misurati con pinza esterna, e il volume è stato calcolato come  $(4\pi / 3) \times (\text{larghezza} / 2)^2 \times (\text{lunghezza} / 2)$ . Si è dimostrato che il trattamento con cannabinoidi riduce la crescita tumorale in U87MG, infatti la somministrazione di THC per 14 giorni ha ridotto la crescita del tumore del 50%. Sono stati poi analizzati i tumori derivati da p8 + / + e p8- / - RasV12/E1A-MEF, in questo caso, la somministrazione di THC per 8 giorni ha diminuito del 45% la crescita del tumore p8 + + / ma non ha avuto effetti significativi sulla p8- / -. Il trattamento con THC ha aumentato l'espressione di TRB3, l'autofagia, come riscontrato tramite il metodo TUNEL, e attivato la caspasi-3, come riscontrato dall'analisi immunohistochimica, in p8 + / +, ma non p8- / -. Questa è una ulteriore conferma che il percorso p8/TRB3 gioca un ruolo essenziale nell'attivazione dell'autofagia e morte cellulare da parte dei cannabinoidi anche in vivo. Infine sono stati analizzati i tumori di due pazienti arruolati in uno studio clinico finalizzato a valutare l'effetto del THC sul glioblastoma multiforme recidivante. I pazienti sono stati sottoposti a somministrazione intracranica di THC e sono state effettuate delle biopsie prima e dopo il trattamento. Nei 2 pazienti, l' inoculazione dei cannabinoidi ha aumentato il TRB3, come riscontrato tramite analisi immunohistochimica, e diminuito S6 fosforilazione (vedi Figura 35). E' stato riscontrato un aumento del numero di cellule con fenotipo autofagico e delle caspasi-3 attive tramite immunocolorazione. Anche se questi studi sono stati condotti solo su 2 pazienti, le evidenze precliniche suggeriscono che la somministrazione di cannabinoidi potrebbe anche innescare la morte cellulare autofagia mediata nei tumori umani<sup>58</sup>.

---

<sup>58</sup> Salazar, *Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells*,2009.

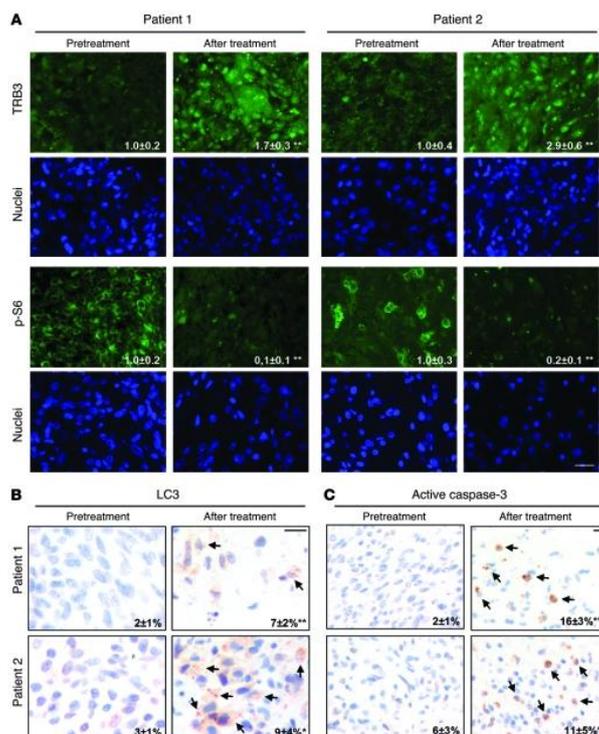


Figura 35

#### 4.1.3. Cannabinoidi e induzione di percorsi apoptotici e autofagici

L'analisi dei mediatori intracellulari di morte cellulare sia per autofagia che per l'apoptosi indotte dai cannabinoidi conduce all'identificazione di alcune molecole, come ceramide, specie reattive dell'ossigeno (ROS), chinasi mitogenica (MAPK), alcuni fattori di sopravvivenza e l'attività del RE sotto stress. **Ceramide** è una famiglia costituita da sostanze lipidiche, di solito formate da una sfingosina ed un acido grasso (vedi Figura 36), che fungono da trasmettitori di segnali per la regolazione cellulare della differenziazione, della proliferazione, della morte programmata e dell'apoptosi.

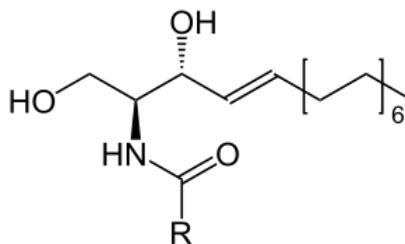


Figura 36

L'accumulo di ceramide mediata da recettori CB conduce all'apoptosi nelle cellule del mantello, della glia, del colon e del pancreas. L'aumento del livello di ceramide in genere può dipendere o dalla sintesi ex novo da parte della ceramide sintasi o dal rilascio da parte degli sfingolipidi di membrana provocato dall'attivazione di sfingomielinasi. Gli agonisti cannabinoidi legandosi ai recettori CB inducono l'attivazione della serina palmitoiltransferasi (SPT), che catalizza il primo step della sintesi ex novo degli sfingolipidi, e l'associazione tra la proteina G o/i e FAN, una proteina adattatrice, permette l'entrata di Ca<sup>2+</sup> nella cellula stimolando la sfingomielinasi a produrre ceramide. Di conseguenza si avrà una diminuzione della sfingomielina e l'accumulo intracellulare di ceramide, come documentato in astrociti primari da Sánchez e altri e nelle cellule C6 del glioma da Galve-Roperh e altri. Il legame tra l'attivazione del recettore e la generazione di ceramide è in gran parte sostenuta da studi completi sul fattore di necrosi tumorale (TNF) recettore 55-kDa, il recettore neurotrofina 75-kDa e CD95/Fas<sup>59</sup>. L'accumulo di ceramide comporta una perdita del potenziale di membrana dei mitocondri, un rilascio di Citocromo C, una frammentazione del DNA e l'attivazione delle caspasi 3, 7 e 8. Questi dati sono stati ottenuti tramite esperimenti su cellule Jurkat in cultura. Le cellule sono state trasferite in un mezzo privo di siero 30 minuti prima di eseguire i diversi trattamenti e sono stati mantenuti in questo mezzo per il resto dell'esperimento. Le cellule sono state pre-incubate con veicolo, o con corrispondente inibitore, per 20 minuti prima di aggiungere THC. Le dosi standard di THC, SR144528 e ISP-1 usate in questi esperimenti sono state rispettivamente 1.5, 2.0 e 1.0 mM. Le analisi del potenziale di membrana mitocondriale, della frammentazione del DNA e dell'attività delle caspasi sono state eseguite rispettivamente dopo 15 min, 1 h, 1 e 2 h, dall'aggiunta THC. L'analisi del potenziale di membrana è stata determinata in cellule trattate mediante centrifugazione a 1500 giri per 5 minuti, lavate e incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con un tampone più 0,25 micron di TMRM, un colorante permeabile per la cellula che diventa fluorescente una volta che è all'interno dei mitocondri. Poiché il potenziale di membrana mitocondriale è la forza motrice del pompaggio di TMRM in questo organello, la sua fluorescenza consente di quantificare il potenziale di membrana mitocondriale. Dopo l'incubazione per un ulteriore minuto con 1 mM di Hoechst 33258 l'intensità di fluorescenza è determinata utilizzando un citofluorimetro. Le Caspasi 3, 7 e 8 sono

---

<sup>59</sup> Sánchez, *The CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptor of Astrocytes Is Coupled to Sphingomyelin Hydrolysis through the Adaptor Protein Fan*, 2001.

state determinate utilizzando un substrato luminogenico. L'analisi del DNA nucleare avviene tramite citometria a flusso (FCM): Le cellule vengono trattate per centrifugazione a 1500 giri per 5 min, lavate e incubate in PBS, contenente 1% (w / v) di BSA, 30% di etanolo e 5 pg / ml Hoechst 33342 (un colorante che si lega al DNA e permette di quantificare il contenuto di DNA cellulare) per 30 min a temperatura ambiente. L'intensità della fluorescenza è stata analizzata utilizzando una citometria a flusso<sup>60</sup>. Un altro importante mediatore sono i **ROS** (Reactive Oxygen Species) che esercitano un ruolo fondamentale nell'attivare sia le caspasi esecutrici sia le iniziatrici. Il coinvolgimento dei ROS è stato ampiamente evidenziato nelle cellule leucemiche e un'ulteriore conferma è data dal fatto che utilizzando N-acetil-cisteina, un antiossidante che distrugge i ROS, si ha una attenuazione degli effetti dei cannabinoidi. Questi studi sono stati condotti su linee cellulari di linfoma murino EL-4 e su linee cellulari umane leucemiche Jurkat e MOLT-4 mantenute in terreno RPMI-1640. Le linee cellulari Jurkat e MOLT-4 sono state esposte a determinate concentrazioni di cannabidiolo (2.5 e 5 mM) e al veicolo per 24 h. Successivamente è stato determinato l'effetto sulla vitalità cellulare mediante trypan blue e l'induzione di apoptosi tramite il metodo TUNEL. I risultati hanno mostrato che l'esposizione a quantità  $\geq 2,5$  pM di cannabidiolo comporta una significativa diminuzione della vitalità cellulare tumorale e un aumento dei livelli di apoptosi. Successivamente, sono stati istituiti degli esperimenti per determinare il tempo più rapido in cui potrebbe essere rilevato il fenomeno apoptotico e sono state coltivate cellule Jurkat con CBD (5.0  $\mu$ M) per 8, 16, e 24 ore. Tramite saggio TUNEL si è dedotto che l'induzione dell'apoptosi da parte di CBD abbia il suo apice dopo un'esposizione di 24 ore; nei periodi temporali precedenti, potrebbero essere rilevati piccoli aumenti nella percentuale di apoptosi cellulare. Più in particolare, dopo 8 ore di esposizione al CBD i livelli di apoptosi sono aumentati dal 15,7% (veicolo) al 22,1% (CBD), dopo dal 10,9% (veicolo) al 19,9% (CBD) e dopo 24 h dal 6,4% (veicolo) al 48,7% (CBD). Più nello specifico si sono andati ad indagare gli effetti sul NADPH dell'esposizione di cellule Jurkat a CBD. Questi studi, confermati dall'analisi Western blot, hanno rivelato che l'esposizione a CBD ha portato ad un aumento significativo dei livelli di NOX4 e p22phox, mentre l'espressione di altre NAD (P) H ossidasi sono rimaste inalterate, dimostrando quindi che l'esposizione al cannabidiolo può indurre

---

<sup>60</sup> Herrera, *The CB2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway*, 2006.

apoptosi nelle cellule leucemiche umane<sup>61</sup>. I ROS agiscono sia promuovendo la traslocazione nucleare di GAPDH, ulteriormente amplificata dalla AMPK, con riduzione della glicolisi, sia determinando l'accumulo di NADH, che provoca un blocco della catena respiratoria, con inibizione del ciclo di Krebs. Queste alterazioni del metabolismo della cellula tumorale determinano una forte induzione di autofagia e l'inibizione della crescita cellulare<sup>62</sup>. E' stata dimostrata una elevata interazione tra ceramide e generazione dello stress ossidativo: ceramide stimola la formazione di ROS e dei meccanismi apoptotici, stabilendo un legame tra il metabolismo degli sfingolipidi e lo stress ossidativo. Inoltre l'inibizione dei ROS tramite attività enzimatica o con antiossidanti altera l'attivazione delle sfingomielinasi e la produzione di ceramide. Pertanto è plausibile ipotizzare che l'attivazione contemporanea di CB e TRPV recettori vanilloidi, responsabili per l'attivazione dei due mediatori intracellulari (ceramide e ROS), possa aumentare gli effetti indotti dai cannabinoidi svolgendo un ampliamento delle cascate delle caspasi. Lo studio sugli eventi a valle in seguito alla generazione di ROS e all'induzione di ceramide ha evidenziato il coinvolgimento di un terzo fattore importante nell'attività antitumorale, l' ER-stress. D'altra parte è stata ben documentata anche una relazione tra l'aumento del livello di ceramide e ER-stress nell'apoptosi indotta da cannabinoidi nelle cellule tumorali. Il **reticolo endoplasmatico** è un organulo che svolge un ruolo predominante in numerosi processi di fondamentale importanza per la sopravvivenza e per il normale funzionamento cellulare tra i quali vi è il ripiegamento ("folding"), le modificazioni post-traduzionali delle proteine di membrana secrete e il controllo di qualità di quest'ultime. L'azione del ER sul folding delle proteine è altamente sensibile a infatti in caso di alterazioni, come squilibri del calcio, stress ossidativo o ripiegamento di proteine, si ha una modificazione della capacità del folding del ER, la quale si manifesta con un accumulo e aggregazione di proteine non ripiegate o mal ripiegate nel lume del reticolo stesso, dando vita a una condizione indicata con il nome di stress del reticolo endoplasmatico (ER-stress) che può portare a risposte cellulari diverse. Tale formazione di aggregati proteici è tossica per le cellule e rappresenta la base biochimica di numerose condizioni fisiopatologiche associate allo stress del reticolo endoplasmatico (ER stress) inclusi i tumori. Nel caso di ER-stress le cellule producono un processo di risposta chiamato Unfolded Protein Response (UPR)

---

<sup>61</sup> McKallip, *Cannabidiol-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: A Novel Role of Cannabidiol in the Regulation of p22<sup>phox</sup> and Nox4 Expression*, 2006.

<sup>62</sup> Dando, *Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells*, 2010.

(vedi Figura 37). Questa complessa risposta cellulare è mediata dall'attivazione di tre recettori trans membrana del reticolo (Sensori di stress) denominati rispettivamente: chinasi pancreatica ER (PERK), Fattore trascrittivo Attivante 6 (ATF6) e enzima inositolo-requiring 1 (IRE1)<sup>63</sup>. L'UPR una volta attivato in un primo momento determina la sopravvivenza cellulare tramite l'aumento del livello di GRP78, il principale HSP70 intraluminare che protegge le cellule dalle lesioni. Tuttavia se l'aggregazione delle proteine è persistente e lo stress non può essere risolto, l'UPR induce l'arresto del ciclo cellulare e successivamente l'apoptosi. Sebbene l'esatto meccanismo molecolare non sia noto, sembra che l'apoptosi, indotta da stress del reticolo, sia mitocondrio-dipendente e consista nell'attivazione del fattore di trascrizione bZIP ATF4 (fattore di trascrizione attivante 4) che codifica per la CHOP, una proteina pro-apoptotica (CCAAT proteina /-enhancer-binding proteina omologa). CHOP provoca una down-regulation della proteina anti-apoptotica mitocondriale Bcl-2, favorendo un attività pro-apoptotica nei mitocondri tramite il rilascio di citocromo C e l'attivazione della caspasi 3. L'up-regulation dell'espressione della proteina CHOP deve essere però preceduta dall'attivazione della via PERK-eIF2-ATF4. Oltre alla CHOP, l'ER stress stimola l'attivazione di altri fattori proapoptotici quali il JNK e la caspasi 12<sup>64</sup> e innesca l'autofagia se il livello del target CHOP/TRB-3 aumenta in modo significativo. In molti modelli tumorali sperimentali, elevati livelli di ROS inducono ER-stress come dimostrato dall'incremento del livello di mediatori specifici di ER-stress (P8, CHOP, TRB-3 e GRP-78) che, a loro volta, sono responsabili dell'attivazione della via intrinseca apoptotico mitocondriale. Infine è stata documentata anche un'attivazione dell'asse p8/CHOP nell'apoptosi indotta da cannabinoidi.

---

<sup>63</sup> Camboni, *Ruolo dello stress del reticolo endoplasmatico nel processo apoptotico indotto dall'acido lipoico in linee cellulari di epatoma*, 2004.

<sup>64</sup>Oyadomari, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*, 2003.

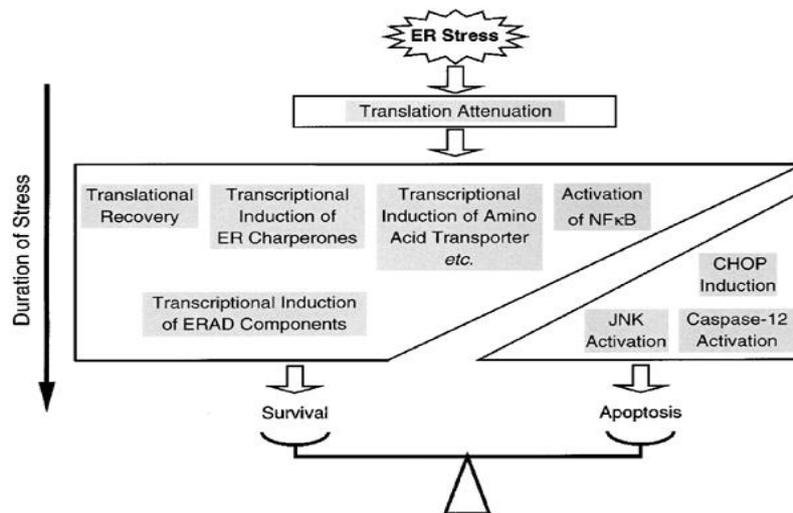


Figura 37

Un nuovo studio recente sulla interazione tra autofagia e apoptosi ha mostrato in linfomi di cellule del mantello che i cannabinoidi riducono la vitalità cellulare senza l'avvio della cascata ad opera di caspasi-3e attraverso la formazione di vacuoli citoplasmatici cicloeximide-sensibili. Tuttavia, la mancanza di una maggiore formazione e il contributo dell'autofagosoma lisosomiale escludono il coinvolgimento di un processo canonico autofagico. Gli autori hanno quindi ipotizzato che le caratteristiche osservate assomiglino a una morte cellulare simile alla paraptosi, un terzo tipo di morte cellulare programmata, non precedentemente descritta in risposta ai cannabinoidi. L'attivazione di più tipi di morte cellulare da parte dei cannabinoidi allarga il loro utilizzo nel potenziale terapeutico in cellule che sovraesprimono i recettori dei cannabinoidi<sup>57</sup>.

#### 4.2. Effetti sinergici dei cannabinoidi in combinazione con altri farmaci

Recenti studi hanno dimostrato la capacità di cannabinoidi di sinergizzare con altre molecole per innescare percorsi di morte in cellule tumorali. È ben noto che nella terapia del cancro l'impiego di combinazioni di farmaci, piuttosto che un singolo farmaco, rappresenti una strategia terapeutica con buoni vantaggi tra i quali i principali sono la contemporanea attivazione di diverse vie biochimiche, con effetti sinergici, e la riduzione della dose con riduzione degli effetti collaterali. Pertanto si sono concentrate le ricerche sull'accoppiamento dei cannabinoidi con altri farmaci, per migliorare la loro attività antitumorale dimostrando che il cannabinoide sintetico WIN55,212-2 stimola le cellule con carcinoma epatocellulare all'apoptosi, mediata dal Tumor Necrosis Factor-

Related Apoptosis-Inducing Ligand, (TRAIL). Essa è una citochina che viene prodotta dalla maggior parte delle cellule ed è in grado di legarsi a determinati recettori di morte chiamati anche recettori del fattore di necrosi tumorale (DR4 o TRAIL-RI e DR5 o TRAIL-RII) stimolando l'apoptosi cellulare. Il legame TRAIL-DR5 comporta l'attivazione della via apoptotica estrinseca, consistente nell'attivazione delle caspasi-8 e successivamente delle caspasi effettrici a valle (procaspasi 3, 6 e 7)<sup>65</sup>, e la diminuzione del livello di c-FLIP, una proteina antiapoptotica che opera come un antagonista endogeno di caspasi-8 (vedi Figura 38). Questo evento sembra essere correlato all'aumento del livello di p8 e CHOP, due fattori implicati nella risposta allo stress ER e apoptosi. Inoltre il trattamento con WIN55,212-2 induce anche una downregulation marcata di alcuni fattori di sopravvivenza. Pertanto sia l'induzione della DR5 che la diminuzione dei fattori di sopravvivenza spiegano gli effetti sinergici dei farmaci in cellule di carcinoma epatocellulare<sup>66</sup>.

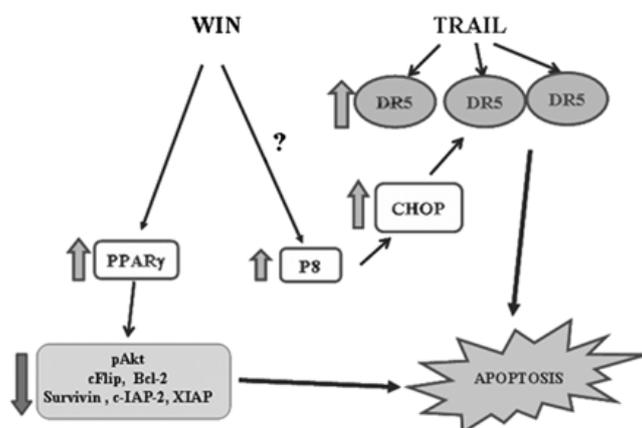


Figura 38

I dati non pubblicati ottenuti in cellule di osteosarcoma sembrano indicare che WIN sia in grado di innescare anche un percorso autofagico con l'aumento del livello di beclin LC-1 e II-3. Inoltre in cellule tumorali pancreatiche la combinazione di cannabinoidi con **gemcitabina**, un analogo delle pirimidine largamente impiegato nella terapia antitumorale, induce effetti sinergici attraverso l'attivazione dell'autofagia. In questo

<sup>65</sup> Song, *Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily*, 2008.

<sup>66</sup> Pellerito, *The Synthetic Cannabinoid WIN 55,212-2 Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Induced Apoptosis by Activating p8/CCAAT/Enhancer Binding Protein Homologous Protein (CHOP)/Death Receptor 5 (DR5) Axis*, 2010.

caso gemcitabina induce una upregulation di entrambi i recettori CB sensibilizzando quindi le cellule agli effetti dei cannabinoidi. Un ruolo centrale in questa via sembra essere legato all'aumento della produzione di ROS, indotto da ER-stress, che stimola tramite via specifica una morte cellulare di tipo II (autofagia). Un'osservazione curiosa circa il potenziale terapeutico dei cannabinoidi è che nel primo caso sono loro stessi in grado di sensibilizzare le cellule a TRAIL provocando morte cellulare, mentre nel secondo la stimolazione della morte cellulare cannabinoide-indotta è potenziata dall'aggiunta di gemcitabina in cellule del tumore pancreatico. Un altro esempio di effetti sinergici di cannabinoidi con altri farmaci è stata riportata anche da Gustafsson e altri che hanno dimostrato come il cannabinoide sintetico HU210, l'anandamide e dei suoi derivati induca effetti sinergici e citotossici, piuttosto che antiproliferativi quando sono impiegati in combinazione con **5-fluorouracile** (5-FU), l'antagonista della pirimidina classica, nelle cellule di carcinoma del colon-retto. Gli autori riportano che l'effetto non sembra coinvolgere i recettori dei cannabinoidi e suggeriscono che l'effetto sia dovuto al coinvolgimento di ER-stress, in quanto in seguito all'utilizzo di comuni antiossidanti si ha un'attenuazione della citotossicità data dai cannabinoidi<sup>57</sup>. La somministrazione combinata di THC e **temozolomide**, l'agente di riferimento per la gestione del glioblastoma multiforme, comporta lo sviluppo di un processo autofagico come principale effetto antitumorale, che si osserva anche in tumori che sono resistenti al trattamento con temozolomide. Il trattamento combinato THC/temozolomide favorisce il processo autofagico, mentre l'inibizione farmacologica o genetica di questo evita gli effetti del trattamento combinato, sostenendo che l'attivazione dell'autofagia gioca un ruolo fondamentale nel meccanismo di azione di questa combinazione di farmaci.

## Conclusioni

Sulla base delle ricerche fin qui trattate, ho evinto che i cannabinoidi possono avere, con i dovuti accorgimenti, un ottimo potenziale antitumorale. Essi, tramite l'induzione del processo apoptotico e autofagico, provocano la morte della cellula tumorale, con una riduzione delle dimensioni dei tumori sia in vitro (su diverse linee cellulari tumorali) sia in vivo. I cannabinoidi sono inoltre in grado di ridurre alcuni sintomi ed effetti collaterali dovuti alla patologia tumorale. Sono infatti presenti prove che ci permettono di affermare che, con trattamenti adiuvanti, i cannabinoidi siano in grado di provocare un aumento dell'appetito, una riduzione della nausea e del vomito e un alleviamento del dolore neuropatico nei pazienti affetti da patologia neoplastica. I problemi principali di un utilizzo terapeutico duraturo di questi composti sono evidenziati da alcuni aspetti tossicologici, come il deterioramento, che culmina con la morte cellulare, dei tessuti neuronali, l'effetto psicoattivo e l'induzione di dipendenza psicologica e in parte fisica, che si hanno in pazienti trattati con cannabinoidi. A causa poi del numero esiguo di esperimenti su pazienti oncologici, riportati in letteratura, è ad oggi difficile ipotizzare un possibile impiego in ambito terapeutico a breve termine. Un altro problema riscontrato è la via di somministrazione, in quanto, come già ampiamente dimostrato, l'assunzione tramite fumo di sigaretta comporta, a causa della combustione, la formazione di radicali liberi e di neoplasie a livello polmonare, ma anche una assunzione per via orale presenta dei dubbi in quanto il dosaggio è più difficilmente controllabile e si potrebbero manifestare quegli effetti psicoattivi mal tollerati dai pazienti. Vanno quindi approfonditi sia gli effetti antineoplastici sui pazienti sia le vie di somministrazione, tramite esperimenti volti ad individuare i rapporti rischi/benefici e gli aspetti farmacocinetici di una terapia di lungo corso. La sfida principale per l'uso medico dei cannabinoidi è poi lo sviluppo di metodi sicuri ed efficaci per l'uso che portino ad effetti terapeutici e che evitino gli effetti psicoattivi avversi. In questo senso sta operando l'azienda farmaceutica GW, ormai leader nella produzione di farmaci derivati dai cannabinoidi, tra i quali spicca il Sativex. L'Azienda citata sta portando avanti varie ricerche, in collaborazione con l'Otsuka Pharmaceutical, sia in ambito terapeutico, con importanti risultati basati su dati pre-clinici sugli effetti anti-cancro di alcuni cannabinoidi, sia in ambito botanico con la selezione di determinate varietà contenenti un prefissato contenuto di cannabinoidi e ottenute tramite la manipolazione genetica. Alcuni ricercatori sono infatti riusciti, tramite modifica dei geni presenti su

quattro loci diversi, ad ottenere diverse varietà di Cannabis, in grado di sintetizzare preferenzialmente un cannabinoide rispetto ad un altro con alta specificità per il THC, il CBD e il CBG. Queste ricerche possono rappresentare un fondamentale punto di partenza per ottenere estratti di piante potenziati nell'attività terapeutica e che siano esenti dagli effetti collaterali tipici degli agonisti classici cannabinoidi.

## Bibliografia

Ambrosini, Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving, *Nature* 396, Pages 580-584, 1998.

Artal-Sanz, Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration, *Febs Letters*, Vol 579, Issue 15, Pages 3287–3296, 2005.

Begbie, Cannabinoid receptor, CB1, expression follows neuronal differentiation in the early chick embryo, *Journal of Anatomy* Vol 205, Issue 3, pages 213–218, 2004.

Bellamoli , Il sistema endocannabinoide e le sue funzioni, Dipartimento per le politiche antidroga CAP IV.1, 2010.

Berghuis, Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor, *PNAS*, Vol. 102 no. 52 , Pages 19115–19120, 2005.

Berrendero, Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period, *Synapse*, Vol 33(3) Pages 181-91,1999.

Brenneisen, The effect of orally and rectally administered delta-9 tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients, *Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol 34(10) Pages 446-52, 1996.

Bisogno, Endogenous Cannabinoids: Structure and Metabolism, *Journal of Neuroendocrinology*, Vol 20, Issue Supplement s1, Pages 1–9, 2008.

Bruni, *Farmacognosia generale e applicata*, Piccin, 2005.

Calvaruso, Cannabinoid-associated cell death mechanisms in tumor models (Review), *International Journal of Oncology*, Vol 41, Pages 407-413, 2012.

Camboni, Ruolo dello stress del reticolo endoplasmatico nel processo apoptotico indotto dall'acido lipoico in linee cellulari di epatoma, Tesi di dottorato, Università degli Studi di Cagliari, 2004.

Capasso, Farmacognosia : Botanica, Chimica E Farmacologia Delle Piante Medicinali, Springer, 2011.

Cappuccino, Dolce Vita, 12/2005.

Chevalere, Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS, Annual Review of Neuroscience Vol. 29 Pages 37-76, 2006.

Dando, Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells, Cell Death and Disease, Vol 4, e664; doi:10.1038/cddis.2013, Published online, 2013.

Dewick, Chimica biosintesi e bioattività delle sostanze naturali, Piccin, 2000.

Dickason-Chesterfield, Pharmacological characterization of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase inhibitors, Cellular and Molecular Neurobiology, Vol 26, Issue 4-6, Pages 405-42, 2006.

Di Marzo, Endocannabinoids: synthesis and degradation, Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol 160, Pages 1-24, 2006.

Eduardo Tibiriça, The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake, Diabetology & Metabolic Syndrome , 2:5 doi:10.1186/1758-5996-2-5, 2010.

ElSohly, Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, Life Sciences Volume 78, Issue 5, Pages 539–548, 2005.

ElSohly, Marijuana and the cannabinoids, Humana Press, 2007.

Evans, Inhibition of A23187–induced release of leukotriene B<sub>4</sub> in mouse whole blood Ex vivo and human polymorphonuclear cells in vitro by the cannabinoid analgesic cannabidiol, Phytotherapy Research, Vol 5, Issue 6, Pages 258–261, 1991.

Fernandez-Ruiz, The endogenous cannabinoid system and brain development, Trends in Neurosciences, Vol 23, Issue 1, Pages 14–20, 2000.

Freund, Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling, Physiological Review, Vol. 83 no. 3, Pages 1017-1066, 2003.

Grinspoon, Marijuana Reconsidered, Quick American Archives, 1994.

Grotenhermen, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids, Clinical pharmacokinetics, Vol 42(4), Pages 327-60, 2003.

Guy, A phase I, double blind, three-way crossover study to assess the pharmacokinetic profile of cannabis based medicine extract (CBME) administered sublingually in variant cannabinoid ratios in normal healthy male volunteers (GWPK0215), Journal of Cannabis Therapeutics, Vol 3/4, Pages 121-152, 2004.

Nahas, Marijuana and Medicine, Humana Press, 1999.

Harvey, Examination of a 140 year old ethanolic extract of Cannabis: identification of new cannabitrinol homologues and the ethyl homologue of cannabiniol, In Marijuana '84, Proceedings of the Oxford symposium on Cannabis. Oxford, UK: IRL Press, 23–30, 1985.

Herkenham, Cannabinoid receptor localization in brain, PNAS, Vol. 87 no. 5, Pages 1932–1936, 1990.

Herrera, The CB2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation of the mitochondrial intrinsic pathway, Experimental Cell Research, Vol 312, Issue 11, Pages 2121–2131, 2006.

Hunt, Evidence that cannabidiol does not significantly alter the pharmacokinetics of tetrahydrocannabinol in man, Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics, Vol 9(3), Pages 245-60, 1981.

Kuma, Robbins Basic Pathology, W B Saunders Co, 2007.

Lembke, Foye's principi di chimica farmaceutica, Piccin, 2010.

Leporatti, Testo atlante di anatomia vegetale e delle piante officinali, Piccin-Nuova Libreria, 1997.

Mackie, Signaling via CNS Cannabinoid Receptors, Molecular and Cellular Endocrinology, Vol 286, Issues 1–2, Supplement 1, Pages S60-S65 , 2008.

McArdle, Selective inhibition of delta-9-tetrahydrocannabinol metabolite formation by cannabidiol in vitro, in Proceedings of the BTS Annual Congress. Toxicology 168, Pages 133–134, 2001.

McKallip, Cannabidiol-Induced Apoptosis in Human Leukemia Cells: A Novel Role of Cannabidiol in the Regulation of p22<sup>phox</sup> and Nox4 Expression, *Molecular Pharmacology*, Vol. 70no. 3, Pages 897-908, 2006.

McPartland, Cannabis and cannabis extracts: greater than the sum of their parts?, *Journal of Cannabis Therapeutics* Vol 1, Issue 3-4, Pages 103-132, 2001.

Mechoulam, Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Cannabis, *Chemical. Review*, Vol 76 (1), Pages 75–112, 1974.

Meschler, Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol 62, Issue 3, Pages 473–480, 1999.

Mirza, Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway, *Oncogene*, Vol 21, Number 17, Pages 2613-2622, 2002.

Morgan, Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis, *The British Journal of Psychiatry*, Vol 192, Pages 306-307, 2008.

Osbaldeston, *Dioscoride. Materia Medica, cinque libri in un unico*, Ibis Press, 2000.

Oyadomari, Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress, *Cell Death and Differentiation* Vol 11, Pages 381–389, 2003.

Park, Antiproliferative Mechanism of a Cannabinoid Agonist by Cell Cycle Arrest in Human Gastric Cancer Cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, Vol 112, Issue 4, Pages 1192–1205, 2011.

Pellerito, The Synthetic Cannabinoid WIN 55,212-2 Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Induced Apoptosis by Activating p8/CCAAT/Enhancer Binding Protein Homologous Protein (CHOP)/Death Receptor 5 (DR5) Axis, *Molecular Pharmacology*, Vol. 77 no. 5, Pages 854-863, 2010.

Pertwee, *Cannabinoids*, Springer, 2004.

Pinna, Sintesi e attività cannabinergica di nuove molecole a struttura 1H-4-Diidropirazolo[3,4-a]pirrolizinica, 1H-4,5-Diidropirazolo[4,3-g] indolizinica e 1H-

4,5,6-Tetraidropirazolo[3,4-c]pirrolo, Tesi di dottorato, Università degli studi di Sassari, 2010.

Porter, Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck Publishing, 2011.

Priyamvada Sharma, Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications, Iran Journal of Psychiatry. Vol 7(4), Pages149-56, 2012.

Rang, Farmacologia, Elsevier , 2009.

Robson, Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids, The British Journal of Psychiatry, Vol 178, Pages 107-115, 2001.

Salazar, Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, The Journal OF Clinical Investigation, Vol 119(5), Pages 1359-72, 2009.

Samorini, L'erba di Carlo Erba. Per una storia della canapa indiana in Italia 1845-1948, Nautilus, 1996.

Sánchez, The CB<sub>1</sub> Cannabinoid Receptor of Astrocytes Is Coupled to Sphingomyelin Hydrolysis through the Adaptor Protein Fan, Molecular Pharmacology, Vol. 59 no. 5, Pages 955-959, 2001.

Sarfraz, Cannabinoid Receptor Agonist-induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells LNCaP Proceeds through Sustained Activation of ERK1/2 Leading to G<sub>1</sub> Cell Cycle Arrest, Journal of Biological Chemistry, Vol 281, Pages 39480-39491, 2006.

Scheda tecnica Cannabis e derivati, Sistema Nazionale di Allerta Precoce, Dipartimento Politiche Antidroga, Presidenza del Consiglio dei Ministri, 2010.

Sini, Segnali di proliferazione e apoptosi sono sotto controllo genetico durante la cancerogenesi epatica di ratto, Tesi di dottorato Università degli studi di Sassari, 2008.

Song, Differential cleavage of Mst1 by caspase-7/-3 is responsible for TRAIL-induced activation of the MAPK superfamily, Cellular Signalling, Vol 20, Issue 5, Pages 892–906, 2008.

Stein, Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment, Endocrine-Related Cancer, Vol 8, Pages 237-238, 2001.

Tarugi, Patologia. Apoptosi, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, 2013.

Treccani, Autofagia , Enciclopedia italiana, 2010.

Trezza, Cannabis and the developing brain: Insights from behavior, *European Journal of Pharmacology*, Vol 585, Issues 2–3, Pages 441–452, 2008.

Wall, Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women, *Clinical pharmacology and therapeutics*, Vol 34(3), Pages 352-63, 1983.

Zuardi, History of cannabis as a medicine: a review, *Revista Brasileira de Psiquiatria*, vol.28 no.2, 2005.

## **Ringraziamenti**

In ambito scolastico mi sento di ringraziare tutta la scuola pubblica italiana, dalle elementari all'università, troppe volte bistrattata da ministri/politici incapaci e ignoranti, nonché dagli stessi studenti e Prof che spesso non sono in grado di guardare al di là del proprio naso. Per quanto riguarda il liceo voglio ringraziare le Prof Castellani e Trevisan. Quest'ultima soprattutto, dopo avermi legnato per bene i primi 6 mesi, mi ha insegnato cosa vuol dire studiare e mi ha dato una seconda possibilità, senza di lei difficilmente sarei uscito dal liceo e dall'università. Per quanto riguarda l'università ringrazio tutti i Prof, che me l'hanno fatta sudare parecchio ma sono sempre stati completi, seri e professionali. In particolare vorrei ringraziare il Prof Canna, un grande, e la Prof Vezzalini per avermi aiutato con la tesi nella ricerca di trattati di botanica. Un ringraziamento speciale va alla mia Relatrice, la Prof Renata Battini, perché ha creduto in me, mi ha seguito, sostenuto e insegnato ad avere un occhio critico su tutto, grazie Prof. Ringrazio poi il dottor Gianpaolo Grassi e il Cra di Rovigo che mi hanno permesso di consultare il materiale a loro disposizione fondamentale per la tesi. Ringrazio infine la farmacia Ponte Catena, comprendente l'Elena Manfrin, la Silvana, la Tati, la dottoressa Enza, la Veronica, la Elena e soprattutto il Killer Piero per avermi insegnato moltissimo e sopportato con così tanta pazienza.

Ah dimenticavo un ringraziamento va anche a Maria compagna di avventure e serate.