

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA**

**Scuola di Dottorato in Scienze Biologiche e Mediche**

**Corso di dottorato in Neurobiologia**



**MECCANISMI CELLULARI IMPLICATI NELL'EFFETTO  
ANTITUMORALE DEL CANNABIDILOLO SU CELLULE  
DI GLIOMA UMANO U87-MG E CARATTERIZZAZIONE  
DELLE SUE PROPRIETÀ ANTIANGIOGENICHE**

Coordinatore: Prof.ssa **Daniela PAROLARO**

Docente guida: Dott.ssa **Paola MASSI**

Tesi di Dottorato di:

**Dott.ssa Marta SOLINAS**

# **INDICE**

<b><u>1. RIASSUNTO</u></b>	<b>5</b>
<b><u>2. INTRODUZIONE</u></b>	<b>8</b>
I CANNABINOIDI	9
IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	10
I GLIOMI	14
L'ANGIOGENESI TUMORALE	15
CANNABINOIDI E GLIOMI	18
IL CANNABIDILOLO	19
LA CANNABIDIVARINA	22
LA $\Delta^9$ -TETRAIDROCANNABIVARINA	23
IL CANNABIGEROLO	23
<b><u>3. SCOPO DEL LAVORO</u></b>	<b>25</b>
<b><u>4. MATERIALI E METODI</u></b>	<b>28</b>
TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	29
COLTURE CELLULARI	29
MANTENIMENTO DELLE CELLULE IN COLTURA	30
MTT TEST	31
TRYPAN BLUE TEST	32
ANALISI CITOFLUORIMETRICA	32
WESTERN BLOT - PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI CELLULARI	33
WESTERN BLOT - DOSAGGIO PROTEICO: SAGGIO DELL'ACIDO BICINCONICO (BCA)	33
WESTERN BLOT – SDS-PAGE	34

TECNICHE PER L'INDUZIONE DELL'IPOSSIA	35
HUMAN ANTIBODY ARRAY KIT/PROTEOME PROFILER	36
DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI MMP-2: TEST ELISA	37
TEST DI MIGRAZIONE CELLULARE - SCRATCH WOUND HEALING ASSAY	38
TEST DI MIGRAZIONE CELLULARE: BOYDEN CHAMBER ASSAY	38
TEST DI INVASIONE CELLULARE: BOYDEN CHAMBER ASSAY	39
SAGGIO DI MORFOGENESI IN PRESENZA DI MATRIGEL	40
SAGGIO DI ANGIOGENESI <i>IN VITRO</i> CON L'UTILIZZO DI SFEROIDI	40
ANGIOGENESI <i>IN VIVO</i>	41
ANALISI STATISTICA	42
<b><u>5. RISULTATI</u></b>	<b>43</b>
EFFETTO DEL CBD SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG	44
EFFETTO DEL CBD SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG	44
IDENTIFICAZIONE DI PATHWAY DEL SEGNALE MODULATI DA CBD IN CELLULE U87-MG	44
EFFETTO DEL CBD SULL'ESPRESSIONE DI HIF-1 $\alpha$ IN CELLULE U87-MG	45
EFFETTO DEL CBD SUL PROFILO DI ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE IN CELLULE U87-MG	45
EFFETTO DEL CBD SULLA VITALITÀ DI CELLULE ENDOTELIALI HUVEC	47
EFFETTO DEL CBD SULLA MIGRAZIONE DI CELLULE HUVE	47

EFFETTO DEL CBD SUL PROFILO DI ESPRESSIONE DI PROTEINE CORRELATE ALL'ANGIOGENESI IN CELLULE HUVE	48
EFFETTO DEL CBD SULLA MORFOGENESI ENDOTELIALE <i>IN VITRO</i>	49
EFFETTO DEL CBD SULLA FORMAZIONE DI STRUTTURE SIMILI A CAPILLARI A PARTIRE DA SFEROIDI DI CELLULE HUVE	49
EFFETTO DEL CBD SULL'ANGIOGENESI <i>IN VIVO</i>	50
EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG	51
EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G	51
EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG	52
EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G	52
EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG	53
EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G	53
IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI COINVOLTI NEGLI EFFETTI DI CBDV, THCV E CBG	54
<b><u>6. DISCUSSIONE</u></b>	<b>55</b>
<b><u>7. FIGURE</u></b>	<b>69</b>
<b><u>8. BIBLIOGRAFIA</u></b>	<b>91</b>

# **1. RIASSUNTO**

I gliomi sono i più comuni tumori primari che interessano il cervello e sono classificati in quattro gradi clinicamente distinti che vanno da basso (grado I) ad elevato (grado IV). Tra questi il più maligno è il glioblastoma, tumore infiltrativo, multifocale, ad alta attività proliferativa ed elevata eterogeneità. L'aggressività e la prognosi negativa del glioblastoma dipendono in larga parte dall'alto tasso di recidiva che rende i più comuni approcci terapeutici, quali la chemioterapia e la radioterapia, inefficaci a debellare completamente il tumore.

A questo proposito studi condotti sia *in vitro* sia *in vivo* dimostrano che il principio attivo della *Cannabis sativa*, il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC), possiede un significativo effetto antitumorale nei confronti di diversi tipi di glioma. Ma la *Cannabis* contiene anche altri fitocannabinoidi e tra questi il mio gruppo di ricerca ha focalizzato l'attenzione sulle potenzialità di un derivato non psicoattivo, il cannabidiolo (CBD) come farmaco in grado di ridurre la crescita e/o la migrazione di linee di glioma umano. Si è così dimostrato che il CBD limita efficacemente la crescita delle cellule di glioma umano U87-MG e U373 sia *in vitro* sia *in vivo*, inducendo apoptosi e stress ossidativo. Tuttavia, ad oggi non è stata ancora indagata la capacità del CBD di limitare l'invasività delle cellule di glioma e di interferire con i più rilevanti pathway intracellulari coinvolti nello sviluppo tumorale.

In questa tesi si dimostra che il CBD inibisce *in vitro* l'invasività di cellule di glioma umano U87-MG e induce una diminuzione dell'espressione di un gruppo di proteine coinvolte in maniera specifica nella crescita, nell'invasività e nell'angiogenesi tumorali. Inoltre, l'esposizione di queste cellule al CBD causa una downregolazione concentrazione-dipendente dei pathway di segnalazione di ERK e Akt, che inducono segnali di sopravvivenza cellulare, e una diminuzione nell'espressione del fattore inducibile da ipossia HIF-1 $\alpha$ .

Poiché l'elevato tasso di proliferazione vascolare è un tratto distintivo dei gliomi che rende conto in grande parte della loro aggressività e delle basse prospettive di vita dei pazienti, ho successivamente voluto valutare se il CBD, oltre ai ben noti effetti antitumorali, potesse anche inibire il processo angiogenico. Si dimostra così che il CBD è in grado di indurre citostasi in cellule endoteliali isolate da cordone ombelicale umano (HUVEC), senza induzione di apoptosi. Il CBD inibisce la migrazione e l'invasività di queste cellule, la loro capacità di formare strutture tridimensionali tubulari *in vitro*, ed infine inibisce fortemente l'angiogenesi *in vivo* valutata nel topo mediante l'inoculo sottocute di spugne di matrigel. Questi effetti sono associati ad una significativa diminuzione dei livelli di diverse proteine

con un ruolo fondamentale nei processi di angiogenesi, quali MMP-2 ed MMP-9, TIMP-1, la SerpinaE1/PAI-1, uPA, CXCL16, l'Endotelina-1, PDGF-AA ed IL-8.

Nel complesso, questi dati forniscono nuove evidenze dell'azione antitumorale del CBD, dimostrando che molti aspetti dello sviluppo tumorale e diversi pathway intracellulari vengono modulati da questa molecola. Inoltre, la presente tesi dimostra per la prima volta che il CBD è in grado di inibire l'angiogenesi, sia *in vitro* sia *in vivo*, modulando diverse proteine coinvolte nel processo. Dato che il CBD è un composto naturale privo di effetti psicotropi e collaterali, il suo duplice effetto, sia su cellule di glioma sia su cellule endoteliali, rafforza l'ipotesi che questa molecola possa rappresentare un efficace agente nel trattamento del glioma, anche in associazione con le terapie antitumorali convenzionali.

Infine, sulla base dei promettenti risultati ottenuti con il CBD, ho voluto valutare se anche altri fitocannabinoidi non psicoattivi o debolmente psicoattivi e ad oggi poco caratterizzati potessero modulare la crescita dei gliomi. A tale riguardo sono stati testati tre fitocannabinoidi: la cannabidivarina (CBDV), la  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) ed il cannabigerolo (CBG). Tutti e tre i composti sono in grado di inibire, con diversa efficacia, la vitalità di due linee cellulari di glioma umano, U87-MG e T98G, attraverso meccanismi non mediati dai recettori dei cannabinoidi CB1 e CB2, né dal recettore per i vanilloidi TRPV1. Oltre all'inibizione della vitalità cellulare, tutti e tre i derivati possiedono una significativa attività antimigratoria ed anti-invasiva.

I nostri risultati contribuiscono, quindi, a chiarire la farmacologia di queste molecole e, sebbene ulteriori indagini siano necessarie per comprendere i meccanismi cellulari alla base dei loro effetti, incoraggiano studi futuri per valutare il loro possibile impiego nel trattamento dei gliomi, anche in associazione con altri trattamenti chemio e radioterapici.

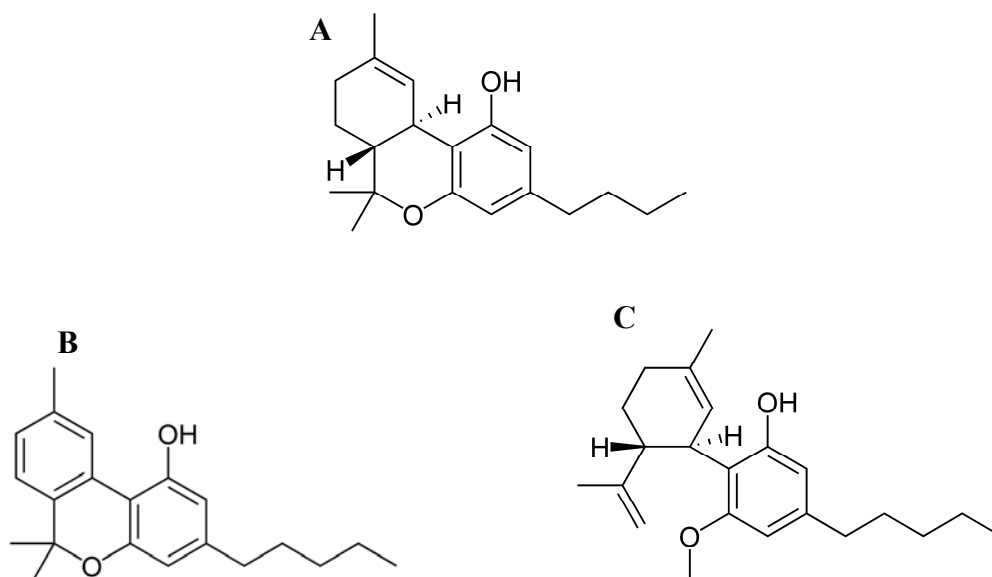


## **2. INTRODUZIONE**

## I CANNABINOIDI

La *Cannabis sativa* è utilizzata da secoli per preparazioni impiegate sia a scopo medicinale sia ricreativo. Tale pianta produce circa 400 composti, dei quali circa una sessantina sono composti attivi noti come cannabinoidi (CB). Dalla scoperta e identificazione della struttura chimica del principale costituente attivo della marijuana, il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC) (Gaoni e Mechoulam, 1964), sono stati condotti e pubblicati numerosi studi riguardanti la chimica, la biochimica, la farmacologia e gli effetti clinici di tale composto. Tuttavia, consistenti evidenze hanno dimostrato che gli effetti della marijuana non sono dovuti solo al THC (Grinspoon *et al.*, 1997), ma anche ad altre sostanze che, sintetizzate dalla *Cannabis sativa*, sono in grado di aumentare o diminuire la potenza del THC stesso attraverso meccanismi non ancora identificati.

Tali sostanze, il cui numero e quantità variano a seconda del clima, del suolo, delle varietà coltivate e dalla parte della pianta utilizzata per l'estrazione, formano la categoria dei fitocannabinoidi, i cui rappresentanti più abbondanti, oltre al THC, sono il cannabinolo (CBN), molecola debolmente psicoattiva che si forma spontaneamente dal THC, e il cannabidiolo (CBD), precursore del THC privo di attività psicotropa (Mechoulam e Gaoni, 1965).



**Fig. A.** Struttura molecolare dei tre principali cannabinoidi: (A)  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC), (B) cannabinolo (CBN), (C) cannabidiolo (CBD)

Dati gli effetti fisiologici di questi cannabinoidi, ci si è chiesti quale meccanismo fosse alla base delle loro azioni.

## **IL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE**

In passato si riteneva che i cannabinoidi, data la loro natura lipofila, agissero sulle cellule inserendosi nel doppio strato fosfolipidico delle membrane plasmatiche alterandone le proprietà (Makriyannis, 1995). Tuttavia negli ultimi anni si sono accumulati numerosi dati in contrasto con questa ipotesi culminati con l'identificazione nel 1988 dei recettori per i cannabinoidi, CB1 e CB2 (Devane *et al.*, 1988), e con la loro successiva caratterizzazione e clonazione. Essi appartengono alla famiglia di recettori accoppiati alle proteine G e sono caratterizzati dalla presenza di sette domini transmembrana (Munro *et al.*, 1993). Il secondo ed il terzo "loop" intracellulari sembrano essere, insieme al dominio C-terminale, i domini maggiormente coinvolti nella selettiva interazione con le G-proteine inibitorie di tipo Gi e Go. Inoltre, il recettore CB2 mostra un'omologia del 44%, di cui il 68% nelle regioni transmembrana, con il recettore CB1 (Pertwee, 1997).

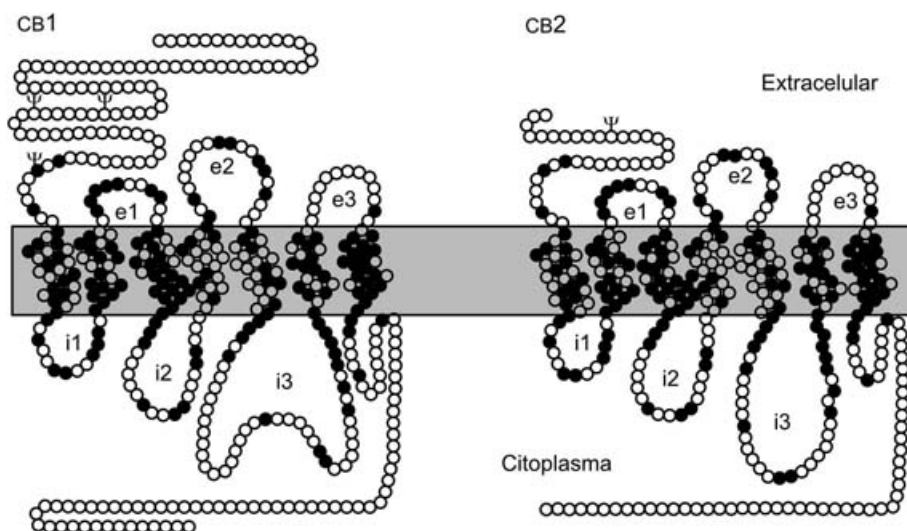
L'espressione del recettore CB1 è abbondante nel cervello, in particolare in zone distinte che sono coinvolte nel controllo delle attività motorie (gangli basali e cervelletto), della memoria e della cognizione (corteccia e ippocampo), delle emozioni (amigdala), della percezione sensoriale (talamo) e delle funzioni autonome ed endocrine (ipotalamo), ma il recettore CB1 è espresso anche nei terminali dei nervi periferici e in vari siti non neuronali quali l'endotelio vascolare, gli organi riproduttivi, il cuore, il fegato, l'intestino, il tessuto osseo e quello adiposo (Pertwee, 2005a; Bifulco *et al.*, 2006). L'azione centrale e molti degli effetti periferici di alcuni cannabinoidi, tra cui il THC, si basano sull'attivazione del recettore CB1.

Per contro, il recettore CB2 è quasi esclusivamente espresso nel sistema immunitario, sia da parte delle cellule, tra cui linfociti B, T e macrofagi, che dai tessuti, tra cui la milza, le tonsille e i linfonodi, ma è presente anche a livello dell'endotelio polmonare, del tratto gastrointestinale, negli adipociti, nel tessuto cardiaco ed osseo, oltre che a livello delle cellule della microglia durante processi infiammatori e neurodegenerativi (Walter *et al.*, 2003). Diversamente dal CB1, il CB2 non è correlato agli effetti psicoattivi dei cannabinoidi (Porter e Felder, 2001; Howlett *et al.*, 2002).

Nel sistema nervoso centrale (SNC) il recettore CB1 è prevalentemente pre-sinaptico e svolge un ruolo inibitorio sulla modulazione del rilascio dei neurotrasmettitori, mentre il CB2

sembra principalmente regolare le funzioni del sistema immunitario (SI) interferendo sulla migrazione cellulare e sul rilascio di citochine.

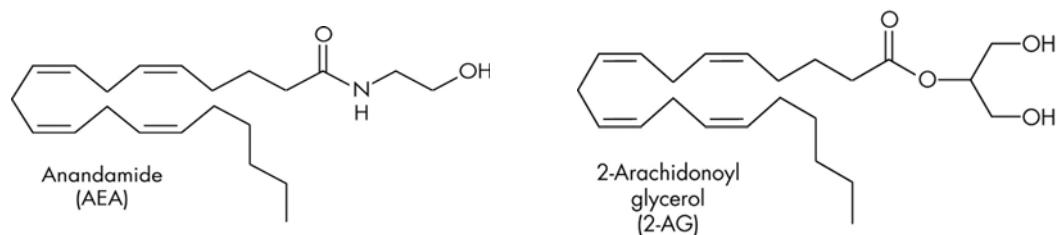
Entrambi i recettori trasducono il segnale attraverso l'inibizione dell'adenilato ciclasi (Howlett *et al.*, 1986) e la stimolazione della via delle proteine chinasi mitogeno attivate (MAPK) (Bouaboula *et al.*, 1995), mentre solo il recettore CB1 è in grado di inibire i canali del calcio di tipo N e P/Q (Mackie e Hille, 1992) e attivare i canali del potassio di tipo A (Mackie *et al.*, 1995). Inoltre, sia il CB1 sia il CB2 partecipano alla regolazione della sopravvivenza cellulare (Guzmán, 2003) e in questo contesto sembrano essere implicate la via delle MAPK (ERK, JNK e p38 (Gallego *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 2003)), la via della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3-K)/Akt ed anche la produzione di ceramidi (Guzmán *et al.*, 2001), che mediano l'apoptosi indotta dai cannabinoidi.



**Fig. B.** Struttura dei due principali recettori cannabici, CB1 e CB2

I recettori CB1 e CB2 mediano la maggior parte delle azioni del THC, ma non sembrano essere l'unico bersaglio degli endocannabinoidi (De Petrocellis e Di Marzo, 2010). Negli ultimi anni sono state numerose le prove farmacologiche riguardanti l'esistenza di un terzo tipo recettoriale, il recettore GPR55, accoppiato a proteine G e clonato la prima volta nel 1999 (Sawzdargo *et al.*, 1999; Andradas *et al.*, 2011; Piñeiro *et al.*, 2011), che è stato definito recettore "atipico" per i cannabinoidi. Hu e collaboratori hanno dimostrato che questo recettore è espresso in molte cellule tumorali e gioca un ruolo critico nella regolazione della proliferazione cellulare (Hu *et al.*, 2011).

La scoperta dei recettori cannabici nei tessuti ha portato alla ricerca di ligandi endogeni che esercitassero le loro funzioni interagendo con tali recettori; si è così giunti alla scoperta del primo cannabinoide endogeno, l'arachidonil etanolamide (AEA), isolata dal cervello di maiale nel 1992 e denominata anandamide (Devane *et al.*, 1992); questa sostanza lega sia il CB1 sia il CB2 (Felder *et al.*, 1995) comportandosi come agonista parziale (Burkey *et al.*, 1997; Glass e Northup, 1999). In seguito alla scoperta di questo ligando endogeno, sono stati caratterizzati altri derivati di acidi grassi polinsaturi che si comportano come agonisti funzionali dei recettori dei cannabinoidei e che sono stati denominati endocannabinoidei (Hanus *et al.*, 1993; Sugiura *et al.*, 1995). Tra questi composti, nel tentativo di cercare un ligando selettivo per il CB2, è stato identificato, dapprima nel cervello di ratto (Hanus *et al.*, 1993) e nell'intestino di cane (Mechoulam *et al.*, 1995), il 2-arachidonil glicerolo (2-AG). Questo secondo endocannabinoide differisce dall'anandamide per il fatto di comportarsi come agonista pieno su entrambi i recettori cannabici. La presenza di due ligandi endogeni per un singolo recettore non è stata ancora totalmente spiegata, ma differenze nella farmacocinetica e nell'efficacia di questi composti suggeriscono la possibilità che essi giochino ruoli fisiologici distinti.



**Fig. C.** Struttura dei due principali endocannabinoidei: anandamide (AEA) e 2-arachidonil glicerolo (2-AG)

Oltre a questi principali e più noti endocannabinoidei, sono stati successivamente identificati anche la N-arachidonil-dopamina (NADA), l'N-arachidonil-glicerol-etero (noladin etero), l'O-arachidonil-etanolamina (virodamina) e la palmitoil-etanolamina (PEA). Tuttavia, queste molecole non condividono gli stessi percorsi biosintetici o metabolici di AEA e 2-AG e la farmacologia di questi composti è ad oggi ancora poco conosciuta.

Insieme con i loro recettori, gli endocannabinoidei costituiscono il sistema endocannabinoide, che comprende anche gli enzimi per la loro biosintesi ed inattivazione. Tra i primi troviamo principalmente l'enzima N-acil fosfatidil etanolamina fosfolipasi D

(NAPE-PLD), per la biosintesi di AEA, e l'enzima diacilglicerolo lipasi- $\alpha$  (DAGL- $\alpha$ ), per la biosintesi di 2-AG.

Dopo essere stati rilasciati dalle cellule, l'AEA ed il 2-AG possono agire sui loro target molecolari sia in modo autocrino che paracrino, per essere successivamente inattivati attraverso ricaptazione cellulare. Una volta all'interno della cellula gli endocannabinoidi sono rapidamente degradati. Il principale enzima deputato alla degradazione dell'AEA è la FAAH (fatty acid amide hydrolase), che idrolizza l'AEA in acido arachidonico ed etanolamina, mentre il 2-AG, oltre che dalla FAAH, viene convertito in acido arachidonico e glicerolo ad opera di una monoacilglicerolo lipasi (MAGL) (Di Marzo, 2009; Massi *et al.*, 2010).

Il sistema endocannabinoide agisce diversamente rispetto alla maggior parte dei sistemi di neurotrasmissione. L'AEA ed il 2-AG funzionano come messaggeri retrogradi (Guzmán, 2003): entrambi, infatti, prodotti a livello post-sinaptico sono sintetizzati "on demand" da precursori fosfolipidici di membrana, quali la fosfatidilcolina e la fosfatidiletanolamina, e sono rilasciati in seguito ad un aumento di calcio citosolico (Pertwee, 2005b). Legano, quindi, i recettori CB1 delle cellule pre-sinaptiche, i quali sono responsabili dell'inibizione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti e dell'attivazione dei canali potassio. In questo modo regolano il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori o inibitori, quali l'acetilcolina, la noradrenalina, la dopamina, la 5-idrossitriptamina, il GABA, il glutammato, il D-aspartato e la colecistochinina (Pazos *et al.*, 2005).

Studi recenti hanno evidenziato che, oltre ai recettori CB1 e CB2, possibili target per gli endocannabinoidi siano i recettori nucleari "proliferation-activated" dei perossisomi, PPAR  $\alpha$  e  $\gamma$ , regolando il metabolismo glucidico e lipidico.

Inoltre, l'AEA è in grado di legarsi al recettore di tipo 1 per i vanilloidi (TRPV1), agendo come debole agonista completo (Zygmunt *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000; Pertwee, 2005c). Il recettore vanilloide TRPV1 è un canale non selettivo per cationi, di natura eccitatoria, altamente espresso nei neuroni primari delle fibre afferenti a conduzione lenta, che agisce come integratore molecolare degli stimoli nocicettivi (Pertwee, 2005c; Jonsson *et al.*, 2006). Questo recettore, precedentemente chiamato VR1 (Vanilloid receptor 1), è stato recentemente ridefinito TRPV1 per la sua analogia con la famiglia dei canali ionici di tipo TRP (Transient Receptor Potential). Esso è distribuito lungo tutti i neuroni sensori primari con il soma nei nuclei dorsali e nei gangli trigeminali e nodosi. Il canale è bersaglio della capsaicina, principio attivo del peperoncino, e può essere attivato da diversi stimoli come

calore, protoni e agonisti vanilloidi, così definiti per la presenza nella loro struttura di un nucleo vanillinico, come nella capsaicina, appunto (Rosenbaum e Simon, 2007). Lo studio dei recettori vanilloidi è stato fortemente facilitato dalla scoperta dell'antagonista competitivo capsazepina (Valenzano e Sun, 2004).

## I GLIOMI

I gliomi sono i più comuni ed aggressivi tumori primari che interessano il cervello ed originano dalle cellule della neuroglia quali astrociti, oligodendrociti e cellule della microglia. I gliomi vengono classificati a seconda del grado di malignità che può essere compreso tra basso (grado I) ed elevato (grado IV). Il più maligno tra i tumori primari del cervello è il glioblastoma (grado IV). I glioblastomi sono sempre tumori infiltrativi e sono comunemente multifocali. Sono caratterizzati da un'alta attività proliferativa mitotica e da un'alta proliferazione endoteliale. Questi tumori sono eterogenei e mostrano frequentemente una farmaco resistenza. La progressione maligna gliomale è caratterizzata da necrosi focale, proliferazione cellulare, angiogenesi incontrollata ed è associata ad una straordinaria capacità invasiva e migratoria delle cellule tumorali (Giese *et al.*, 1995). Malgrado la capacità di invadere localmente il cervello, raramente i gliomi riescono a formare metastasi fuori dal sistema nervoso centrale, per cui essi portano alla morte dell'individuo poiché proliferazione ed infiltrazione causano deformazione e distruzione dell'architettura cerebrale (DeAngelis, 1998).

Nonostante negli ultimi anni si siano fatti molti progressi nell'applicazione delle terapie antitumorali convenzionali quali chemioterapia, radioterapia e rimozione chirurgica, la prognosi dei gliomi rimane ancora infausta e le prospettive di vita dei pazienti non superano l'anno e mezzo. La natura invasiva delle cellule tumorali del cervello ha un ruolo importante nell'inefficacia delle attuali modalità di trattamento; le cellule residue del tumore inevitabilmente si infiltrano nei tessuti circostanti del cervello e portano alla recidiva (Tran *et al.*, 2006). Il comportamento invasivo dei gliomi è dovuto ad una serie di fattori che comprende l'attivazione dei segnali cellulari proliferativi e l'annullamento del controllo del ciclo cellulare, l'aumento dell'angiogenesi e l'ulteriore evoluzione clonale (Rao, 2003). A questo proposito numerosi studi hanno indagato i meccanismi alla base delle capacità migratoria ed invasiva di queste cellule tumorali. La migrazione riguarda fenomeni di adesione alla matrice extracellulare, svolgendo un ruolo critico in una vasta gamma di processi fisiologici e patologici tra cui lo sviluppo del tessuto tumorale *in loco* e la

formazione di neoplasie. La capacità invasiva dei gliomi, invece, si basa sulla degradazione della matrice extracellulare, con la successiva mobilitazione delle cellule tumorali gliali nello stroma e la conseguente formazione di metastasi (Demuth e Berens, 2004; Curran e Murray, 2000; Lafleur *et al.*, 2001).

Una maggior conoscenza dei meccanismi molecolari alla base della malignità del glioma avrà un impatto sempre più importante nella gestione clinica di questi tumori, con la possibilità di tradursi in nuovi approcci terapeutici. A questo proposito, l'angiogenesi sembra essere critica per lo sviluppo e la progressione dei gliomi, e la sua inibizione potrebbe, perciò, rappresentare una potente strategia antiglioma.

## **L'ANGIOGENESI TUMORALE**

L'angiogenesi consiste nello sviluppo di nuovi vasi sanguigni a partire da altri già esistenti. È un processo complesso, finemente regolato da fattori stimolatori o inibitori, che si verifica in molte condizioni, sia fisiologiche (sviluppo embrionale, ovulazione e riparazione delle ferite) che patologiche (artrite e tumori) (Ribatti, 2005). I vasi sanguigni sono costituiti da cellule endoteliali, a diretto contatto col sangue, periciti subendoteliali, cellule della muscolatura liscia, fibroblasti, membrana basale e matrice extracellulare.

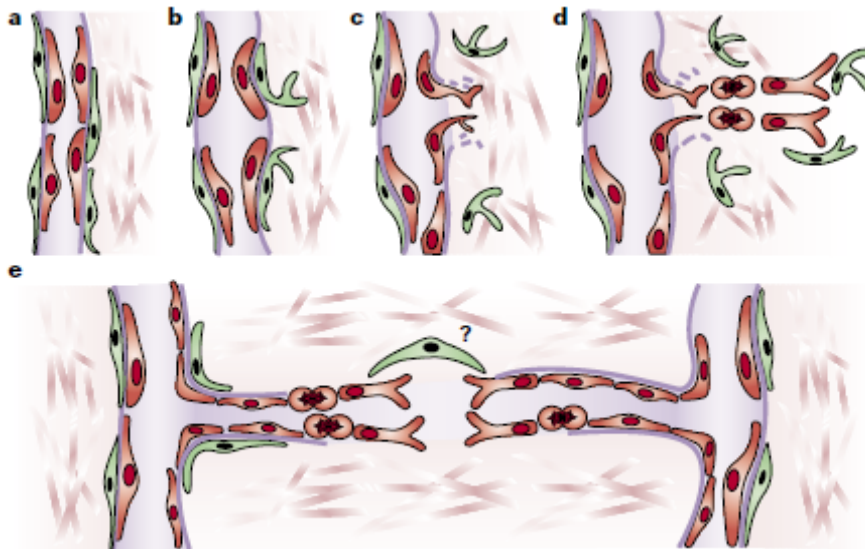
La formazione di un vaso passa attraverso quattro stadi ben definiti che comportano modificazioni dell'endotelio e della matrice extracellulare:

- 1) destabilizzazione dei vasi preesistenti per permettere un aumento della permeabilità vasale e la perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali;
- 2) migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali in una zona del tessuto in cui è necessaria la formazione di nuovi vasi. In questa fase concorrono enzimi proteolitici che modificano la matrice extracellulare permettendo così la migrazione delle cellule endoteliali. Un passaggio fondamentale in questa fase è la cooperazione tra l'attività del plasminogeno e le metalloproteasi. Il primo, legandosi al suo recettore, avvia il processo d'invasione e migrazione cellulare. La sua funzione è finemente regolata da due fattori, l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) e la SerpinaE1, che ne regolano rispettivamente l'attivazione e l'inibizione (Dass *et al.*, 2008; Stefansson *et al.*, 2003). Le metalloproteasi, prodotte dalle cellule epiteliali, dai fibroblasti e dalle cellule infiammatorie, permettono la degradazione della membrana basale. La loro attività è regolata dagli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMP) (Lakka *et al.*,



2003). Questi step sono regolati da molti fattori proangiogenici come l'Endotelina-1 (ET-1) (Bagnato *et al.*, 2008) e le diverse forme dimeriche del Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) (Murakami e Simons, 2008), proteine in grado di per sé di favorire la neovascolarizzazione modulando rispettivamente la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali e il reclutamento dei periciti per la stabilizzazione dei nuovi vasi formati;

- 3) differenziamento delle cellule endoteliali, caratterizzato da un arresto della proliferazione cellulare e dalla formazione di nuovi capillari;
- 4) richiamo di cellule subendoteliali di supporto, come i periciti, e di cellule della muscolatura liscia. Avviene così una riorganizzazione delle interazioni cellulari che stabilizza il nuovo vaso.



**Fig. D.** (a) Formazione di nuovi vasi sanguigni da capillari preesistenti. (b) Destabilizzazione dei vasi preesistenti con distacco dei periciti (in verde) e dilatazione dei vasi sanguigni. (c, d) Migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali (in rosso) in una zona del tessuto in cui è necessaria la formazione di nuovi vasi. (e) Arresto della proliferazione cellulare endoteliale e formazione di nuovi capillari, con conseguente richiamo di cellule subendoteliali di supporto e di cellule della muscolatura liscia

Come avviene per i tessuti sani, l'accrescimento e la sopravvivenza dei tumori dipendono dalla presenza di un'estesa rete di vasi sanguigni che assicurano un costante apporto di nutrienti e di ossigeno. Inoltre, la capacità del tumore di formare metastasi dipende in grande misura dallo sviluppo di una propria rete vascolare. L'angiogenesi patologica è quindi essenziale per la progressione maligna dei tumori solidi.

I tumori di piccole dimensioni, con un diametro inferiore ai due millimetri, sono quiescenti e si nutrono per semplice diffusione. Per il proprio sviluppo si sottopongono a un processo detto switch angiogenico che consiste nella produzione di segnali che stimolano l'angiogenesi. L'angiogenesi è regolata dalle complesse interazioni di numerosi fattori stimolatori (proangiogenici) e inibitori (antiangiogenici). Nei tumori predominano i fattori proangiogenici, spostando l'equilibrio verso la formazione di nuovi vasi (Bergers e Benjamin, 2003). Le cellule tumorali, rilasciando molecole che inviano segnali al normale tessuto ospite circostante, permettono l'inizio del processo angiogenico. Questa segnalazione attiva geni del tessuto ospite che, a loro volta, producono proteine necessarie per favorire la crescita di nuovi vasi sanguigni.

Data la tendenza delle cellule tumorali di glioma ad invadere il tessuto cerebrale circostante e promuovere la neovascolarizzazione, si pone la necessità di sviluppare terapie capaci di prevenire la proliferazione cellulare residua e la formazione di una nuova rete vascolare.

In particolare, tra i tumori solidi, i gliomi sono quelli con il più alto grado di proliferazione vascolare (Brem *et al.*, 1972; 1992) e l'aumento della densità microvascolare in questi tumori correla con il loro grado di malignità, la loro aggressività, la frequenza di ricaduta clinica e le minori prospettive di vita dei pazienti (Leon *et al.*, 1996). La proliferazione microvascolare è un criterio diagnostico per distinguere i gliomi maligni, o di alto grado, da quelli di basso grado ed è un fattore prognostico indipendente (Kleihues e Sobin, 2000; Burger *et al.*, 1985).

La rete vascolare dei tumori è altamente disordinata e funzionalmente anormale, con un flusso sanguigno irregolare ed un aumento della permeabilità vascolare e delle emorragie (Carmeliet e Jain, 2000). Nei gliomi la proliferazione vascolare aberrante forma caratteristici aggregati microvascolari "glomeruloidi".

Inoltre, la rete vascolare anormale nei tumori crea un circolo vizioso in cui le condizioni ipossiche che si generano dai vasi disfunzionali inducono a loro volta angiogenesi. L'ipossia stimola fortemente l'angiogenesi attraverso l'upregolazione del fattore di trascrizione HIF-1, che induce una forte espressione di VEGF, dei suoi recettori VEGFR e di altri fattori proangiogenici e geni coinvolti nella risposta cellulare adattativa all'ipossia (Kaur *et al.*, 2005; Chi *et al.*, 2007).

Per questi motivi l'inibizione dell'angiogenesi tumorale appare un target sempre più rilevante nella messa a punto di strategie antitumorali rivolte contro il glioma.

## CANNABINOIDI E GLIOMI

Negli ultimi anni, i risultati ottenuti dall'utilizzo dei derivati della *Cannabis sativa* nella terapia antitumorale dei gliomi hanno evidenziato un ruolo chiave di queste molecole non solo per i loro effetti antiemetici ed antidolorifici, ma anche e soprattutto per la loro capacità di inibire in maniera selettiva la proliferazione delle cellule tumorali. Una migliore conoscenza del loro meccanismo e del loro livello d'azione rappresenta un obiettivo di grande importanza nella ricerca che permetterà di meglio definire un loro possibile utilizzo terapeutico sia quando somministrati da soli sia in associazione con le più ricorrenti terapie utilizzate.

A questo riguardo Guzmán e collaboratori nel 1998 hanno dimostrato per primi un effetto antiproliferativo del THC su una linea cellulare di glioma murino, C6. In particolare, gli autori hanno osservato che il THC induce dopo 4-5 giorni dall'inizio del trattamento un'inibizione della vitalità cellulare superiore al 50% e che quest'inibizione è associata ad un effetto apoptotico. Questo effetto è indipendente dalla stimolazione del recettore cannabico CB1, presente in queste cellule, come dimostrato attraverso l'utilizzo del suo antagonista selettivo SR141716A (SR1) (Sánchez *et al.*, 1998).

Successivamente, nel 2000, Galve-Roperh e i suoi collaboratori hanno approfondito lo studio delle potenzialità del THC come agente antineoplastico conducendo esperimenti *in vivo*, su gliomi ottenuti mediante inoculo intracerebrale di cellule C6 in ratti Wistar. L'effetto del THC è correlato ad un aumento della sopravvivenza dei ratti trattati con tale sostanza. Risultato ancora più interessante è la notevole regressione della massa tumorale indotta direttamente del cannabinoide. In questo effetto, infatti, non si riscontra la partecipazione di altri sistemi quali, ad esempio, il sistema immunitario, poiché anche in ratti immunodeficienti è stata riscontrata la stessa regressione del tumore (Galve-Roperh *et al.*, 2000).

Nel marzo 2002 è stato approvato in Spagna uno studio clinico di fase I/II al fine di valutare gli effetti di somministrazioni locali di THC sulla crescita del glioblastoma multiforme. Questo è stato il primo studio pilota sull'azione antitumorale di cannabinoidi che abbia impiegato l'applicazione intracranica di THC. I nove pazienti partecipanti allo studio avevano fallito la terapia standard (operazione chirurgica e radioterapia) e costituivano un gruppo di pazienti terminali nei quali i tumori si riformavano continuamente. La sopravvivenza media di tali pazienti dall'inizio della somministrazione di cannabinoidi è stata

di 24 settimane, ma due pazienti sono riusciti a sopravvivere per circa un anno (Guzmán *et al.*, 2006).

Inoltre, nel 2005 McAllister e collaboratori hanno dimostrato che il THC è in grado di inibire la proliferazione ed indurre morte cellulare in diverse linee di cellule di glioma umano in modo selettivo, senza effetti su cellule primarie di glia (McAllister *et al.*, 2005).

Studi successivi hanno dimostrato che il THC è anche in grado di down-regolare l'espressione di TIMP-1 e MMP-2, due proteine che hanno un ruolo chiave nella migrazione e nell'invasività tumorale, sia in xenotrapianti di glioma in topi *nude*, sia in diverse linee cellulari di glioma e in colture tumorali primarie, con meccanismi che coinvolgono la regolazione della produzione di ceramidi e dell'espressione della proteina di stress p8 (Blázquez *et al.*, 2008a; 2008b).

È stato inoltre dimostrato che il trattamento con THC induce arresto delle cellule di glioma umano in fase G1 (Galanti *et al.*, 2008) e promuove l'autofagia, associata all'induzione nel reticolo endoplasmico di una risposta a stress attraverso inibizione dell'asse Akt/mTOR (Salazar *et al.*, 2009).

Sebbene questi risultati siano di estremo interesse dal punto di vista terapeutico, la possibilità di sviluppare il THC come agente antineoplastico è limitata dai ben noti effetti psicotropi che questo composto esercita. Per questo motivo, negli ultimi anni particolare interesse hanno suscitato alcuni lavori riguardanti un fitocannabinoide non psicoattivo, il cannabidiolo (CBD).

## **IL CANNABIDILOLO**

Il CBD è stato isolato per la prima volta nel 1940 da Adams, mentre la sua struttura chimica è stata identificata solo in seguito da Mechoulam e collaboratori (Mechoulam e Shvo, 1963). Sebbene privo di effetti centrali, la distribuzione del CBD dopo somministrazione endovena è del tutto sovrapponibile a quanto già riportato per altri cannabinoidi psicotropi quali il THC e il cannabinolo. Esso, infatti, in virtù della sua natura lipofila, si distribuisce molto velocemente a livello del SNC dove permane per un periodo di circa 60-90 minuti (Alozie *et al.*, 1980). Per molto tempo le proprietà farmacologiche del CBD non furono prese in considerazione in quanto esso non presentava i classici effetti indotti dai cannabinoidi a livello del SNC. Successivamente numerosi studi hanno dimostrato che questo farmaco possedeva proprietà anticonvulsivanti, ansiolitiche, neuroprotettive ed immunomodulatorie.

Numerosi esperimenti sono stati condotti sia *in vitro* sia *in vivo* per valutare l'effetto del CBD sulla proliferazione e la crescita di cellule tumorali. I primi studi su cellule tumorali furono condotti negli anni '70 (Carchman *et al.*, 1976), sebbene solo un rinnovato interesse negli ultimi anni abbia portato a considerare tale composto come potenziale farmaco antitumorale.

Esperimenti *in vitro* hanno mostrato che il CBD influenza, spesso inibendo, la crescita e la proliferazione di un vasto spettro di cellule tumorali, tra cui quelle del tumore al seno (Ligresti *et al.*, 2006; McAllister *et al.* 2007; 2011; Shrivastava *et al.*, 2011), del tumore ai polmoni e all'utero (Ramer *et al.*, 2010a; 2010b), le cellule del tumore allo stomaco, al colon, alla prostata, alla tiroide (Ligresti *et al.*, 2006), del tumore alla vescica (Yamada *et al.*, 2010), del timoma (Lee *et al.*, 2008) e le cellule leucemiche (McKallip *et al.*, 2006; Ligresti *et al.*, 2006). I meccanismi d'azione coinvolti differiscono in base al tipo di cellula tumorale studiata e comprendono induzione dell'apoptosi, arresto del ciclo cellulare, inibizione della crescita e della migrazione cellulare (Bifulco e Di Marzo, 2002; Kogan, 2005).

Massi e collaboratori (Massi *et al.*, 2004) hanno dimostrato che il CBD causa un'inibizione dose-dipendente della crescita tumorale sia *in vitro*, su cellule di glioma umano U87-MG e U373, che *in vivo* su cellule U87-MG iniettate sottocute in topi *nude*. Gli antagonisti dei recettori cannabici CB1 e CB2 e del recettore dei vanilloidi TRPV1 non sono in grado di revertire l'effetto antiproliferativo del CBD, suggerendo un mancato coinvolgimento di tali recettori. Nello stesso studio i ricercatori hanno inoltre dimostrato che l'effetto antiproliferativo del CBD è dovuto alla sua capacità di indurre apoptosi attraverso una marcata attivazione sia della caspasi-8 sia della caspasi-9, rispettivamente implicate nella via estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi. Uno dei possibili meccanismi d'azione alla base delle proprietà apoptotiche del CBD, secondo Massi e collaboratori (Massi *et al.*, 2006), è la sua capacità di indurre, già dopo 5-6 ore di trattamento, in cellule di glioma U87-MG, ma non in cellule primarie di glia, un aumento della produzione delle specie reattive dell'ossigeno ed una diminuzione dei livelli di glutatione.

Attraverso l'utilizzo della camera di Boyden, Vaccani e collaboratori (Vaccani *et al.*, 2005) hanno dimostrato che il CBD inibisce la migrazione delle U87-MG indotta dalla presenza di sostanze chemoattraenti nel terreno, un effetto indipendente dai recettori CB1, CB2 e TRPV1.

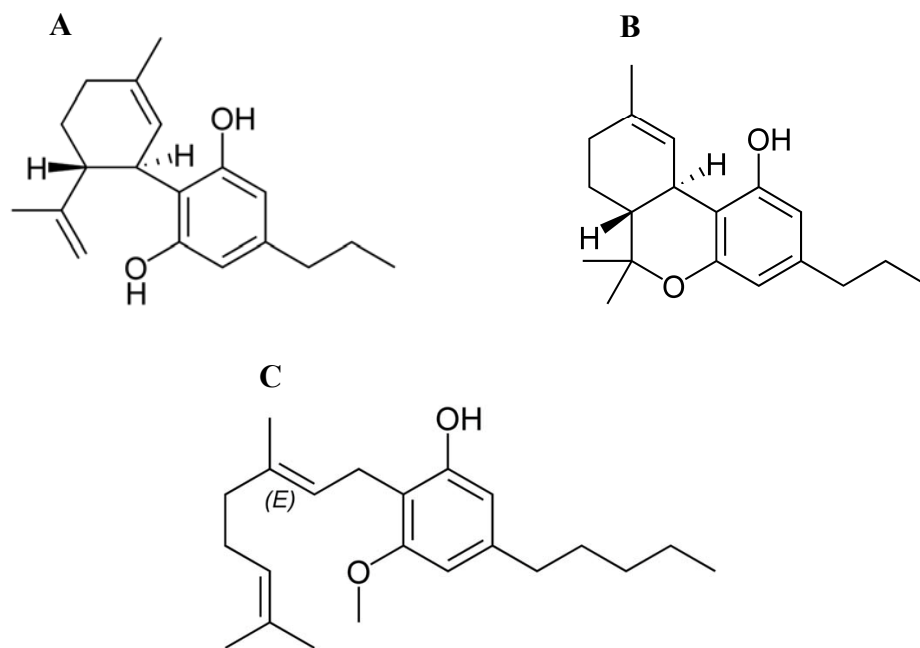
Ulteriori studi hanno approfondito l'effetto del CBD in associazione con il THC in linee cellulari di glioma umano. Marcu e collaboratori hanno dimostrato che questa associazione produce un effetto antiproliferativo maggiore delle due molecole rispetto all'uso

dei singoli composti sull'inibizione della crescita cellulare e sull'induzione dell'apoptosi. Questi effetti sono stati in parte attribuiti all'attivazione del recettore CB2, all'inibizione di ERK e all'arresto del ciclo cellulare (Marcu *et al.*, 2010), oltre che ad un aumento della produzione di specie radicaliche dell'ossigeno e all'attivazione delle caspasi.

Nonostante l'effetto del CBD su cellule di glioma sia stato ampiamente studiato, non è tutt'ora ben chiaro il meccanismo molecolare con cui il farmaco agisce. Tuttavia le numerose evidenze sperimentali degli effetti antitumorali del CBD, insieme alla sua natura non psicoattiva, suggeriscono un suo possibile utilizzo nella terapia contro i gliomi.

È importante sottolineare che il cannabidiolo può legarsi ai recettori CB1 e CB2 solamente a concentrazioni nel range micromolare e possiede una bassa affinità per questi recettori. Negli ultimi anni numerose prove farmacologiche hanno evidenziato l'esistenza di un terzo tipo recettoriale distinto dai recettori CB1 e CB2, il recettore GPR55, accoppiato anch'esso a proteine G e clonato per la prima volta nel 1999 (Sawzdargo *et al.*, 1999). Questo recettore è espresso in molte cellule tumorali, tra cui quelle di glioma, e gioca un ruolo critico nella regolazione della proliferazione cellulare (Hu *et al.*, 2011; Andradás *et al.*, 2011; Piñeiro *et al.*, 2011). Studi recenti indicano che il CBD sembra comportarsi da antagonista di tale recettore (Whyte *et al.*, 2009) e, quindi, non può essere escluso un possibile coinvolgimento del GPR55 nel mediare gli effetti antitumorali del CBD.

Prendendo le mosse dai risultati ottenuti con il cannabidiolo, recentemente l'interesse dei ricercatori si è rivolto ai possibili effetti antitumorali di altri composti fitocannabinici non psicoattivi.



**Fig. E.** Struttura molecolare dei tre fitocannabinoidi (A) cannabidivarina (CBDV), (B)  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV), (C) cannabigerolo (CBG)

## LA CANNABIDIVARINA

La cannabidivarina (CBDV), cannabinoide non psicoattivo trovato in piccole quantità nella *Cannabis sativa*, è un analogo del CBD con la catena laterale più corta per la mancanza di due gruppi  $\text{CH}_2$ . In condizioni di acidità isomerizza nel cannabinoide debolmente psicoattivo  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV).

Nonostante la cannabidivarina mostri un'affinità strutturale con derivati cannabinici ampiamente studiati, come il cannabidiolo e il THC, della sua attività farmacologica si conosce molto poco in quanto, in passato, questo composto è stato oggetto di studi molto limitati.

Solo recentemente Di Marzo e collaboratori (De Petrocellis *et al.*, 2011) hanno dimostrato che la CBDV è in grado di regolare i livelli dei principali endocannabinoidi, sia inibendo la biosintesi di 2-AG da parte dell'enzima diacilglicerolo lipasi- $\alpha$  (DAGL- $\alpha$ ), sia ostacolando l'uptake di AEA.

Il nostro interesse è stato quindi quello di analizzare l'effetto di tale composto sulle linee cellulari di glioma umano U87-MG e T98G per valutare un suo possibile impiego nella terapia antitumorale.

## LA $\Delta^9$ -TETRAIDROCANNABIVARINA

La scoperta dell'n-propil analogo del THC, la  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) fu fatta nel 1970 da Edward Gill (Gill *et al.*, 1970; Merkus, 1971).

Inizialmente gli esperimenti con THCV dimostrarono la capacità di questa sostanza di produrre segnali di catalessia nel “mouse ring test” (Gill *et al.*, 1970) e di indurre effetti simili al THC negli umani (Hollister, 1974), sebbene con una potenza quattro o cinque volte ridotta rispetto al THC stesso. Sembra perciò che il THCV possa attivare il recettore CB1, anche se con una potenza minore: questa ipotesi è in accordo con una correlazione tra struttura e potenza/efficacia del THC (Pertwee, 2008).

Studi successivi hanno però evidenziano che il THCV può agire come bloccante del recettore CB1 e inoltre, come il THC, può interagire anche con il recettore CB2 come agonista parziale (Gauson *et al.*, 2007).

In definitiva nonostante il THCV mostri un'affinità strutturale con derivati cannabici ampiamente studiati, come il THC, fino ad oggi questo composto è stato oggetto di studi molto limitati e molto rimane ancora da chiarire circa la sua attività farmacologica.

In questo lavoro di tesi abbiamo, quindi, analizzato l'effetto di tale composto sulle linee cellulari di glioma umano U87-MG e T98G per valutare un suo possibile impiego nella terapia antitumorale.

## IL CANNABIGEROLO

I fitocannabinoidi sono dei terpenofenoli che derivano dalla combinazione di un elemento terpenico con un fenolo di tipo chetidico, l'olivetolo.

La combinazione di acido olivetolico e geranilpirofosfato genera il pre-cannabigerolo, da cui originano poi tutti gli altri cannabinoidi. Il cannabigerolo (CBG), quindi, è un cannabinoide naturale precursore dei maggiori cannabinoidi (CBD, cannabidromene (CBC) e THC) e come tale nelle piante di *Cannabis* raramente viene trovato in concentrazioni significative (Fellermeier e Zenk, 1998).

Attraverso il test [35S]GTP $\gamma$ S condotto su membrane di cervello di topo, è stato dimostrato che il CBG è un fitocannabinoide non psicoattivo in grado di agire come agonista sia per il recettore CB1 sia per il recettore CB2, pur non provocando effetti psicotropi (Cascio *et al.*, 2009).



Essendo il CBG presente nella pianta di marijuana a basse concentrazioni, inizialmente si pensava che non avesse proprietà farmacologiche. Ulteriori studi hanno invece evidenziato che il CBG può avere proprietà comuni ai suoi prodotti come il CBD e il CBC. Inoltre è ipotizzabile che la combinazione del CBG con i suoi prodotti possa modulare gli effetti prodotti dal CBG da solo (de Meijer *et al.*, 2003).

ElSohly e collaboratori (1992) hanno dimostrato che il CBG ha proprietà antimicrobiche e più recentemente Maor e collaboratori (2005) hanno descritto un analogo sintetico del CBG, CBG-dimetileptile, che possiede proprietà ipotensive e vasorilassanti. Infine Baek e collaboratori (1998), testando il geraniolo, l'olivetolo, diversi cannabinoidi e il 5-fluorouracile su linee cellulari di carcinoma epiteliale orale (KB) e sui fibroblasti NIH 3T3, hanno dimostrato che il cannabigerolo possiede la più alta attività antiproliferativa contro le linee cellulari di cancro utilizzate.

Tuttavia gli studi su questo fitocannabinoide sono ancora molto limitati. Nella presente tesi abbiamo analizzato il suo effetto sulle linee cellulari di glioma umano U87-MG e T98G per valutare il suo possibile impiego nella terapia antitumorale.

### **3. SCOPO DEL LAVORO**

Negli ultimi anni la sperimentazione in campo oncologico si è sempre più focalizzata sulla ricerca di nuove molecole con azione antitumorale per il trattamento dei gliomi. I gliomi sono i più frequenti e aggressivi tumori del sistema nervoso centrale e mostrano resistenza alle terapie convenzionali quali chemioterapia, radioterapia e resezione chirurgica. Anche dopo completa rimozione della massa tumorale seguita da trattamento appropriato, il tasso di sopravvivenza rimane molto basso. I gliomi raramente metastatizzano al di fuori del sistema nervoso centrale, ma la loro invasività aggressiva del tessuto sano peritumorale rende la totale rimozione chirurgica virtualmente impossibile (Franceschi *et al.*, 2009). Per questo motivo è necessario mettere a punto nuove strategie terapeutiche che migliorino la prognosi in pazienti colpiti da questi tumori. Negli ultimi anni numerosi studi hanno evidenziato che il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo (THC), principio attivo della pianta di *Cannabis sativa*, esercita un significativo effetto antitumorale in diversi tipi di tumore, inclusi i gliomi (Sarfaraz *et al.*, 2008; Freimuth *et al.*, 2010). Oltre al THC, anche un altro fitocannabinoide, il cannabidiolo (CBD), privo di effetti psicotropi, sembra essere un buon candidato per un futuro impiego nella terapia dei gliomi. Infatti il CBD possiede un'attività antiproliferativa, sia *in vitro* sia *in vivo*, ed antimigratoria su cellule di glioma U87-MG, con meccanismi che coinvolgono l'induzione dell'apoptosi, attraverso attivazione delle caspasi-8 e 9, e meccanismi di stress ossidativo, quali la produzione di ROS e la modulazione di LOX (Massi *et al.*, 2004; 2006; 2008; Vaccani *et al.*, 2005). Tuttavia, la valutazione delle proprietà anti-invasive del CBD e dei meccanismi molecolari alla base dell'attività di questa molecola su cellule di glioma è ad oggi limitata, così come sconosciuta è la possibilità che il CBD possa modulare l'angiogenesi, un altro processo rilevante per la crescita tumorale.

Partendo da questi dati, quindi, durante il mio periodo di dottorato ho focalizzato la mia ricerca sui seguenti punti.

1) Valutare se il CBD, oltre a possedere un'attività antiproliferativa ed antimigratoria, sia dotato di effetti anti-invasivi nei confronti di cellule di glioma U87-MG, tramite l'impiego della camera di Boyden in presenza di matrigel, che mima la matrice extracellulare.

2) Valutare le alterazioni del signaling intracellulare coinvolte nell'effetto antitumorale del CBD. A tale scopo sono stati valutati, attraverso analisi western blot, i livelli di attivazione di ERK e Akt ed il livello di espressione di HIF-1 $\alpha$ , tre molecole chiave nei meccanismi coinvolti sia nella proliferazione sia nella migrazione tumorale.

3) Valutare se il CBD possieda la capacità di modulare l'angiogenesi. A tale riguardo sono state valutate le capacità del CBD di inibire la crescita e la migrazione di cellule endoteliali isolate da cordone ombelicale umano (HUVEC), la sua capacità di inibire le principali proteine coinvolte in tale processo, il suo effetto sulla formazione di capillari *in vitro*, e, infine, la sua capacità di inibire l'angiogenesi *in vivo*, utilizzando un modello basato sull'inoculo sottocute nel topo di pellet di matrigel.

4) Infine, sulla base dei promettenti risultati ottenuti con il CBD, nell'ultima parte di questa tesi ho indagato gli effetti sulla vitalità, la migrazione e l'invasività di cellule di glioma umano U87-MG e T98G di altri fitocannabinoidi non psicoattivi o debolmente psicoattivi su cui ad oggi sono stati condotti pochi studi: la cannabidivarina (CBDV), la  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) ed il cannabigerolo (CBG).

Nel loro complesso, i risultati da me ottenuti con questa ricerca forniscono un'ulteriore caratterizzazione degli effetti farmacologici del CBD su cellule di glioma, permettono di individuare, anche se solo parzialmente, il signaling coinvolto nei suoi effetti antiproliferativi, antimigratori ed anti-invasivi ed infine evidenziano per la prima volta che il CBD possiede anche effetti antiangiogenici.

Nel loro insieme questi dati preclinici, per quanto preliminari, appaiono favorevoli per proseguire nella caratterizzazione degli effetti antitumorali di questa molecola in vista di un suo eventuale utilizzo.

Infine, l'analisi critica dei risultati ottenuti con i fitocannabinoidi, CBDV, THCV e CBG, ci ha permesso di trarre conclusioni preliminari sulla possibilità di impiegare anche queste molecole nella terapia del glioma, eventualmente in associazione con altri trattamenti chemio e radioterapici.

## **4. MATERIALI e METODI**

## TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

I composti cannabinici naturali cannabidiolo (CBD), cannabidivarina (CBDV),  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) e cannabigerolo (CBG) sono stati forniti dalla GW Pharmaceuticals (UK).

I composti in polvere sono stati inizialmente sciolti in etanolo (EtOH) sterile alla concentrazione di 50 mM e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Successivamente, per gli studi *in vitro*, i composti sono stati diluiti opportunamente con medium di crescita per colture cellulari. La frazione di etanolo è stata sempre mantenuta al di sotto dello 0.1% nelle concentrazioni utilizzate.

Il 3-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolio bromide (MTT) (Sigma Aldrich), per il test di vitalità, è stato preparato in una soluzione madre di phosphate-buffered saline (PBS) alla concentrazione di 5 mg/ml e conservato a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al momento del test tale soluzione è stata opportunamente diluita con DMEM alla concentrazione di 0.5 mg/ml.

Il cloruro di cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) (Sigma Aldrich), fornito in polvere, è stato disciolto 4x direttamente in terreno di coltura per ottenere una concentrazione finale di 50  $\mu\text{M}$ .

Il VEGF-A ricombinante murino ed il tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ricombinante murino sono stati acquistati da Peprotech; l'eparina da Sigma Aldrich.

L'AM251 (antagonista CB1), l'AM630 (antagonista CB2) (Tocris) e la capsazepina (CPZ, antagonista TRPV1) (Sigma Aldrich) sono stati inizialmente sciolti in dimetil solfossido (DMSO) sterile alla concentrazione di 50 mM e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e successivamente diluiti opportunamente con medium di crescita per colture cellulari: anche in questo caso la frazione di DMSO è stata sempre mantenuta al di sotto dello 0.1% nelle concentrazioni utilizzate.

## COLTURE CELLULARI

Gli esperimenti *in vitro* eseguiti per lo svolgimento di questa tesi sono stati condotti in parte su cellule di glioma umano U87-MG e T98G ed in parte su cellule endoteliali umane isolate da cordone ombelicale (HUVEC), mantenute in coltura in condizioni standard.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in coltura in un incubatore (Sanyo, modello MCO-15AC) ad una temperatura di  $37^{\circ}\text{C}$ , con un'atmosfera avente una percentuale di anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ) pari al 5% ed un'umidificazione elevata (95% di umidità). Le cellule sono state coltivate all'interno di fiasche da 75  $\text{cm}^2$ , pre-coattate solo per il

mantenimento delle HUVEC con Collagene di tipo I (Millipore), ed in presenza di un medium appropriato con un pH di 7.2-7.4.

Le linee cellulari di glioma umano sono state ottenute dall'American Type Culture Collection. Sono colture cellulari tumorali che crescono in monostrato con morfologia di tipo epiteliale. Il terreno di crescita specifico per le U87-MG e le T98G è costituito da DMEM (Sigma Aldrich) arricchito con 10% di siero fetale bovino (FBS) (Sigma Aldrich) inattivato al calore, 2% di L-glutammina (Sigma Aldrich), 1% di penicillina/streptomina (Sigma Aldrich), 1% di sodio piruvato (Sigma Aldrich), 1% di amminoacidi non essenziali (Sigma Aldrich). Per i trattamenti è stato invece utilizzato un terreno minimo in cui sono stati disciolti il farmaco e i vari composti. Tale medium è caratterizzato da una percentuale di siero pari allo 0.1%, privo di sodio piruvato e amminoacidi non essenziali, ma con un'aggiunta di ITS-liquid media supplement all'1% (5 µg/ml d'insulina, 5 µg/ml di transferrina e 5 ng/ml di selenite di sodio) (Sigma Aldrich).

Le HUVEC sono state o isolate da cordone ombelicale umano per digestione con collagenasi, come precedentemente descritto da Jaffe *et al.* (1973), o acquistate da Promo Cell o Lonza. Tutte le cellule sono state usate tra il secondo e l'ottavo passaggio.

Nel primo caso le cellule sono state fatte crescere nel terreno di crescita per cellule endoteliali medium 199 (M199) arricchito con 20% di FBS inattivato al calore, 25 µg/ml di endothelial cell growth factor (ECGF) e 50 µg/ml di eparina. Negli altri casi le cellule sono state fatte crescere in terreno di crescita per cellule endoteliali come indicato dal fornitore. Per i trattamenti è stato invece utilizzato in tutti i casi terreno completo con 2% di FBS.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in condizioni sterili per evitare la contaminazione da parte di muffe e batteri. Tutte le soluzioni e gli oggetti utilizzati con le cellule sono stati acquistati sterili o sterilizzati tramite autoclavatura ed utilizzati esclusivamente in condizioni asettiche (cappa a flusso laminare verticale Aura Vertical S. D. 4 con filtri HEPA).

## **MANTENIMENTO DELLE CELLULE IN COLTURA**

Per il normale mantenimento, dopo aver rimosso il medium, il monostrato cellulare è stato lavato con PBS per eliminare completamente il siero e i cationi presenti nel terreno. In seguito, si è aggiunto al monostrato cellulare 1 ml di tripsina-EDTA (Sigma Aldrich, soluzione al 0.5% di tripsina e 0.2% di EDTA) al fine di permettere il distacco delle cellule dal supporto di crescita senza danneggiarle. L'enzima è stato lasciato agire per 1 minuto,

ponendo la fiasca in incubatore, ed in seguito neutralizzato dall'aggiunta di un'aliquota di medium completo: il calcio contenuto nel siero è in grado di bloccare l'azione della tripsina. Tale aliquota è stata pipettata più volte scaricando la sospensione in punti diversi della fiasca, al fine di risospesione le cellule fino all'ottenimento di una sospensione monocellulare. Dalla fiasca è stata prelevata un'aliquota della sospensione cellulare necessaria per la conta cellulare in camera di Burker opportunamente diluita in Trypan Blue. In base alla conta cellulare è stato, quindi, prelevato dalla fiasca madre un volume adeguato di cellule da seminare in fiasche nuove a cui è stato subito dopo aggiunto terreno completo (densità di semina ottimale da  $0.8$  a  $1 \times 10^6$  cellule/fiasca).

## **MTT TEST**

L'MTT è un test di vitalità cellulare di tipo colorimetrico basato sulla capacità del sistema mitocondriale di trasporto di elettroni, ed in particolare della succinato deidrogenasi, di ridurre e quindi convertire un sale tetrazolico solubile [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolio bromide] di colore giallo, in un prodotto insolubile quale i sali di formazano, di colore viola, in quantità direttamente proporzionale alla vitalità cellulare.

Le cellule sono state seminate in piastra da 96 pozzetti a fondo piatto alla densità, per pozzetto, di  $1 \times 10^4$  cellule in  $100 \mu\text{l}$  di terreno completo. Le cellule sono state lasciate in incubazione per 24 h per permettere l'adesione al fondo dei pozzetti. In seguito, le cellule sono state trattate con i fitocannabinoidi per i tempi ed alle concentrazioni stabilite dal protocollo sperimentale. Per valutare il coinvolgimento dei recettori cannabinici CB1 e CB2 e del recettore dei vanilloidi TRPV1, prima del trattamento con i fitocannabinoidi le cellule sono state incubate per mezz'ora con gli antagonisti: AM251 (antagonista del recettore CB1), AM630 (antagonista del recettore CB2) o capsazepina (CPZ, antagonista del recettore TRPV1) alla concentrazione di  $0.5$  o  $1 \mu\text{M}$ . In tutti i casi la durata del trattamento è stata di 24 h. Dopo l'incubazione di 24 h con i farmaci, il surnatante è stato eliminato dai pozzetti e sono stati aggiunti  $100 \mu\text{l}$  di soluzione di MTT alla concentrazione di  $0.5 \text{ mg/ml}$ . La piastra è stata incubata per 3 h a  $37^\circ\text{C}$ . Infine è stato eliminato il surnatante e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto  $100 \mu\text{l}$  di DMSO 100%, per lisare le cellule e solubilizzare il sale precipitato. Dopo aver lasciato la piastra in agitazione per qualche minuto, si è condotta la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di  $570 \text{ nm}$ , usando un lettore fotometrico automatico per micropiastre (DV 990 BV6). I risultati sono stati espressi come percentuale di



cellule vitali rispetto al controllo, calcolata come l'assorbanza delle cellule trattate/cellule controllo x 100.

## **TRYPAN BLUE TEST**

Il Trypan Blue è un colorante in grado di colorare selettivamente le cellule morte. Le cellule vitali, avendo la membrana intatta, non permettono la penetrazione di questo colorante nel citoplasma; al contrario, nelle cellule morte questo penetra facilmente, rendendole distinguibili dalle vive con una rapida analisi al microscopio. Le cellule di glioma sono state seminate in piastra da 6 pozzetti a fondo piatto (BD Falcon, Sacco, Como) alla densità, per pozzetto, di  $3.5 \times 10^5$  cellule in 2 ml di terreno completo. Le cellule sono state lasciate in incubazione per 24 h per permettere l'adesione al fondo dei pozzetti. In seguito, le cellule sono state trattate con i fitocannabinoidi alle concentrazioni stabilite dal protocollo sperimentale per 24 h. Al termine dell'incubazione, il medium è stato trasferito in tubi da 15 ml sterili, il monostrato cellulare è stato lavato con PBS per eliminare completamente il siero e i cationi presenti nel terreno e, in seguito, si sono aggiunti 0.5 ml di tripsina-EDTA (Sigma, soluzione al 0.5% di tripsina e 0.2% di EDTA) al fine di permettere il distacco delle cellule dal supporto di crescita senza danneggiarle. L'enzima è stato lasciato agire per 1 minuto, ponendo la fiasca in incubatore, ed in seguito neutralizzato dall'aggiunta del medium di trattamento precedentemente prelevato. Tale volume è stato, quindi, pipettato più volte scaricando la sospensione in punti diversi del pozzetto, al fine di risospendere le cellule fino all'ottenimento di una sospensione monocellulare. Dal pozzetto è stata prelevata un'aliquota della sospensione cellulare necessaria per la conta cellulare in camera di Burker opportunamente diluita in Trypan Blue. Attraverso una conta separata delle cellule colorate in blu (morte) è stato possibile risalire alla vitalità cellulare. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule vitali rispetto al controllo.

## **ANALISI CITOFLUORIMETRICA**

Le HUVEC ( $6 \times 10^5$ ) sono state incubate con diverse concentrazioni di CBD per 24 h in medium completo di crescita EGM-2 con 2% FBS. Le cellule sono poi state raccolte, lavate due volte con PBS e trasferite in provetta. Le cellule sono state centrifugate e risospese in Annexin V-binding buffer (0.01 M acido 4-(2-idrossietil)-1-piperaziniletansolfonico (HEPES) (pH 7.4); 0.14 M NaCl; 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). Ad ogni provetta sono state aggiunte fluoresceina

isotiocianato Annessina V e 7-amino-actinomicina D (BD Biosciences) e sono state incubate per 15 min a temperatura ambiente al buio. Le cellule sono state, quindi, lavate in PBS, i surnatanti rimossi e le cellule risospese in 400 µl di binding buffer. I campioni sono stati acquisiti attraverso fluorocitometria di flusso usando un FACSCanto (BD Biosciences) e analizzati usando FACSDiva Software 6.1.2.

## **WESTERN BLOT - PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI CELLULARI**

Estratti di cellule della linea cellulare U87-MG controllo o trattate con CBD sono stati utilizzati per esperimenti di western blot per evidenziare la variazione dei livelli proteici di p-ERK, p-Akt e HIF-1 $\alpha$ . Le cellule sono state seminate in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> alla densità di 1x10<sup>6</sup> cellule in 6 ml per l'analisi di p-ERK e p-Akt, ed in Petri 100 ad una densità di 2x10<sup>6</sup> in 10 ml, inducendo o no l'ipossia, per la valutazione di HIF-1 $\alpha$ . Dopo 24 h di incubazione con il CBD, le U87-MG sono state staccate, contate e centrifugate a 1900 rpm a 4°C per 15 min. Dopo aver eliminato il surnatante, le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS a 4°C, trasferite in microtubi Eppendorf da 1.5 ml e centrifugate a 1900 rpm a 4°C per 15 min. Le cellule sono state poi risospese in un volume opportuno di buffer di lisi a 4°C (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4; NaCl 150 mM; fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM; NaF 10 mM; sodio ortovanadato 2 mM; EDTA 1 mM; leupeptina 1 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml; 1% Triton X-100; 0.1% SDS ed in presenza di un cocktail di inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich)) ed incubate in ghiaccio per 30 min. Le cellule sono state quindi lisate utilizzando siringhe da insulina ed il lisato proteico è stato recuperato attraverso centrifugazione a 12000 rpm per 10 min a 4°C. Il surnatante, corrispondente all'estratto proteico totale, è stato dosato nel suo contenuto proteico attraverso il saggio dell'Acido Bicinconico (BCA) (Pierce, IL, USA).

## **WESTERN BLOT - DOSAGGIO PROTEICO: SAGGIO DELL'ACIDO BICINCONICO (BCA)**

Il dosaggio proteico mediante saggio dell'Acido Bicinconico (BCA) consente di determinare la quantità di proteine totali mediante una reazione colorimetrica che prevede la riduzione del rame Cu<sup>2+</sup> ad opera di proteine che producono un intermedio alcalino contenente lo ione Cu<sup>1+</sup> a cui si lega l'Acido Bicinconico (BCA, Pierce). In seguito alla chelazione di uno ione Cu<sup>1+</sup> da parte di due molecole di BCA si forma un complesso

idrosolubile di colore viola. Si misura quindi l'assorbanza a 570 nm, che risulta essere proporzionale alla concentrazione delle proteine.

In breve, in una piastra a 96 pozzetti con fondo piatto si realizza una retta di taratura a partire da una madre 2 mg/ml di albumina serica bovina (BSA) fornita dal kit (Pierce), diluendo quantità crescenti di BSA (da 4 µg a 20 µg di proteine) in H<sub>2</sub>O distillata, per raggiungere un volume finale di 10 µl in ogni pozzetto. Il dosaggio dei campioni è stato condotto su 1 µl e 3 µl di estratto, portati a volume di 10 µl con acqua distillata. A tutti i pozzetti sono stati aggiunti 100 µl di Acido Bicinconico (BCA) e la piastra è stata incubata per 30 min a 37°C. Si è, quindi, condotta la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 570 nm, usando un lettore fotometrico automatico per micropiastre (DV 990 BV6). L'elaborazione della retta di taratura data dalle concentrazioni note di BSA ha permesso di estrapolare le concentrazioni proteiche dei campioni esaminati.

## **WESTERN BLOT – SDS-PAGE**

Quantità bilanciate di proteine per ogni campione (20 µg per p-ERK; 30 µg per p-Akt; 50 µg per HIF-1α) sono state aggiunte al tampone di caricamento (Tris-HCl 62.5 mM; SDS 2%; glicerolo 10%; DTT 1%; blu di bromofenolo 0.01%), bollite per 3 min, fatte impaccare attraverso uno stacking gel all'8% di acrilammide (Tris Buffer 125 mM, acrilammide 8%, ammonio persolfato 8%, Temed, acqua distillata, pH 6.8) e successivamente fatte correre attraverso un running gel al 12% di acrilammide (Tris Buffer 375 mM, acrilammide 12%, ammonio persolfato 12%, Temed, acqua distillata, pH 8.8), per la rilevazione di p-ERK e p-Akt, o attraverso un running gel all'8% di acrilammide (Tris Buffer 375 mM, acrilammide 8%, ammonio persolfato 8%, Temed, acqua distillata, pH 8.8), per la rilevazione di HIF-1α, per essere separate sulla base delle loro differenze di massa mediante elettroforesi. Le proteine separate sono state poi trasferite su una membrana di nitrocellulosa, precedentemente attivata, tramite immersione in metanolo 100% per 10 secondi e successiva immersione in H<sub>2</sub>O per 10 secondi, e imbevuta in tampone di trasferimento (Tris base 25 mM, glicina 150 mM, metanolo 10%, pH 8.3) per almeno 30 min. Il trasferimento è stato condotto a voltaggio costante per circa 15-20 min.

In seguito, le membrane sono state incubate per circa 2 h in blocking solution (latte magro in polvere 5% sciolto in TBS-Tween 20 0.1%) al fine di saturare i siti aspecifici di legame sulle nitrocellulose, e successivamente mantenute in agitazione a 4°C tutta la notte con le diverse soluzioni contenenti gli anticorpi primari:

- anticorpo policlonale anti-phospho-p44/42-Map-Kinase-Thr202/Tyr204 (phospho-ERK, 1:500, Cell Signaling);
- anticorpo policlonale anti-phospho-Akt (Ser473, 1:1000, Cell Signaling);
- anticorpo monoclonale anti-human HIF-1 $\alpha$  (1:300, BD Biosciences).

È stata poi effettuata un'incubazione di 1 h con un anticorpo secondario specifico coniugato con perossidasi di rafano (Horseradish Peroxidase, HRP), diluito opportunamente (1:5000) in blocking solution.

Le membrane sono state poi processate per lo sviluppo con metodo di rilevazione delle proteine ECL (Enhanced Chemiluminescence) tramite il kit ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare, Italia). Brevemente, dopo l'incubazione le membrane sono state poste in una cassetta autoradiografica con una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) per un periodo di tempo opportuno, in base all'anticorpo utilizzato, e sviluppate mediante l'utilizzo di una sviluppatrice automatica Kodak X-OMAT 2000. Le lastre così ottenute sono state scansionate e le relative bande sono state quantificate ed analizzate tramite un programma d'analisi d'immagine (Scion Image Software/ImageJ).

La normalizzazione delle bande proteiche è stata eseguita utilizzando:

- anticorpo policlonale anti-ERK 1 (K-23): sc-94 (pan-ERK, 1:3000, Santa Cruz Biotechnology) per p-ERK;
- anticorpo policlonale pan-Akt (1:500, Abcam) per p-Akt;
- anticorpo monoclonale anti- $\beta$ -Actin (1:5000, Sigma Aldrich) per HIF-1 $\alpha$ .

## **TECNICHE PER L'INDUZIONE DELL'IPOSSIA**

L'ipossia è stata indotta nelle cellule U87-MG, seminate in piastre da 96 pozzetti ( $1 \times 10^4$  cellule in 100  $\mu$ l per pozzetto) o in Petri 100 ( $2 \times 10^6$  cellule in 10 ml) e trattate o non con CBD, attraverso due metodiche differenti. Nel primo caso le cellule sono state trattate con CoCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M, in grado di simulare le condizioni di ipossia inibendo la prolif- idrossilazione del dominio di degradazione ossigeno-dipendente (ODDD) di HIF-1 $\alpha$  e la sua conseguente interazione con la proteina onco-soppressiva Von Hippel Lindau (Yuan *et al.*, 2003). Successivamente, le cellule sono state incubate per 24 h a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. Nel secondo caso le cellule, trattate o non con CBD, sono state incubate per 24 h a 37°C in un incubatore modulare (Billups Rothenberg Inc., Del Mar, CA, USA) con un flusso costituito da 1% di O<sub>2</sub>, 5% di CO<sub>2</sub> e 94% di N<sub>2</sub>.

## HUMAN ANTIBODY ARRAY KIT/PROTEOME PROFILER

Per un'analisi ad ampio spettro dei profili di espressione di diverse proteine implicate nel processo di angiogenesi tumorale abbiamo utilizzato il Proteome Profiler™ Human Antibody Array Kit (R&D Systems, U.K.). Questo saggio si avvale di membrane di nitrocellulosa sulle quali sono stati immobilizzati 55 anticorpi che riconoscono diverse proteine coinvolte nei processi di progressione tumorale, invasività ed angiogenesi.

Le cellule sono state seminate in piastra da 24 pozzetti a fondo piatto alla densità, per pozzetto, di  $9.6 \times 10^4$  cellule in 500  $\mu$ l di terreno, sono state lasciate aderire al fondo dei pozzetti per 24 h e, quindi, sono state trattate con CBD. Al termine del trattamento i surnatanti sono stati prelevati e centrifugati per 10 min a 1300 rpm. Quindi sono stati aggiunti di 15  $\mu$ l di Detection Antibody Cocktail per ogni ml di surnatante e si è proceduto con l'incubazione per 1 h a temperatura ambiente (RT).

Contemporaneamente le membrane sono state incubate con array buffer 7 per 1 h in agitazione a RT e quindi incubate con i surnatanti, precedentemente preparati, in agitazione a 4°C per tutta la notte. I complessi proteina/anticorpo presenti nei campioni si legano al corrispondente anticorpo presente sulla membrana di nitrocellulosa.

Successivamente le membrane sono state lavate con wash buffer e, quindi, asciugate appoggiandole leggermente su un foglio di carta assorbente per eliminare l'eccesso di wash buffer.

È stata preparata una soluzione di Streptavidina-HRP in array buffer 5 ed è stata aggiunta alle membrane asciutte. Si è incubato per 30 min in agitazione a RT. La Streptavidina-HRP permette la rilevazione di un prodotto colorato catalizzando la conversione di un substrato cromogeno incolore. Al termine dell'incubazione sono stati ripetuti i lavaggi con il wash buffer.

Le membrane di nitrocellulosa sono state poi processate per lo sviluppo con metodo di rilevazione delle proteine ECL (Enhanced Chemiluminescence) tramite il kit ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare, Italia). Brevemente, dopo l'incubazione le membrane sono state poste in una cassetta autoradiografica con una lastra autoradiografica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) e sviluppate mediante l'utilizzo di una sviluppatrice automatica Kodak X-OMAT 2000. I relativi spot sono stati analizzati utilizzando un programma d'analisi d'immagine (ImageJ). Il segnale di ogni spot è stato normalizzato rispetto al valore medio di segnale dei controlli positivi presenti su ciascuna membrana.

## **DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI MMP-2: TEST ELISA**

Il rilascio di MMP-2 da parte di cellule HUVE trattate e non con CBD è stato valutato tramite un enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D Systems). La metodica ELISA è un dosaggio immunologico colorimetrico utilizzato per la determinazione quantitativa di sostanze ed è basata sull'impiego di una reazione immunologica antigene-anticorpo, in cui la sostanza da determinare si comporta da antigene riconosciuto da specifici anticorpi, e di un sistema rilevatore che, sfruttando la reazione creata dall'enzima coniugato all'anticorpo secondario con uno specifico substrato, fa virare il colore in ragione alla concentrazione di antigene.

Il saggio si basa su un modello a sandwich, nel quale l'anticorpo è immobilizzato sulla superficie dei pozzetti. Il "sandwich" è completato da un secondo anticorpo che riconosce l'antigene legato all'anticorpo immobilizzato sul fondo del pozzetto. Per poter quantificare o individuare una sostanza si misura la quantità del secondo anticorpo legato, attraverso l'uso di un substrato colorimetrico. In particolare, nei nostri esperimenti, abbiamo utilizzato una micropiastra da 96 pozzetti coattata con un anticorpo policlonale specifico per la proteina di interesse.

I surnatanti cellulari, derivanti da U87-MG seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di  $4 \times 10^4$  cellule in 500  $\mu$ l per pozzetto e trattate o non con CBD, sono stati prelevati e chiarificati mediante centrifugazione.

Il contenuto di proteina è stato determinato tramite saggio del BCA (Pierce, U.S.A.) e ad ogni pozzetto è stato aggiunto un opportuno volume di campione (50  $\mu$ l nel caso di surnatanti cellulari o 20  $\mu$ g di proteine nel caso di omogenati di tessuto tumorale). La micropiastra è stata lasciata ad incubare per 2 h a RT in agitazione. Dopo il periodo di incubazione sono stati eseguiti 4 lavaggi con wash buffer. Successivamente, in ogni pozzetto è stato aggiunto l'anticorpo secondario specifico coniugato alla perossidasi di rafano. Dopo 2 h di incubazione a RT in agitazione sono stati eseguiti 4 lavaggi con wash buffer ed è stato aggiunto il substrato specifico, che contiene perossido d'idrogeno ed il cromogeno tetrametilbenzidina. Dopo 30 min di incubazione, al fine di bloccare la reazione enzimatica, è stata aggiunta una stop solution e l'intensità di colore, sviluppatasi in proporzione alla quantità di antigene presente, è stata misurata tramite un lettore di piastra (spettrofotometro) alle lunghezze d'onda di 450 nm e 570 nm.

## **TEST DI MIGRAZIONE CELLULARE - SCRATCH WOUND HEALING ASSAY**

Il wounding è un test sviluppato per la valutazione *in vitro* della migrazione e proliferazione cellulare che prevede la creazione di un solco, detto “scratch”, su un monostrato confluyente di cellule, il monitoraggio dello scratch, attraverso una fotocamera collegata ad un microscopio, all’inizio e ad intervalli regolari e la comparazione ed analisi delle immagini per quantificare il grado di migrazione cellulare.

Nei nostri esperimenti le cellule endoteliali HUVEC sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di  $4 \times 10^4$  cellule/pozzetto in 500  $\mu\text{l}$  di terreno completo e poste in incubatore per 24 h al fine di permettere l’adesione delle cellule. Al termine delle 24 h, il terreno è stato rimosso e lo scratch è stato creato orizzontalmente al centro del pozzetto utilizzando un puntale da 200  $\mu\text{l}$  sterile. Le cellule sono state successivamente lavate con PBS e trattate con CBD, disciolto in terreno EGM-2 a diverse concentrazioni. Il solco è stato monitorato e fotografato al tempo 0 e dopo 16 h e 24 h dalla creazione dello scratch utilizzando un microscopio a contrasto di fase con ingrandimento 10x. La migrazione è stata valutata come numero di cellule migrate all’interno del solco nell’arco di tempo in esame (16 h e 24 h) mediante conta manuale delle cellule relative ad 8 diversi campi per ogni condizione, utilizzando un programma d’analisi d’immagine (ImageJ Software).

## **TEST DI MIGRAZIONE CELLULARE: BOYDEN CHAMBER ASSAY**

Per valutare l’effetto delle nostre sostanze sulla migrazione cellulare abbiamo successivamente usato la camera di Boyden (Boyden chamber assay).

Per quanto riguarda le cellule di glioma U87-MG e T98G abbiamo utilizzato un kit (BD Biosciences) che contiene una piastra da 24 pozzetti nella quale sono alloggiati 12 inserti costituiti da una membrana di polietilene tereftalato (PET) con pori del diametro di 8.0  $\mu\text{m}$  (BD BioCoat Control Inserts). Le membrane sono state reidratate per 2 h a 37°C mettendo gli inserti in pozzetti contenenti 500  $\mu\text{l}$  di medium DMEM (Sigma), con solo l’1% di penicillina/streptomicina ed aggiungendone al loro interno la stessa quantità. terminate le 2 h gli inserti, svuotati del medium di reidratazione, sono stati spostati in altrettanti pozzetti della piastra contenenti 750  $\mu\text{l}$  di terreno condizionato che funge da chemiotattico, costituito dal terreno in cui sono cresciute le cellule per 3 giorni. Le cellule sono state, quindi, pretrattate per 1 h con il fitocannabinoide opportuno alle concentrazioni definite dal protocollo sperimentale e seminate all’interno degli inserti in presenza del trattamento alla densità, per

pozzetto, di  $2.5 \times 10^4$  cellule in 500  $\mu\text{l}$ . La camera di Boyden è stata messa in incubatore a  $37^\circ\text{C}$  per 22 h.

Per quanto riguarda, invece, le HUVEC abbiamo utilizzato una camera di Boyden modificata da 48 pozzetti. In essa un filtro Nucleopore di policarbonato, privo di polivinilpirrolidone, con pori del diametro di  $8.0 \mu\text{m}$  è stato posto sopra la parte inferiore della camera, contenente M199 supplementato con 10% di FBS come fattore chemoattraente. Le cellule sono state, anche in questo caso, pretrattate per 1 h con il fitocannabinoide opportuno alle concentrazioni definite dal protocollo sperimentale in presenza di M199 addizionato di 1% di BSA priva di acidi grassi e seminate nella parte superiore della camera in presenza del trattamento alla densità, per pozzetto, di  $5 \times 10^4$  cellule in 1 ml. In questo caso la camera di Boyden è stata messa in incubatore a  $37^\circ\text{C}$  per 6 h.

Al termine dell'incubazione, la parte superiore della membrana è stata scrapata con un cotton fioc, per eliminare le cellule che non hanno attraversato la membrana, e lavata con PBS. Le cellule nella parte inferiore della membrana sono state fissate 1 min in etanolo e colorate mediante colorazione Diff-Quick (Medion Diagnostics):

- 5 immersioni della durata di 1 secondo nella Soluzione Fissativa;
- 5 immersioni della durata di 1 secondo nella Soluzione Colorante I;
- 5 immersioni della durata di 1 secondo nella Soluzione Colorante II;
- breve lavaggio con acqua distillata per rimuovere l'eccesso di colorante.

Le membrane sono state poi lasciate essiccare a temperatura ambiente e sono stati montati i vetrini, che sono stati poi analizzati al microscopio ottico con ingrandimento 200x: tramite conta cellulare di tutti i campi ottici per ogni pozzetto si è quantificato l'evento migratorio.

## **TEST DI INVASIONE CELLULARE: BOYDEN CHAMBER ASSAY**

Per valutare l'effetto delle nostre sostanze sull'invasività cellulare, abbiamo usato la camera di Boyden (Boyden chamber assay) in presenza di matrigel. Per far ciò, analogamente a quanto precedentemente descritto per la valutazione della migrazione, anche in questo caso è stato utilizzato un kit (BD biosciences) che contiene una piastra da 24 pozzetti nella quale sono alloggiati 12 inserti costituiti da una membrana di Polietilene tereftalato (PET) con pori del diametro di  $8.0 \mu\text{m}$  su cui è, tuttavia, presente un sottile strato di matrigel (BD BioCoat matrigel invasion chambers). Quest'ultimo, mimando la struttura della matrice extracellulare, permette di valutare la capacità invasiva delle cellule.



L'esperimento è stato condotto analogamente a quanto spiegato per la valutazione della capacità migratoria delle cellule di glioma U87-MG e T98G.

### **SAGGIO DI MORFOGENESI IN PRESENZA DI MATRIGEL**

Gli effetti del CBD sulla capacità delle cellule endoteliali di riorganizzarsi e differenziare in reti capillari è stata valutata attraverso un saggio di morfogenesi *in vitro* in presenza di matrigel. Una piastra da 24 pozzetti preraffreddata a  $-20^{\circ}\text{C}$  è stata riempita lentamente con  $300\ \mu\text{l}$  per pozzetto di matrigel (10 mg/ml) liquido a  $4^{\circ}\text{C}$  con una pipetta con puntali preraffreddati, evitando la formazione di bolle. Il matrigel è stato poi lasciato polimerizzare per 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Le HUVEC sono state risospese in terreno completo con 2% di FBS in assenza o in presenza di CBD alle concentrazioni stabilite dal protocollo sperimentale alla densità, per pozzetto, di  $5 \times 10^4$  cellule in 1 ml e depositate attentamente al di sopra del matrigel polimerizzato. Gli effetti sulla crescita e la morfogenesi delle cellule endoteliali sono stati osservati dopo 6 h di incubazione con un microscopio invertito (Zeiss, Oberkochen, Germany), utilizzando ottiche CCD e un sistema di analisi digitale.

### **SAGGIO DI ANGIOGENESI *IN VITRO* CON L'UTILIZZO DI SFEROIDI**

Sferoidi di cellule endoteliali con un numero definito di cellule sono stati generati come descritto da Korff e Augustin (1998). Brevemente, 1000 HUVEC per pozzetto sono state risospese in M199 contenente 10% di FBS e 0.25% (w/v) di carbossimetilcellulosa e seminate in piastre da 96 pozzetti a fondo a U non aderenti. In queste condizioni, tutte le cellule in sospensione contribuiscono alla formazione di un singolo sferoide di cellule endoteliali. Questi sferoidi standardizzati sono stati raccolti dopo 24 h e fatti crescere in gel di collagene. 50-100 sferoidi sono stati risospesi in 0.3 ml di FBS 20% contenente 0.9% (w/v) di carbossimetilcellulosa ed aggiunti a 0.3 ml di una soluzione stock di collagene preparata con 8 volumi di collagene di coda di ratto (5 mg/ml) a  $4^{\circ}\text{C}$ , un volume di M199 10x ed un volume di NaOH 0.1 M per portare il pH a 7.4. Le diverse sostanze da testare sono state aggiunte agli sferoidi in sospensione prima di includerli nel collagene. Il gel contenente gli sferoidi è stato, quindi, rapidamente trasferito in piastre da 24 pozzetti preriscaldate e incubato per 48 h a  $37^{\circ}\text{C}$  in presenza di 5% di  $\text{CO}_2$ .

L'angiogenesi è stata quantificata misurando la lunghezza cumulativa di tutte le estroflessioni simil-capillari che si erano originate da ciascuno sferoide usando un programma

d'analisi d'immagine (ImageJ Software).

## **ANGIOGENESI *IN VIVO***

La capacità del CBD di inibire la formazione di nuovi vasi sanguigni *in vivo* è stata valutata attraverso un modello di spugne di matrigel descritto precedentemente (Albini *et al.*, 1994). Per l'allestimento di questo esperimento è stata utilizzata una soluzione di Matrigel Cultrex BME con Phenol Red (15.77 mg/ml, conservato a -20°C, Trevigen) atta a mimare la matrice extracellulare. Prima dell'utilizzo i flaconi di matrigel sono stati scongelati sotto acqua corrente fredda e messi in ghiaccio per evitare la polimerizzazione.

Alla soluzione di matrigel è stata aggiunta una soluzione (VTH) composta di VEGF murino (50 ng/μl, conservato a -80°C), TNF-α murino, citochina che *in vivo* induce la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso un aumento dei recettori del VEGF sulla membrana endoteliale, (10 ng/μl, conservato a -80°C) ed eparina (15 U/ml, conservata a temperatura ambiente). La soluzione di matrigel più VTH è stata successivamente suddivisa in 32 eppendorf a cui è stato aggiunto CBD alle diverse concentrazioni da testare secondo il seguente schema:

8 eppendorf: 550 μl matrigel + 4.12 μl mix VTH + 20 μl EtOH (CONTROLLO POSITIVO);  
8 eppendorf: 550 μl matrigel + 4.12 μl mix VTH + 5 μl CBD (0.125 mg) + 15 μl EtOH;  
8 eppendorf: 550 μl matrigel + 4.12 μl mix VTH + 10 μl CBD (0.250 mg) + 10 μl EtOH;  
8 eppendorf: 550 μl matrigel + 4.12 μl mix VTH + 20 μl CBD (0.500 mg).

Il trattamento è stato eseguito su 16 topi maschi C57 Black di 6-7 settimane. Tali topi sono stati stabulati in condizioni standard (21-24°C, 60% di umidità, 12 h giornaliere di luce artificiale) e nutriti con acqua e pellet.

I topi sono stati divisi in modo random in quattro gruppi sperimentali: tre gruppi dei trattati e uno dei controlli.

Dopo una settimana di stabulazione, negli animali sono stati iniettati per via sottocutanea due pellet, uno per fianco, utilizzando siringhe da insulina precedentemente raffreddate in ghiaccio. Terminato il trattamento, gli animali sono stati stabulati in gabbie singole e monitorati.

Dopo quattro giorni dal trattamento tutti gli animali sono stati sacrificati. I pellet sono stati espianati e trasferiti in una piastra da 24 pozzetti con 300 μl di PBS.

Successivamente i pellet sono stati pesati, trasferiti in nuove eppendorf con i corrispondenti surnatanti e processati per la determinazione del contenuto di emoglobina (Hb).

Dopo aver omogeneizzato il tutto con delle forbicine, i campioni sono stati centrifugati per 10 min a 12000 rpm a RT. Al termine della centrifugazione sono stati recuperati i surnatanti e trasferiti in altre eppendorf pulite aggiungendo 800 µl di Drabkin's solution. Si è incubato per 20 min al buio permettendo così la precipitazione dell'emoglobina grazie al legame con il Drabkin's reagent.

Terminata l'incubazione, le soluzioni contenute nelle eppendorf sono state trasferite in cuvette per la lettura dell'assorbanza a 540 nm. I risultati sono stati espressi come densità ottica (OD).

## **ANALISI STATISTICA**

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  S.E.M., oppure come % rispetto al controllo. Le analisi statistiche relative ai dati di vitalità cellulare, migrazione e invasione ed a tutti gli effetti dei singoli fitocannabinoidi sulle cellule sono state eseguite attraverso l'analisi di varianza ad una via ANOVA seguita dal test t di Dunnett. Le analisi statistiche per il confronto tra l'azione dei soli fitocannabinoidi sulla vitalità ed il loro effetto unito alla presenza degli antagonisti sono state eseguite attraverso l'analisi di varianza ad una via ANOVA seguita dal test di Bonferroni.

*Gli esperimenti di ipossia sono stati eseguiti in collaborazione con il gruppo di ricerca della professoressa Elena Monti (Università degli Studi dell'Insubria)*

*Tutti gli esperimenti svolti su colture cellulari primarie di cellule endoteliali sono stati eseguiti in collaborazione con il gruppo di ricerca della professoressa Lucia Vicentini (Università degli Studi di Milano).*

*Tutte le indagini svolte in vivo sull'angiogenesi sono state eseguite in collaborazione con il gruppo di ricerca della dottoressa Adriana Albini (Gruppo Multimedica).*

## **5. RISULTATI**

## **EFFETTO DEL CBD SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**

A scopo esemplificativo è riportata la curva dose-risposta relativa all'effetto del cannabidiolo (CBD) sulla vitalità di cellule di glioma umano U87-MG, valutato attraverso il test dell'MTT.

Dalla Fig. 1 è possibile rilevare che il trattamento delle U87-MG con CBD per un periodo di 24 h provoca un'inibizione concentrazione-dipendente della vitalità delle cellule con un  $IC_{50}$  pari a  $11.16 \mu M \pm 1.01$ .

## **EFFETTO DEL CBD SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**

Per indagare se il CBD potesse influenzare la capacità invasiva di cellule di glioma umano U87-MG ho impiegato il test della camera di Boyden in presenza di matrigel, che si basa sulla capacità delle cellule di degradare il matrigel stesso, che mima la struttura della matrice extracellulare, e muoversi attraverso di esso. L'evento migratorio è stato quantificato mediante conta cellulare al microscopio ottico.

Come mostrato in Fig. 2, il trattamento con CBD determina una diminuzione dell'invasione cellulare che va dal 10% al 90% rispetto al controllo nel range di concentrazioni da 0.5 a 12  $\mu M$ , raggiungendo la significatività statistica già alla concentrazione 1  $\mu M$ .

## **IDENTIFICAZIONE DI PATHWAY DEL SEGNALE MODULATI DA CBD IN CELLULE U87-MG**

Poiché è stato riportato che la modulazione dell'attività chinasi di ERK 1/2 e di Akt gioca un ruolo importante nella tumorigenicità delle cellule di glioma (Holland *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2008; Gallia *et al.*, 2009), ho voluto esaminare l'effetto del CBD sullo status di fosforilazione delle due chinasi attraverso un'analisi western blot.

Le immagini delle membrane riportate in Figg. 3-A e -C permettono una valutazione qualitativa dell'effetto del CBD sul livello delle proteine ERK ed Akt nelle loro forme fosforilate e totali. Dalla quantificazione dei segnali (Figg. 3-B e -D) è possibile osservare che l'esposizione di cellule U87-MG al CBD ha causato una riduzione concentrazione-dipendente dei livelli delle forme fosforilate di ERK 1/2 e della fosforilazione costitutiva di Akt, mentre i livelli di proteina totali di ERK ed Akt sono rimasti inalterati.

### **EFFETTO DEL CBD SULL'ESPRESSIONE DI HIF-1 $\alpha$ IN CELLULE U87-MG**

Poiché numerosi aspetti della crescita e dell'invasività tumorale dipendono dall'attivazione trascrizionale di diversi set di geni regolati da HIF-1, l'ipotesi che l'effetto antitumorale di CBD possa essere accompagnato dalla modulazione dell'espressione di HIF-1 $\alpha$  è stata testata in cellule U87-MG in condizioni sperimentali che causano la stabilizzazione di HIF-1 $\alpha$ , ossia l'esposizione a CoCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ M o a pO<sub>2</sub> 1% per 24 h.

Com'è possibile osservare dalle immagini delle membrane riportate in Fig. 4-A, l'esposizione di cellule U87-MG a CoCl<sub>2</sub> o a pO<sub>2</sub> 1% induce un marcato aumento dei livelli di HIF-1 $\alpha$  rispetto alle cellule normossiche, in cui la proteina HIF-1 $\alpha$  è a mala pena rilevabile. Inoltre, l'analisi densitometrica dei segnali (Fig. 4-B) indica che in cellule normossiche i livelli di HIF-1 $\alpha$  restano inalterati dal trattamento con CBD a tutte le concentrazioni utilizzate. Al contrario, in condizioni di ipossia, sia simulata sia effettiva, il CBD alle concentrazioni 5 e 9  $\mu$ M induce una diminuzione significativa dose-dipendente dei livelli di HIF-1 $\alpha$ . Dati non mostrati in questa tesi indicano che il CBD ha mostrato effetti antiproliferativi simili in entrambe le condizioni ipossiche e nello stato normossico in test di vitalità condotti in parallelo al western blot.

### **EFFETTO DEL CBD SUL PROFILO DI ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE IN CELLULE U87-MG**

Poiché la crescita cellulare, l'invasione e l'angiogenesi tumorali dipendono da pathway complessi e dall'attività di diverse proteine, ho quindi voluto analizzare se il CBD fosse in grado di interferire con il profilo di espressione di un set di proteine coinvolte nello

sviluppo tumorale in cellule U87-MG. A questo scopo ho utilizzato un saggio rapido e sensibile basato su un array di 55 anticorpi, immobilizzati su membrane di nitrocellulosa, che riconoscono altrettante proteine coinvolte nei processi di progressione tumorale e rilasciate nel surnatante di cellule di glioma trattate e non con CBD per 24 h.

Le immagini delle membrane riportate in Fig. 5-A permettono una valutazione qualitativa dell'effetto del CBD sul profilo di espressione di diverse proteine rilasciate da cellule U87-MG e legate agli anticorpi specifici immobilizzati su membrane di nitrocellulosa. Dalla quantificazione dei segnali, tra tutte le proteine rilevabili dalle membrane, sei proteine, ossia MMP-9, TIMP-1, TIMP-4, uPA, la SerpinaE1/PAI-1 e VEGF, risultano downregolate in risposta al CBD, con diversa entità che va da 20% a 60% rispetto al controllo, in base alla proteina considerata (Fig. 5-B).

## **EFFETTO DEL CBD SULLA VITALITÀ DI CELLULE ENDOTELIALI HUVEC**

L'angiogenesi gioca un ruolo cruciale nello sviluppo tumorale con particolare rilevanza nei gliomi. Per prima cosa ho valutato se il CBD potesse avere un effetto sulla vitalità di cellule endoteliali di cordone ombelicale umano (HUVEC). A tale scopo ho impiegato il test dell'MTT, che valuta il metabolismo ossidativo mitocondriale delle cellule. Inoltre, per verificare se il CBD fosse citotossico o inducesse apoptosi nelle cellule endoteliali, sono state condotte analisi citofluorimetriche di vitalità con doppia marcatura, con Annessina V e con 7-ammino-actinomicina D.

Come mostrato in Fig. 6-A, il trattamento con CBD determina un'inibizione concentrazione-dipendente del metabolismo ossidativo mitocondriale, valutato dal test dell'MTT, nel range di concentrazioni da 1  $\mu\text{M}$  a 19  $\mu\text{M}$ . Differenze statisticamente significative rispetto al controllo si possono osservare a partire dalla concentrazione 9  $\mu\text{M}$ , con un  $\text{IC}_{50}$  di  $9.90 \mu\text{M} \pm 1.02$  (Fig. 6-B).

Dall'analisi spettrofotometrica (Fig. 6-C) è possibile osservare che una percentuale elevata di cellule vitali (circa 90%) è stata osservata sia nei campioni trattati, sia in quelli non trattati, e nessuna differenza significativa di distribuzione è stata osservata in tutte le condizioni rispetto alle cellule non trattate. Questi dati mostrano che il CBD non ha effetto tossico sulle HUVEC, suggerendo che gli effetti inibitori mostrati sulla vitalità cellulare non sono dovuti ad apoptosi o a tossicità, ma piuttosto a citostasi.

## **EFFETTO DEL CBD SULLA MIGRAZIONE DI CELLULE HUVE**

Ho, quindi, voluto investigare se il CBD fosse in grado di modulare, oltre alla vitalità, anche la migrazione di cellule HUVE. A tale scopo, è stato impiegato inizialmente il test della camera di Boyden modificata a 48 pozzetti, che si basa sulla capacità delle cellule di migrare attraverso una membrana di policarbonato con pori di 8.0  $\mu\text{m}$ . L'evento migratorio è stato quantificato mediante conta cellulare al microscopio ottico. Inoltre, per confermare questo effetto antimigratorio, è stato condotto un cosiddetto scratch wound healing assay, in cui è stato effettuato un solco lineare in un monolayer di cellule a confluenza e si è valutato il numero di cellule migrate in esso nel tempo. Sono state prese immagini dell'area del solco a 0 h, 16 h e 24 h usando un microscopio a contrasto di fase con obiettivo 10x.



Come mostrato in Fig. 7-A, il trattamento con CBD causa una riduzione della migrazione cellulare in camera di Boyden dal 30% al 75% rispetto al controllo nel range di concentrazioni da 1 a 10  $\mu\text{M}$ , raggiungendo la significatività statistica già a 1  $\mu\text{M}$ .

L'effetto antimigratorio del CBD è stato confermato anche nel test del wound healing. Infatti, nella Fig. 7-B è possibile osservare che nel gruppo controllo le cellule sono migrate nell'area vuota già dopo 16 h di trattamento, mentre c'è una chiara riduzione della migrazione nelle cellule trattate con CBD. La quantificazione delle cellule migrate (Fig. 7-C) mostra che questo effetto è concentrazione-dipendente, è evidente già dopo 16 h di trattamento e persiste fino a 24 h. Il calcolo dell' $\text{IC}_{50}$  ha indicato un valore di  $9.31 \mu\text{M} \pm 1.02$ .

### **EFFETTO DEL CBD SUL PROFILO DI ESPRESSIONE DI PROTEINE CORRELATE ALL'ANGIOGENESI IN CELLULE HUVE**

Poiché l'angiogenesi dipende dall'attività di diverse proteine coinvolte in pathway complessi, ho deciso di analizzare se il CBD interferisse con il profilo di espressione di una serie di proteine coinvolte nel processo angiogenico, usando l'array di anticorpi precedentemente descritto incubato con il surnatante di cellule endoteliali trattate e non con CBD per 24 h.

Inoltre, dato il ruolo cruciale giocato da MMP-2 nell'indurre l'angiogenesi, e dal momento che i livelli di questa proteina non possono essere rilevati attraverso l'array di anticorpi utilizzato, è stato condotto un saggio ELISA per valutare se il CBD potesse agire anche attraverso la modulazione del rilascio di MMP-2 nei surnatanti di cellule HUVE trattate o non con il farmaco per 24 h.

Le immagini delle membrane mostrate in Fig. 8-A permettono una valutazione qualitativa dell'effetto del CBD sul profilo di espressione di diverse proteine rilasciate dalle HUVEC e legate agli anticorpi specifici immobilizzati su membrane di nitrocellulosa. Dalla quantificazione dei segnali, tra tutte le proteine rilevabili dalle membrane, otto proteine, ossia MMP-9, TIMP-1, la SerpinaE1/PAI-1, uPA, CXCL16, l'Endotelina-1, PDGF-AA ed IL-8, risultano downregolate in risposta al CBD, con diversa entità che va da 10% a 50% rispetto al controllo, in base alla proteina considerata (Fig. 8-B).

Inoltre, come mostrato in Fig. 8-C, dopo un aumento non significativo alla più bassa concentrazione testata, il CBD induce un decremento concentrazione-dipendente del rilascio di MMP-2, particolarmente significativo alle concentrazioni più alte.

### **EFFETTO DEL CBD SULLA MORFOGENESI ENDOTELIALE *IN VITRO***

Le cellule endoteliali di cordone ombelicale umano seminate su uno strato di matrigel tridimensionale sono in grado nel giro di 6 h di organizzarsi in reti capillari, mimando *in vitro* gli eventi che avvengono *in vivo* durante il processo angiogenico (Grant *et al.*, 1989). Per questo ho impiegato tale modello per caratterizzare l'effetto antiangiogenico *in vitro* del CBD.

Com'è possibile osservare dalla Fig. 9, nel controllo positivo le cellule sono state in grado di formare una rete capillare ben organizzata. Al contrario, il trattamento con CBD interferisce con la morfogenesi delle HUVEC e la rete di tubuli che si forma è più rarefatta e disorganizzata.

### **EFFETTO DEL CBD SULLA FORMAZIONE DI STRUTTURE SIMILI A CAPILLARI A PARTIRE DA SFEROIDI DI CELLULE HUVE**

Per caratterizzare meglio l'effetto del CBD sulla formazione di strutture capillari *in vitro* è stato messo a punto un saggio di angiogenesi tridimensionale basato su gel di collagene in cui la formazione di strutture simili a capillari da parte delle cellule endoteliali può essere misurata quantitativamente (Korff e Augustin, 1999; Cattaneo *et al.*, 2009).

Dalla Fig. 10 è possibile notare che il CBD inibisce significativamente la formazione di strutture capillari indotte da VEGF da parte degli sferoidi di HUVEC già alla concentrazione 1  $\mu$ M, confermando la sua capacità di agire, almeno *in vitro*, come fattore antiangiogenico e suggerendo un effetto ad ampio raggio sulla formazione di nuovi capillari.

## **EFFETTO DEL CBD SULL'ANGIOGENESI *IN VIVO***

Il modello di spugne di matrigel è stato utilizzato come sistema rapido e quantitativo per misurare l'attività antiangiogenica *in vivo* del CBD. L'iniezione sottocutanea di matrigel ha prodotto un pellet tridimensionale che, in presenza di fattori angiogenici, viene rapidamente vascolarizzato.

Com'è possibile notare dalla Fig. 11-A, il cocktail di fattori angiogenici (VEGF, TNF- $\alpha$  ed eparina) disciolti nel matrigel induce una potente reazione angiogenica, rivelata da un'intensa colorazione rossa dei pellet. L'aggiunta di concentrazioni crescenti di CBD a questa soluzione inibisce significativamente l'angiogenesi *in vivo* (da 0.125 mg/pellet), come testimoniato da una minore colorazione della maggior parte dei pellet e, addirittura, dall'aspetto trasparente di alcuni campioni, che corrisponde all'aspetto del matrigel di per sé. La misurazione del contenuto di emoglobina dei gel recuperati (Fig. 11-B) conferma che il CBD riduce drasticamente la vascolarizzazione dei pellet.

## **EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**

Sulla base dei promettenti dati ottenuti con il CBD, ho voluto, quindi, valutare se anche altre molecole che presentano affinità strutturale con i principali e più studiati derivati cannabinici, quali THC e CBD, potessero avere un effetto antitumorale sulla linea cellulare di glioma umano U87-MG. Ho innanzitutto valutato se la cannabidivarina (CBDV), la  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) ed il cannabigerolo (CBG) potessero influenzare la crescita della linea cellulare di glioma umano U87-MG attraverso il test dell'MTT.

Dalla Fig. 12 è possibile rilevare che: (A) il trattamento delle U87-MG con CBDV per un periodo di 24 h provoca un'inibizione concentrazione-dipendente della vitalità delle cellule, con un valore di  $IC_{50}$  pari a  $17.79 \mu M \pm 1.03$ ; (B) il trattamento delle U87-MG con THCV per un periodo di 24 h provoca un'inibizione concentrazione-dipendente della vitalità delle cellule, con un valore di  $IC_{50}$  pari a  $13.82 \mu M \pm 1.00$ ; inoltre (C) il trattamento delle U87-MG con CBG per un periodo di 24 h provoca un'inibizione concentrazione-dipendente della vitalità delle cellule con un valore di  $IC_{50}$  pari a  $10.95 \mu M \pm 1.01$ .

## **EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G**

Per supportare l'effetto di questi fitocannabinoidi su cellule di glioma umano, ho, quindi, valutato se la cannabidivarina (CBDV), la  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) ed il cannabigerolo (CBG) potessero influenzare la crescita anche di un'altra linea cellulare di glioma umano, T98G, attraverso il test dell'MTT.

Dalla Fig. 13 è possibile rilevare che: (A) il trattamento delle T98G con CBDV per un periodo di 24 h provoca un'inibizione concentrazione-dipendente della vitalità delle cellule, con un valore di  $IC_{50}$  pari a  $18.12 \mu M \pm 1.02$ ; (B) il trattamento delle T98G con THCV per un periodo di 24 h provoca un'inibizione della vitalità delle cellule con un effetto tutto-o-nulla in cui la significatività statistica si raggiunge a partire dalla concentrazione  $16 \mu M$ ; inoltre (C) il trattamento delle T98G con CBG per un periodo di 24 h provoca un'inibizione della vitalità delle cellule con un effetto tutto-o-nulla che si evidenzia tra la concentrazione  $16 \mu M$  e la  $19 \mu M$ .

## **EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**

Il mio obiettivo successivo è stato quello di investigare se i tre fitocannabinoidi CBDV, THCV e CBG potessero influenzare la migrazione delle cellule di glioma umano U87-MG. A tale scopo è stato impiegato il test della camera di Boyden, che si basa sulla capacità delle cellule di migrare attraverso una membrana di polietilene tereftalato (PET) con pori di 8.0  $\mu\text{m}$ . L'evento migratorio è stato quantificato mediante conta cellulare al microscopio ottico.

Dalla Fig. 14 è possibile rilevare che (A) il trattamento delle U87-MG con CBDV per un periodo di 22 h provoca un'inibizione significativa della migrazione cellulare nel range di concentrazioni utilizzate non dose-dipendente che si attesta intorno al 45% per tutte le concentrazioni; (B) il trattamento delle U87-MG con THCV per un periodo di 22 h provoca un'inibizione significativa della migrazione cellulare nel range di concentrazioni utilizzate non dose-dipendente che si attesta intorno al 50% per tutte le concentrazioni; (C) il trattamento delle U87-MG con CBG per un periodo di 22 h provoca un'inibizione della migrazione cellulare nel range di concentrazioni utilizzate non dose-dipendente, che tuttavia risulta significativa solo alla concentrazione di trattamento più alta utilizzata, 10  $\mu\text{M}$  (25% circa di inibizione).

## **EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G**

Analogamente a quanto fatto per la vitalità cellulare, ho, quindi, voluto investigare se i tre fitocannabinoidi CBDV, THCV e CBG potessero influenzare la migrazione anche delle cellule di glioma umano T98G. A tale scopo ho impiegato il test della camera di Boyden, precedentemente descritto. L'evento migratorio è stato quantificato mediante conta cellulare al microscopio ottico.

Dalla Fig. 15 è possibile rilevare che (A) il trattamento delle T98G con CBDV per un periodo di 22 h provoca una riduzione dose-dipendente della capacità migratoria, che va dal 40% all'80% circa nel range di concentrazioni utilizzate, con un  $\text{IC}_{50}$  di 3.82  $\mu\text{M}$ ; (B) il

trattamento delle T98G con THCV per un periodo di 22 h provoca un'inibizione significativa della migrazione cellulare nel range di concentrazioni utilizzate che non è dose-dipendente e varia dal 25% al 50% circa; (C) il trattamento delle T98G con CBG causa un'inibizione della migrazione con un andamento a campana nel range di concentrazioni utilizzate (20% circa di inibizione a 0.25  $\mu$ M; 40% circa a 10  $\mu$ M).

### **EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**

Quindi, il mio obiettivo è stato quello di investigare se i tre fitocannabinoidi CBDV, THCV e CBG potessero influenzare l'invasività delle cellule di glioma umano U87-MG. Per fare ciò ho impiegato il test della camera di Boyden in presenza di matrigel, precedentemente descritto, che si basa sulla capacità delle cellule di degradare il matrigel stesso, che mima la struttura della matrice extracellulare, e muoversi attraverso di esso. L'evento invasivo è stato quantificato tramite conta cellulare al microscopio ottico.

Dalla Fig. 16 è possibile rilevare che (A) il trattamento delle U87-MG con CBDV per un periodo di 22 h provoca un'inibizione significativa dell'invasività cellulare che varia dal 40% al 70% in base alla concentrazione considerata; (B) il trattamento delle U87-MG con THCV per un periodo di 22 h provoca un'inibizione significativa dell'invasività cellulare che si aggira intorno al 50% nel range di concentrazioni utilizzate; (C) il trattamento delle U87-MG con CBG per un periodo di 22 h non provoca alcuna inibizione significativa dell'invasività cellulare.

### **EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G**

Infine, come già mostrato per la vitalità cellulare e la capacità migratoria, ho voluto investigare se i tre fitocannabinoidi CBDV, THCV e CBG potessero influenzare l'invasività anche delle cellule di glioma umano T98G. A tale scopo ho impiegato il test della camera di Boyden in presenza di matrigel, precedentemente descritto. L'evento invasivo è stato quantificato tramite conta cellulare al microscopio ottico.

Dalla Fig. 17 è possibile rilevare che (A) il trattamento delle T98G con CBDV per un periodo di 22 h provoca un'inibizione significativa dell'invasività cellulare che si attesta attorno al 75% per tutte le concentrazioni utilizzate; (B) il trattamento delle T98G con THCV per 22 h causa un'inibizione dell'invasività con un andamento a campana che è significativa solo per la concentrazione più bassa utilizzata (60% circa a 0.25  $\mu$ M) e per la più alta (70% circa a 10  $\mu$ M); (C) il trattamento delle T98G con CBG per 22 h causa un'inibizione dell'invasività significativa solo alle concentrazioni più elevate utilizzate (20% circa per 5  $\mu$ M e 30% per 10  $\mu$ M).

### **IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI COINVOLTI NEGLI EFFETTI DI CBDV, THCV E CBG**

Per verificare se gli effetti dei fitocannabinoidi considerati, CBDV, THCV e CBG, sulle cellule U87-MG e T98G fossero mediati dai recettori cannabici CB1 e CB2 e dal recettore vanilloide TRPV1 ho impiegato antagonisti selettivi di questi recettori e precisamente l'AM251, antagonista del recettore CB1, l'AM630, antagonista del recettore CB2, e la capsazepina (CPZ), antagonista del recettore vanilloide TRPV1. Le cellule U87-MG e T98G sono state pre-incubate per mezz'ora con ciascuno degli antagonisti, AM251, AM630 e CPZ, e in seguito trattate per 24 h con ciascuno dei fitocannabinoidi.

Gli effetti degli antagonisti sono riportati in Figg. 18 e 19 e riassunti nelle Tabb. 20 e 21.

Dalla Fig. 18 è possibile rilevare che gli effetti delle tre molecole, CBDV, THCV e CBG, sulla vitalità cellulare precedentemente descritti per le cellule U87-MG non risultano in nessun caso alterati in maniera significativa dalla presenza di nessuno dei tre antagonisti recettoriali selettivi AM251, AM630 e CPZ.

Analogamente, la Fig. 19 mostra che gli effetti inibitori dei tre fitocannabinoidi precedentemente descritti per le cellule T98G non risultano alterati in maniera significativa dalla presenza di nessuno dei due antagonisti recettoriali selettivi AM251 ed AM630.

## **6. DISCUSSIONE**



Molti lavori preclinici hanno evidenziato in modelli sperimentali sia *in vivo*, sia *in vitro* che il THC, principio attivo della *Cannabis sativa*, possiede una significativa azione antiproliferativa nei confronti di diverse linee di glioma. Sebbene questi risultati siano di estremo interesse terapeutico, la possibilità di utilizzare il THC come agente antineoplastico è limitata dalle sue ben note attività psicotrope. Per questo molto interesse hanno destato le recenti evidenze sperimentali che anche il cannabidiolo (CBD), un fitocannabinoide non psicoattivo, esercita effetti antineoplastici sui gliomi.

Infatti, come dimostrato anche dal nostro gruppo di ricerca, il CBD possiede attività antiproliferativa sia *in vitro*, su cellule di glioma U87-MG, sia *in vivo*, in xenotrapianti in topi *nude*, ed infine inibisce la migrazione delle cellule di glioma. Queste attività non sono mediate dai principali recettori per i cannabinoidi, CB1 e CB2, né dal recettore per i vanilloidi TRPV1, ma implicano meccanismi che coinvolgono l'induzione dell'apoptosi, attraverso attivazione delle caspasi-8 e 9, e meccanismi di stress ossidativo, quali la produzione di ROS e la modulazione di 5-LOX. Sulla base di questi dati abbiamo voluto caratterizzare ulteriormente l'azione antitumorale del CBD e contribuire a chiarirne il meccanismo d'azione.

La progressione maligna dei tumori è caratterizzata, oltre che dalla proliferazione cellulare, da migrazione e invasività. Pertanto gli eventi migratori ed invasivi sono dei validi bersagli per l'azione di farmaci antitumorali. Inoltre, l'alto tasso d'invasività delle cellule tumorali nel tessuto cerebrale è un segno distintivo dei gliomi e rappresenta un aspetto importante che rende conto in larga parte della loro prognosi negativa. La capacità delle cellule tumorali di invadere il tessuto sano è cruciale per la diffusione e la crescita del tumore e per questo la capacità di farmaci antitumorali di inibire la capacità invasiva delle cellule, oltre che indurre l'apoptosi e/o l'arresto della crescita, è considerata fondamentale per il successo della terapia. Questo processo richiede una serie di eventi biologici distinti, ma concertati, come l'alterazione del citoscheletro, il coinvolgimento di recettori di superficie e la secrezione di molecole di segnalazione (Rao, 2004). I nostri risultati dimostrano che il CBD inibisce in maniera efficace l'invasività delle cellule di glioma, come testato attraverso il saggio della camera di Boyden in presenza di matrigel, in cui il farmaco agisce già a concentrazioni molto basse. È interessante notare che, come abbiamo già dimostrato per la migrazione (Vaccani *et al.*, 2005), la diminuzione dell'invasività dovuta al trattamento con CBD è significativa a concentrazioni più basse di quelle richieste per causare un'inibizione del 50% della vitalità cellulare (1  $\mu$ M vs 11  $\mu$ M dell'MTT condotto in parallelo al test di invasione). La capacità del CBD di ridurre l'invasività del glioma è in accordo con i dati di

Marcu *et al.* (2010), condotti su diverse linee cellulari, sebbene il range di concentrazioni efficaci e la sensibilità delle cellule appaiano differenti. Questo potrebbe essere dovuto alle diverse condizioni sperimentali applicate (3 giorni di trattamento nel lavoro di Marcu *vs* 24 h di esposizione nella presente tesi) ed alle differenti linee cellulari utilizzate (SF126 e U373 *vs* U87-MG). Nel saggio d'invasione, il CBD non sembra mostrare una classica risposta concentrazione-dipendente, agendo in un intervallo di concentrazioni molto stretto. Questo potrebbe essere correlato al fatto che, mentre gli altri cannabinoidi, com'è noto, agiscono attraverso attivazione dei recettori cannabici (Preet *et al.*, 2008; Ramer e Hinz, 2008), è stato dimostrato che il CBD agisce sui gliomi attraverso un meccanismo indipendente dai recettori per i cannabinoidi ed i vanilloidi (Massi *et al.*, 2004; Vaccani *et al.*, 2005; McPartland *et al.*, 2007). Inoltre, bisogna ricordare che anche altri effetti farmacologici del CBD, quali ad esempio i suoi effetti anticonvulsivanti ed antidepressivi in animali modello, non sono sempre dose-correlati (Jones *et al.*, 2011; El-Alfy *et al.*, 2010) e perfino alcuni altri cannabinoidi sintetici con struttura chinonica, come HU-336 (tetraidrocannabinolo chinone) ed HU-345 (cannabinolo chinone), sono in grado di inibire l'angiogenesi dell'anello aortico in modo più potente dei corrispondenti composti di origine (THC e cannabinolo, rispettivamente), ma senza un chiaro effetto dose-risposta (Kogan *et al.*, 2006). Perciò la mancanza di un classico effetto concentrazione-dipendente del CBD nei nostri esperimenti con il matrigel potrebbe essere in parte correlata alla sua bassa affinità per i recettori cannabici e in parte alla sensibilità del test *in vitro* utilizzato.

Un aspetto importante che abbiamo voluto approfondire nel presente lavoro di tesi è la caratterizzazione dei meccanismi cellulari responsabili degli effetti antitumorali del CBD, ad oggi solo parzialmente compresi (Massi *et al.*, 2004; 2006; 2008; Vaccani *et al.*, 2005; McKallip *et al.*, 2006; McAllister *et al.*, 2007). Gli esperimenti condotti dimostrano che il CBD downregola fortemente due pathway del segnale critici per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule di glioma quali ERK e PI3K/Akt. È dimostrato che queste molecole di segnalazione giocano un ruolo cruciale nella proliferazione delle cellule tumorali, nella loro capacità di sfuggire all'apoptosi ed all'arresto del ciclo cellulare, nella motilità e nell'invasività cellulare (Kolch, 2000; Brazil e Hemmings, 2001). In apparente contrasto con i nostri dati, Marcu *et al.* (2010) hanno riportato che in cellule di glioblastoma umano il trattamento con il solo CBD non induce cambiamenti nella fosforilazione di ERK, mentre quando CBD è somministrato in combinazione con una dose submassimale di THC si ha una sostanziale downregolazione di ERK fosforilato. La bassa concentrazione di CBD utilizzata

dal gruppo di Marcu (0.4  $\mu$ M), il diverso paradigma di trattamento (come detto, Marcu espone le cellule a CBD per 72 h, mentre noi per sole 24 h) e le differenti linee cellulari impiegate (SF126 e U373 nel caso di Marcu) potrebbero, tuttavia, giustificare la discrepanza con i nostri risultati.

D'altra parte, è stato dimostrato che l'attivazione delle protein chinasi mitogeno attivate (MAPK) regola strettamente l'attivazione delle metalloproteasi di matrice e la conseguente migrazione e invasività delle cellule tumorali (Huang *et al.*, 2004). Recenti evidenze indicano che anche Akt è altamente attivata nei gliomi e rappresenta un punto nodale nella segnalazione cellulare indotta da diversi stimoli, inclusi i fattori di crescita (Holland *et al.*, 2000; Gallia *et al.*, 2009). Le chinasi rappresentano, per questi motivi, dei potenziali bersagli per la ricerca di nuove strategie antitumorali e numerosi inibitori delle chinasi sono attualmente in fase di sperimentazione in trial clinici (Liang *et al.*, 2007; Di Cosimo e Baselga, 2008). Perciò la simultanea inibizione farmacologica di Akt ed ERK da parte del CBD potrebbe rappresentare un valido punto a sostegno del suo potenziale impiego terapeutico nei gliomi.

Un importante contributo al quadro degli effetti antitumorali del CBD è la dimostrazione per la prima volta che HIF-1 $\alpha$ , un fattore critico per la modulazione della progressione di molti tipi di tumori, è fortemente downregolato in condizioni di ipossia in seguito all'esposizione delle cellule di glioma al CBD. I gliomi hanno vaste aree di severa ipossia e necrosi, che rappresentano un ostacolo molto grande al successo della chemioterapia. L'ipossia tumorale è tipicamente associata con la prognosi negativa dei pazienti. Recentemente, la ricerca di molti laboratori ha indicato che in condizioni ipossiche uno dei maggiori regolatori trascrizionali dei programmi di adattamento e di induzione della sopravvivenza cellulare, della motilità e dell'angiogenesi tumorale è il fattore trascrizionale inducibile da ipossia HIF-1, costituito da una subunità  $\beta$  stabile e dalla subunità  $\alpha$ , che in condizioni normossiche è rapidamente degradata ed è, invece, stabilizzata in ipossia (Kaur *et al.*, 2005; Semenza, 2003). Quindi, la riduzione dei livelli ipossici di HIF-1 $\alpha$  in seguito al trattamento con CBD può rappresentare uno degli aspetti attraverso cui il farmaco esplica la sua attività antineoplastica.

Infine, usando un pannello di 55 anticorpi immobilizzati su membrane di nitrocellulosa e specifici per proteine coinvolte nei processi tumorali abbiamo dimostrato che l'esposizione delle cellule U87-MG al CBD determina una simultanea inibizione di sei

proteine: la metalloproteasi MMP-9, i regolatori delle metalloproteasi TIMP-1 e TIMP-4, l'attivatore del plasminogeno uPA, il suo inibitore SerpinaE1/PAI-1 ed il fattore di crescita VEGF. Tutte queste proteine sono coinvolte a vari livelli in malignità, motilità, invasione ed angiogenesi tumorale.

Le metalloproteasi (MMP) sono proteine fondamentali upregolate nei gliomi e strettamente associate con la malignità di questi tumori (Lu *et al.*, 2004). Le MMP favoriscono la motilità delle cellule tumorali, l'invasione e l'angiogenesi attraverso la degradazione della matrice extracellulare (ECM) e giocano un ruolo nel signaling intracellulare agendo come segnali chemotattici (McCawley e Matrisian, 2001). Perciò il decremento di MMP-9 potrebbe contribuire ai meccanismi attraverso cui il CBD riduce l'invasività delle cellule U87-MG. Anche l'inibitore tissutale delle metalloproteasi-1 (TIMP-1), un fattore presente nello stroma con molte funzioni, viene downregolato dal trattamento con CBD. L'overespressione di TIMP-1 correla con l'aggressività clinica di uno spettro di tumori tra cui i gliomi. Inoltre TIMP-1 è un fattore di segnalazione in grado di stimolare i pathway di ERK ed Akt, con conseguente induzione della proliferazione cellulare (Chirco *et al.*, 2006).

Oltre al sistema MMP/TIMP, l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi uPA e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno SerpinaE1/PAI-1 sono fattori importanti nella regolazione della crescita cellulare e della diffusione del tumore. Gli esperimenti da noi condotti hanno dimostrato un decremento dei livelli di uPA, che è noto essere correlato con la malignità dei gliomi primari e con più brevi prospettive di vita dei pazienti. Inoltre, anche la SerpinaE1/PAI-1 viene ridotta in seguito al trattamento con CBD. Sebbene ci si aspetterebbe che bassi livelli di quest'ultima proteina nei tumori favorissero la crescita delle cellule tumorali, alcuni studi clinici hanno indicato che i livelli di espressione della SerpinaE1 sono direttamente correlati con l'aggressività del cancro. Ad oggi questa apparente discrepanza non è stata ancora chiarita e alcuni lavori recenti suggeriscono che la SerpinaE1 possa avere altri ruoli multifunzionali nella regolazione di angiogenesi, invasività e adesione cellulare (Ulisse *et al.*, 2009).

Non ultimo, i nostri dati dimostrano che il CBD è in grado di downregolare significativamente anche il VEGF, forse il fattore più importante nella regolazione dell'angiogenesi, in grado di stimolare la crescita di nuovi vasi sanguigni.

D'altra parte, la diminuzione del livello di TIMP-4 che abbiamo osservato in seguito al trattamento con CBD è piuttosto difficile da spiegare e conciliare con l'effetto antitumorale del CBD. Infatti l'unico studio volto a chiarire il ruolo di TIMP-4 nei gliomi riporta una

correlazione negativa tra il livello di TIMP-4 ed il grado della malattia (Groff *et al.*, 2001). Saranno quindi necessari ulteriori studi per comprendere meglio come la famiglia di TIMP sia coinvolta nei diversi livelli di progressione tumorale e per chiarire il ruolo di TIMP-4 nello sviluppo del glioma.

I risultati fin qui discussi forniscono un ulteriore contributo per chiarire l'azione antitumorale del cannabinoide non psicoattivo CBD, mostrando molteplici meccanismi attraverso cui il cannabinoide può provocare i suoi effetti. I dati presentati in questo lavoro sono al momento limitati alle cellule U87-MG, ma risultati preliminari sulle cellule T98G indicano simili effetti del CBD anche in questa linea cellulare di glioma (test dell'MTT,  $IC_{50}$   $13.5 \mu M \pm 1.01$ ; dati non mostrati).

Al momento non è ancora stato completamente chiarito come il CBD moduli gli eventi cellulari studiati. Come già detto, risultati precedenti hanno escluso il coinvolgimento dei recettori cannabici classici, CB1 e CB2, e del recettore dei vanilloidi TRPV1 nell'effetto antitumorale del CBD sui gliomi. Questo non sorprende, considerata la bassa affinità del CBD sia per il recettore CB1, sia per il CB2 (McPartland *et al.*, 2007). Recentemente è stato proposto che il GPR55, un recettore orfano associato a proteine G che risulta upregolato in alcune linee cellulari di derivazione tumorale e che gioca un ruolo chiave nella proliferazione di cellule tumorali (Andradas *et al.*, 2011), potrebbe rendere conto di alcuni degli effetti dei cannabinoidi non mediati da CB1 e CB2 (Ross, 2009). In particolare, il CBD sembrerebbe agire come antagonista dei GPR55 (Ryberg *et al.*, 2007). Tuttavia, al momento il possibile coinvolgimento di GPR55 ed il suo ruolo effettivo nel mediare gli effetti del CBD è ancora controverso. Esperimenti futuri che utilizzino siRNA contro GPR55 potranno contribuire a chiarire il ruolo di questo recettore nell'attività antitumorale del CBD.

Una caratteristica peculiare dei gliomi è la loro spiccata capacità invasiva, che a sua volta è associata e sostenuta da un'intensa angiogenesi tumorale. In effetti, tra i tumori solidi, i gliomi sono quelli caratterizzati dal più alto grado di proliferazione vascolare, che correla con il loro grado di malignità, di aggressività, con la ricaduta clinica e con le basse prospettive di sopravvivenza dei pazienti. Il passo successivo del presente lavoro di tesi è stato, quindi, quello di valutare se il CBD avesse un effetto sull'angiogenesi, oltre agli effetti antitumorali fin qui caratterizzati.

L'angiogenesi è un processo finemente regolato caratterizzato da varie fasi che comprendono la migrazione chemotattica, l'invasione, la proliferazione e il differenziamento

delle cellule endoteliali in vasi capillari e la produzione di una membrana basale attorno a questi vasi (Folkman, 1995; Kesisis *et al.*, 2007). In questo studio il CBD ha mostrato spiccate proprietà antiangiogeniche, inibendo la crescita, la migrazione e l'invasione delle cellule endoteliali *in vitro* e l'angiogenesi *in vivo* in modelli di spugne di matrigel. Inoltre, studi molecolari *in vitro* hanno dimostrato che il CBD induce una downregolazione di diversi fattori angiogenici.

Il CBD inibisce significativamente la vitalità delle cellule endoteliali isolate da cordone ombelicale umano (HUVEC). L'analisi citofluorimetrica ha mostrato che questo effetto non dipende dall'induzione di apoptosi o necrosi delle cellule endoteliali da parte del CBD, suggerendo un'azione citostatica di questa molecola. Sulla base di saggi *in vitro* e *in vivo* è stato dimostrato che numerosi farmaci chemioterapici hanno anche attività antiangiogenica (Miller *et al.*, 2001). Tuttavia, molti di essi sono antiangiogenici solo a concentrazioni citotossiche o vicino ad esse, e perciò la rilevanza clinica di questi effetti è controversa. Al contrario, l'analisi al FACS mostra che il CBD non induce apoptosi o necrosi neppure a concentrazioni relativamente elevate (12  $\mu\text{M}$ ). Le caratteristiche del CBD sono simili a quelle di altre molecole antiangiogeniche di origine naturale, come l'epigallocatechina-3-gallato e l'iperforina, che inibiscono la proliferazione cellulare, ma non sono citotossiche e possono perfino inibire l'apoptosi delle cellule endoteliali (Fassina *et al.*, 2004; Lorusso *et al.*, 2009; Noonan *et al.*, 2011). Questo sembrerebbe in contrasto con i loro effetti sulle cellule tumorali, su cui spesso questi composti risultano citotossici, almeno a dosi elevate. Tuttavia, una valida spiegazione a questo diverso comportamento si basa sulle diverse caratteristiche delle cellule endoteliali e tumorali, incluse le condizioni di stress cronico delle seconde dovute alla produzione di alti livelli di radicali dell'ossigeno (ROS), ad alterazioni metaboliche ed all'effetto di oncogeni (Ferrari *et al.*, 2010). Uno stress ulteriore nelle cellule tumorali spingerebbe le cellule oltre la soglia di adattamento e indurrebbe i meccanismi di apoptosi, mentre nelle cellule sane potrebbe agire come una sorta di stimolo di "precondizionamento" che renderebbe le cellule endoteliali più resistenti a successivi insulti (Ferrari *et al.*, 2010).

La mancanza di un effetto citotossico del CBD nei confronti delle cellule endoteliali si discosta da quanto osservato in studi precedenti con altri cannabinoidi (Blázquez *et al.*, 2003), in cui la citotossicità esercitata sulle cellule endoteliali è stata considerata un potenziale meccanismo d'azione di queste molecole. L'effetto del CBD che abbiamo osservato sulla

vitalità delle cellule endoteliali sembrerebbe, quindi, dovuto alla modulazione di pathway intracellulari che causano un decremento di diversi fattori proangiogenici.

Il CBD ha mostrato anche una potente inibizione della migrazione delle cellule endoteliali, sia nel saggio di wound healing, sia, con un effetto ancora maggiore, nella camera di Boyden. Questa inibizione è risultata significativa a concentrazioni pari o minori di quelle necessarie per causare il 50% di inibizione della vitalità. Questi dati suggeriscono, quindi, che i fattori che influenzano migrazione ed invasione delle cellule endoteliali potrebbero essere bersagli primari del CBD.

Come già detto a proposito degli effetti antitumorali esercitati dal CBD sulle cellule di glioma umano, anche per il suo ruolo antiangiogenico rimangono da approfondire i meccanismi cellulari alla base degli effetti descritti. Le cellule vascolari endoteliali esprimono vari recettori funzionali per i cannabinoidi, tra cui il recettore CB1 (Liu *et al.*, 2000), il recettore CB2 (Blázquez *et al.*, 2003), il recettore putativo per l'abnormal-cannabidiol (Abn-CBD) (Járai *et al.*, 1999) ed il recettore dei vanilloidi TRPV1 (Golech *et al.*, 2004). Questi recettori controllano importanti funzioni cellulari come la migrazione (Blázquez *et al.*, 2003; Mo *et al.*, 2004), la sopravvivenza (Blázquez *et al.*, 2003) ed il tono vascolare (Wagner *et al.*, 1997; Bátkai *et al.*, 2001). Recentemente il recettore CB1 è stato strettamente correlato all'inibizione dell'angiogenesi (Pisanti *et al.*, 2011). Tuttavia, come detto, è stato dimostrato che il CBD svolge la propria attività antitumorale attraverso un meccanismo indipendente dai recettori (Massi *et al.*, 2004; Vaccani *et al.*, 2005). Sebbene recentemente sia stato scoperto un nuovo recettore vascolare per il CBD (Begg *et al.*, 2005), è possibile che anche la sua attività antiangiogenica possa essere dovuta ad un meccanismo non mediato da recettori, coinvolgendo diversi bersagli cellulari primari.

Un'indagine a livello molecolare ha mostrato che il CBD influenza l'espressione di numerosi fattori essenziali coinvolti nelle funzioni primarie delle cellule endoteliali vascolari, in particolare l'invasione e la migrazione. Questi includono le metalloproteasi di matrice MMP-2 ed MMP-9, l'inibitore tissutale delle metalloproteasi TIMP-1, la SerpinaE1/PAI-1, l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi uPA, CXCL16, l'interleuchina IL-8, l'Endotelina ET-1 ed il fattore di crescita derivato dalle piastrine PDGF-AA.

Le metalloproteasi di matrice (MMP), come già detto, sono proteasi che contribuiscono a numerosi eventi angiogenici distinti rimodellando la matrice extracellulare (ECM) e la membrana basale. Le molecole della matrice extracellulare, i recettori dei fattori di crescita, le molecole di adesione cellulare, i ligandi apoptotici, i fattori angiogenici, le

chemochine e le citochine sono alcuni dei diversi substrati delle MMP (Pisanti *et al.*, 2011; Lorusso *et al.*, 2009). Le molecole chiave nella famiglia delle MMP che partecipano all'angiogenesi tumorale sono MMP-2 e MMP-9: queste stesse proteasi risultano espresse ad alti livelli in numerosi stati maligni, inclusi i gliomi (Cantelmo *et al.*, 2010; Noonan *et al.*, 2011; Pisanti *et al.*, 2011).

Analogamente a quanto osservato nelle cellule di glioma, anche TIMP-1 è downregolato dal trattamento con CBD. Come detto, numerosi studi hanno dimostrato che TIMP-1 promuove la proliferazione attraverso la stimolazione dei pathway di ERK e Akt, e che i suoi alti livelli di espressione correlano con il comportamento clinico aggressivo di un vasto spettro di tumori (Honkavouri *et al.*, 2008; Aaberg-Jessen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011a; 2011b; Oh *et al.*, 2011). Inoltre, i fattori di trascrizione che regolano l'espressione di TIMP-1 sono spesso modulati da molti stimoli extracellulari che modulano anche l'espressione delle MMP (Chirco *et al.*, 2006).

Oltre al sistema MMP/TIMP, l'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi uPA e l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno SerpinaE1/PAI-1 sono fattori importanti nella regolazione della crescita cellulare e della diffusione del tumore. Gli esperimenti da noi condotti hanno dimostrato un decremento dei livelli di uPA, che è noto essere correlato con la malignità dei gliomi primari e con più brevi prospettive di vita dei pazienti. Inoltre, anche la SerpinaE1/PAI-1 viene ridotta in seguito al trattamento con CBD. Sebbene ci si aspetterebbe che bassi livelli di quest'ultima proteina nei tumori favorissero la crescita delle cellule tumorali, alcuni studi clinici hanno indicato che i livelli di espressione della SerpinaE1 sono direttamente correlati con l'aggressività del cancro. Ad oggi questa apparente discrepanza non è stata ancora chiarita e alcuni lavori recenti suggeriscono che la SerpinaE1 possa avere altri ruoli multifunzionali nella regolazione di angiogenesi, invasività e adesione cellulare (Ulisse *et al.*, 2009), che necessitano di ulteriori indagini.

Anche nelle cellule endoteliali, come già nelle U87-MG, il CBD downregola uPA e la SerpinaE1. uPA ed il suo recettore, uPAR, insieme all'inibitore dell'attivatore del plasminogeno SerpinaE1/PAI-1, sono importanti fattori nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella conseguente angiogenesi. L'associazione di uPA con il suo recettore, uPAR, causa un'attività proteolitica inducibile, transiente e localizzata sulla superficie cellulare e richiede l'interazione diretta di uPAR con una varietà di proteine extracellulari e di recettori di membrana (Noonan *et al.*, 2008; D'Alessio e Blasi, 2009). La SerpinaE1, oltre al suo ruolo come inibitore di uPA, si è rivelata avere un comportamento ambivalente nella modulazione dell'apoptosi in cellule tumorali rispetto alle non tumorali (Balsara e Ploplis,



2008). Tuttavia i ruoli multifunzionali di questa proteina nei processi di angiogenesi, invasività e adesione cellulare necessitano di essere ulteriormente analizzati e chiariti (Ulisse *et al.*, 2009).

Il CBD inibisce, inoltre, in maniera significativa due chemochine con motivo C-X-C: CXCL16 e l'interleuchina-8 (IL-8). Le chemochine CXC che contengono il motivo ELR (Glu-Leu-Arg), come CXCL16 e IL-8, sono potenti fattori angiogenici (Albini *et al.*, 2009; Rabquer *et al.*, 2011). CXCL16, inizialmente identificato come una chemochina prodotta dalle cellule dendritiche per attrarre le cellule T negli organi linfoidi, può esibire *in vitro* una potenziale azione angiogenica, dato che la stimolazione delle HUVEC con CXCL16 causa un aumento di proliferazione cellulare, di motilità chemotattica e di formazione di una rete capillare. I suoi effetti sulla proliferazione cellulare e sul differenziamento morfologico sembrano essere mediati dall'attivazione di ERK (Zhuge *et al.*, 2005). IL-8 è in grado di indurre l'angiogenesi sia direttamente, sia attraverso meccanismi indiretti (Benelli *et al.*, 2002; 2003; Lai *et al.*, 2011). Quindi, la diminuzione dei livelli di entrambe queste chemochine da parte del CBD potrebbe contribuire ai suoi effetti antiangiogenici *in vitro* e *in vivo*.

Anche due fattori di crescita sono risultati downregolati dal CBD: ET-1 e PDGF-AA. Le endoteline stimolano la crescita delle cellule endoteliali, delle cellule dei muscoli lisci vascolari, dei fibroblasti e dei periciti e modulano varie fasi della neovascolarizzazione, inclusa la proliferazione, la migrazione, l'invasione delle cellule endoteliali, la produzione di proteasi e la formazione di tubuli. Inoltre, l'elevata espressione di ET-1 e del suo recettore è associata in maniera significativa con la densità di capillari e con l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) in cellule tumorali (Bagnato *et al.*, 2008), e la sua downregolazione correla con la diminuzione di crescita e migrazione delle cellule endoteliali. PDGF-AA è una forma omodimerica della famiglia di PDGF, strutturalmente e funzionalmente correlata a diversi fattori di crescita, incluso VEGF (Fredriksson *et al.*, 2004). È stato dimostrato che PDGF-AA esplica il suo effetto angiogenico legando uno specifico recettore tirosin chinasi, PDGFR- $\alpha$ , espresso dalle cellule endoteliali, e attivando, di conseguenza, numerosi pathway del segnale ben caratterizzati (ad es. Ras-MAPK, PI3K, JNK, PLC- $\gamma$ ) coinvolti in molteplici risposte cellulari. Molte altre molecole di segnalazione sono coinvolte dai PDGFR, inclusi enzimi, adattatori, fattori di trascrizione e integrine, e inducono proliferazione cellulare, migrazione e sopravvivenza (Andrae *et al.*, 2008).

Queste osservazioni suggeriscono un ampio impatto del CBD sulla biologia cellulare dell'endotelio vascolare. Questa modulazione ad ampio spettro di fattori legati all'angiogenesi si riflette in una minore capacità delle cellule endoteliali di formare correttamente nuovi vasi *in vitro* e, in maniera ancora più evidente, in una drastica riduzione dell'angiogenesi nel nostro modello *in vivo*. Nel tumore, l'attività antiangiogenica di un composto può essere mediata dai suoi effetti indiretti sulle cellule tumorali, per esempio inibendo la produzione di fattori proangiogenici da parte delle cellule tumorali stesse. In effetti, come abbiamo dimostrato nella prima parte di questa tesi, il trattamento con CBD su cellule di glioma U87-MG determina una riduzione del livello di VEGF secreto da queste cellule, insieme alla downregolazione di una serie di altri fattori correlati all'angiogenesi. Di conseguenza, i nostri risultati indicano che il CBD potrebbe essere un promettente farmaco antitumorale, dato che il suo effetto può coinvolgere almeno due meccanismi: una diretta azione sulle cellule tumorali (Massi *et al.*, 2004; Vaccani *et al.*, 2005) ed un'azione più o meno diretta sui processi angiogenici, come dimostrato nella presente tesi.

Sulla base dei promettenti dati ottenuti con il CBD, abbiamo voluto, quindi, valutare se anche altre molecole che presentano affinità strutturale con i principali e più studiati derivati cannabici, quali THC e CBD, potessero avere un effetto antitumorale. I nostri studi si sono focalizzati su tre fitocannabinoidi che fino ad oggi sono stati oggetto di studi molto limitati e della cui attività farmacologica si conosce ancora poco: la cannabidivarina (CBDV), la  $\Delta^9$ -tetraidrocannabivarina (THCV) ed il cannabigerolo (CBG). L'ultima parte di questa tesi ha voluto valutare l'effetto di queste molecole sulla vitalità, sulla migrazione e sull'invasività di due linee cellulari di glioma umano U87-MG e T98G. I risultati ottenuti sono stati riassunti in Tab. 1 e Tab. 2, rispettivamente, per ciascuna delle due linee cellulari.

Il test dell'MTT ha evidenziato che tutti e tre i fitocannabinoidi sono in grado di inibire la vitalità cellulare a concentrazioni confrontabili con quelle del CBD. Tuttavia queste molecole sembrano essere meno potenti sulle T98G rispetto a quanto lo siano sulle U87-MG. Questo è in accordo con quanto dimostrato precedentemente da Torres *et al.* (2011): nel loro studio, gli autori hanno mostrato come le cellule T98G siano meno sensibili delle U87-MG ai fitocannabinoidi THC e CBD. Inoltre, in cellule T98G i fitocannabinoidi studiati mostrano delle curve dose-risposta della vitalità più ripide rispetto alle controparti in cellule U87-MG, con range di concentrazioni efficaci più ristretti. Questo potrebbe essere dovuto agli specifici meccanismi molecolari di risposta delle due linee ed alla loro diversa sensibilità.

L'effetto dei diversi fitocannabinoidi sulla vitalità cellulare non risulta in nessun caso inibito in maniera significativa dalla presenza degli antagonisti recettoriali selettivi AM251, AM630 e capsazepina: questo suggerisce che gli effetti osservati non siano mediati dai recettori cannabici CB1 e CB2, né dal recettore vanilloide TRPV1. Come nel caso del CBD, resta da verificare se queste molecole coinvolgano altri recettori o se i loro effetti dipendano dalla modulazione di altre molecole di segnalazione con meccanismi non recettore-mediati.

Dato che, come detto, i gliomi sono caratterizzati da una straordinaria capacità migratoria e invasiva delle cellule tumorali, abbiamo voluto valutare l'effetto dei tre fitocannabinoidi su questi due aspetti.

Dai risultati ottenuti attraverso la camera di Boyden in assenza e in presenza di matrigel è stato possibile osservare che la CBDV è il fitocannabinoide che sembra inibire in maniera più efficace non solo la capacità delle cellule tumorali di migrare, ma anche la loro capacità invasiva, già alle concentrazioni più basse utilizzate, ben inferiori all'IC<sub>50</sub> determinato tramite il test di MTT.

L'efficacia della CBDV sulle cellule U87-MG è comparabile a quella del THCV, che in questa linea downregola significativamente migrazione ed invasività cellulare a concentrazioni subefficaci per la vitalità. Diversamente, sebbene l'effetto di questo secondo fitocannabinoide sulla capacità migratoria delle T98G sia ancora paragonabile a quello della CBDV, l'invasività di queste cellule in seguito a trattamento con THCV mostra una distribuzione a campana. Questo andamento non è inconsueto in composti di interesse farmacologico e può essere ascrivibile alla sensibilità specifica di queste cellule nel test utilizzato.

Per quanto riguarda il CBG, questo composto non dimostra un significativo effetto su migrazione ed invasività di nessuna delle linee cellulari considerate, se non a concentrazioni che hanno di per sé un effetto sulla vitalità.

Nel complesso, il più promettente tra i fitocannabinoidi considerati appare la CBDV. Infatti, sebbene la sua potenza nell'inibire la vitalità di entrambe le linee cellulari sia minore di quella mostrata dagli altri fitocannabinoidi, l'effetto dose-dipendente permette di modulare finemente il suo impiego nel range di concentrazioni efficaci.

Inoltre, dai risultati ottenuti attraverso la camera di Boyden è stato possibile osservare che la CBDV inibisce la capacità migratoria ed invasiva delle cellule tumorali a

concentrazioni ben inferiori all'IC<sub>50</sub> determinato tramite il test di vitalità e in maniera più efficace degli altri fitocannabinoidi studiati. Questo esclude che gli effetti osservati possano essere dovuti ad una ridotta vitalità delle cellule stesse e indica che questo fitocannabinoide è potenzialmente in grado di ostacolare la crescita tumorale modulandone diversi aspetti.

Al contrario, dai nostri studi risulta che il fitocannabinoide meno attraente per un potenziale impiego terapeutico è il CBG. Infatti questa molecola, pur avendo un maggiore effetto sulla vitalità cellulare, con un IC<sub>50</sub> più simile a quello del CBD, non ha un effetto apprezzabile su migrazione e invasività delle cellule di glioma.

I dati riportati in quest'ultima parte della presente tesi contribuiscono, quindi, a chiarire la farmacologia della CBDV, del THCV e del CBG, sebbene siano necessarie ulteriori indagini per meglio comprendere i meccanismi cellulari alla base degli effetti di queste molecole.

	<b>CBDV</b>	<b>THCV</b>	<b>CBG</b>
<b>MTT IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>concentrazione- dipendente</b> 17.79	<b>concentrazione- dipendente</b> 13.82	<b>concentrazione- dipendente</b> 10.95
<b>CB1/CB2/CPZ antagonismo</b>	<b>NO</b>	<b>NO</b>	<b>NO</b>
<b>Migrazione</b>	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 45%	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 50%	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 25% a 10 μM
<b>Invasione</b>	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 40-70%	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 50%	<b>NO</b>

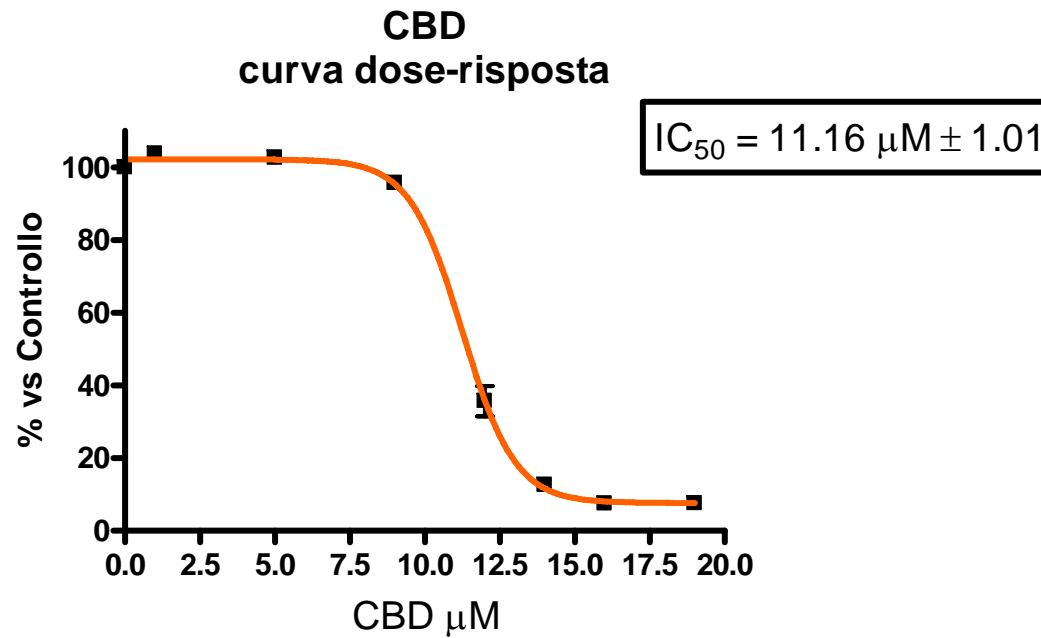
**Tab. 1.** Effetto di CBDV, THCV e CBG su vitalità, capacità migratoria ed invasiva di cellule di glioma umano U87-MG

	<b>CBDV</b>	<b>THCV</b>	<b>CBG</b>
<b>MTT IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>concentrazione- dipendente</b> 18.12	<b>tutto-o-nulla</b>	<b>tutto-o-nulla</b>
<b>CB1/CB2 antagonismo</b>	<b>NO</b>	<b>NO</b>	<b>NO</b>
<b>Migrazione</b>	<b>concentrazione- dipendente (40-80%)</b> IC <sub>50</sub> 3.82	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 25-50%	<b>A campana</b> 20% a 0.25 μM 40% a 10 μM
<b>Invasione</b>	<b>NON concentrazione- dipendente</b> 75%	<b>A campana</b> 60% a 0.25 μM 70% a 10 μM	<b>concentrazione- dipendente</b> 20% a 5 μM 30% a 10 μM

**Tab. 2.** Effetto di CBDV, THCV e CBG su vitalità, capacità migratoria ed invasiva di cellule di glioma umano T98G

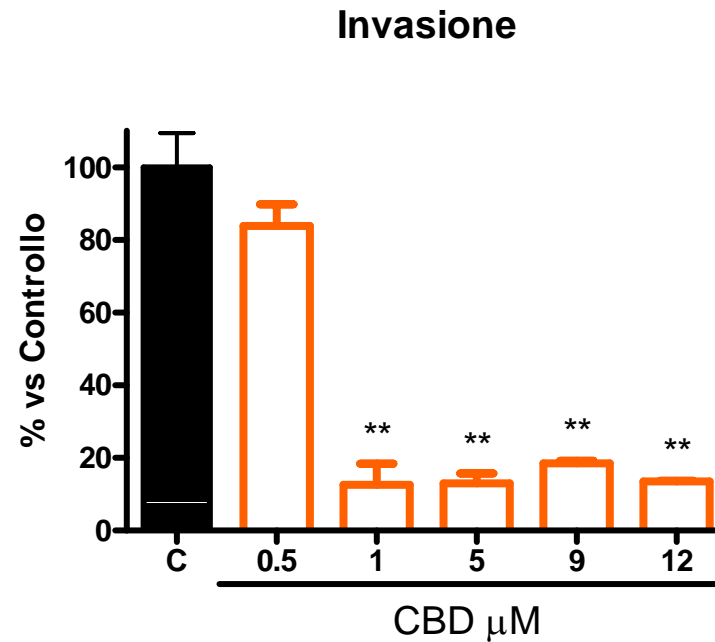
## **7. FIGURE**

**Fig. 1**  
**EFFETTO DEL CBD SULLA VITALITÀ DI**  
**CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**



**Fig. 1.** Curva dose-risposta dell'effetto del CBD sulla vitalità di cellule di glioma umano U87-MG. Le cellule sono cresciute in medium a bassa percentuale di siero con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h a 37°C. La vitalità cellulare è stata determinata con saggio MTT ed è stata espressa come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti

**Fig. 2**  
**EFFETTO DEL CBD SULLA CAPACITÀ INVASIVA**  
**DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG**

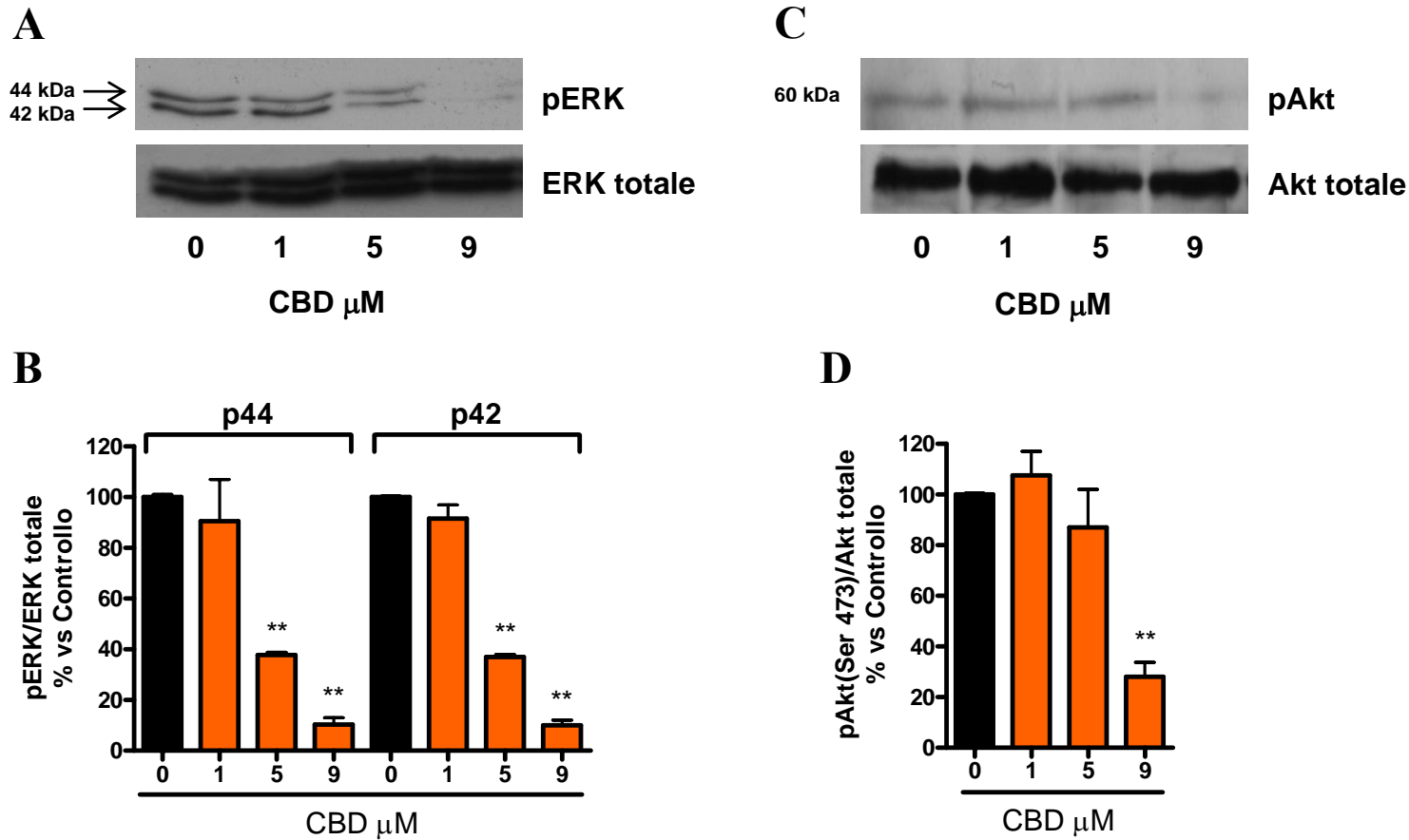


**Fig. 2.** Effetto del CBD sull'invasività di cellule di glioma umano U87-MG. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBD, seminate su di un filtro ricoperto di matrigel e incubate per 22 h a 37°C. Le cellule che sono migrate fino alla superficie inferiore del filtro sono state quantificate. L'invasione è stata espressa come la percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]



### Fig. 3

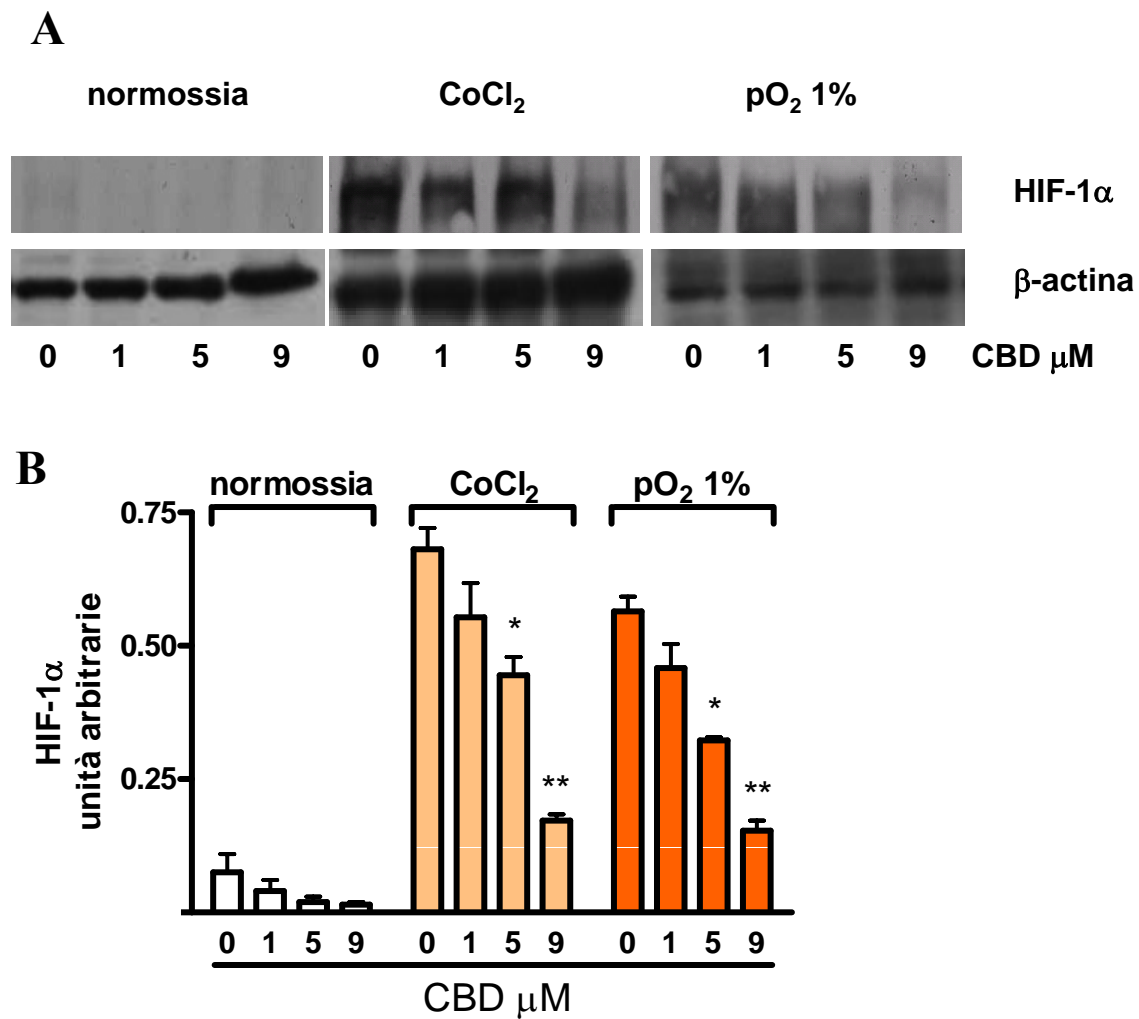
## IDENTIFICAZIONE DI PATHWAY DEL SEGNALE MODULATI DA CBD IN CELLULE U87-MG



**Fig. 3.** Effetto del CBD sull'attivazione di ERK ed Akt in cellule di glioma U87-MG. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h e i lisati cellulari sono stati utilizzati per determinare i livelli proteici di ERK ed Akt. **(A)** Immagini rappresentative di western blot di ERK fosforilata e totale. **(B)** Analisi densitometrica del segnale di ERK. I livelli di espressione sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. **(C)** Immagini rappresentative di western blot di Akt fosforilata e totale. **(D)** Analisi densitometrica del segnale di Akt. I livelli di espressione sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [0]

## Fig. 4

### EFFETTO DEL CBD SULL'ESPRESSIONE DI HIF-1 $\alpha$ IN CELLULE U87-MG

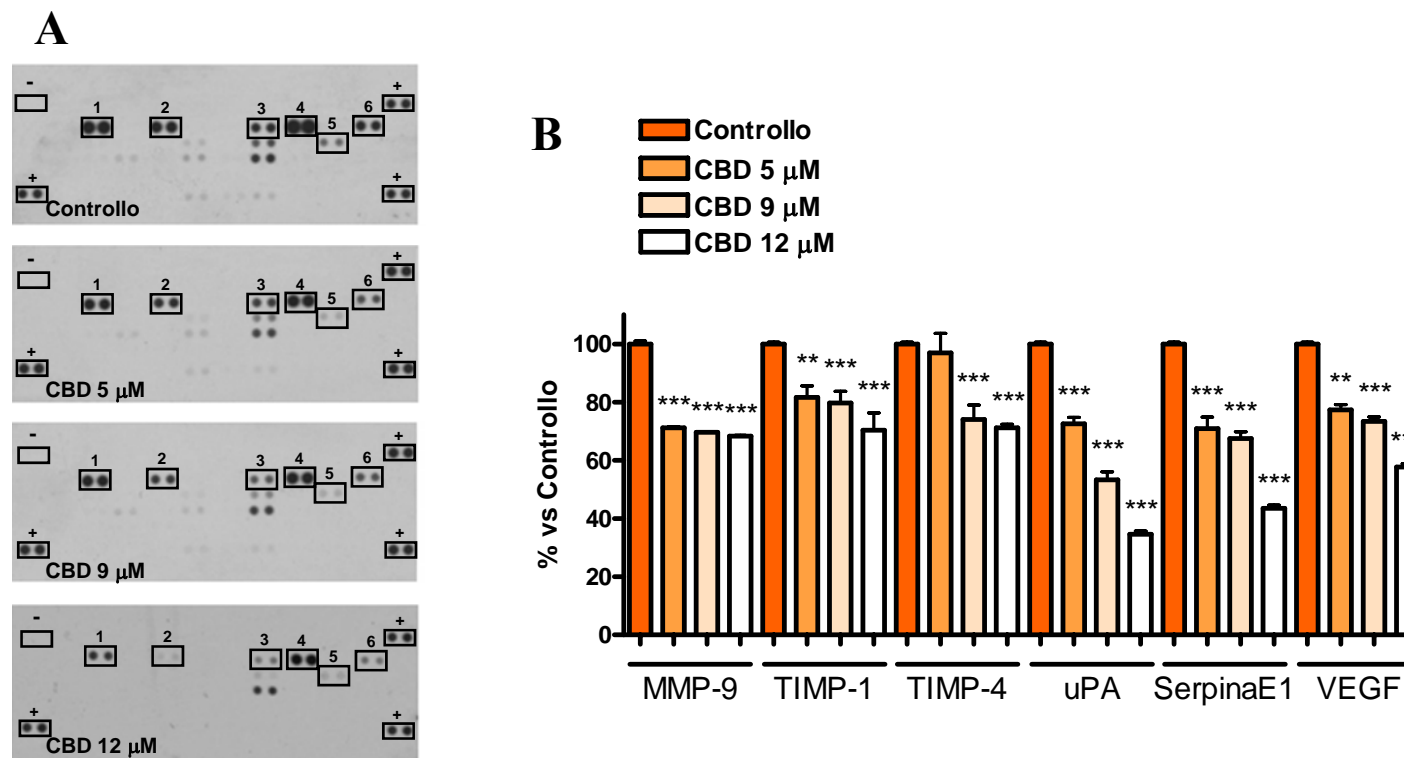


**Fig. 4.** Effetto del CBD sul livello di HIF-1 $\alpha$  in cellule di glioma U87-MG cresciute in condizioni di normossia e di ipossia. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h ed i lisati cellulari sono stati utilizzati per determinare i livelli proteici di HIF-1 $\alpha$ . **(A)** Immagini rappresentative di western blot di HIF-1 $\alpha$  e  $\beta$ -actina.

**(B)** Analisi densitometrica del segnale di HIF-1 $\alpha$ . I livelli di espressione sono riportati come unità arbitrarie. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [0]

## Fig. 5

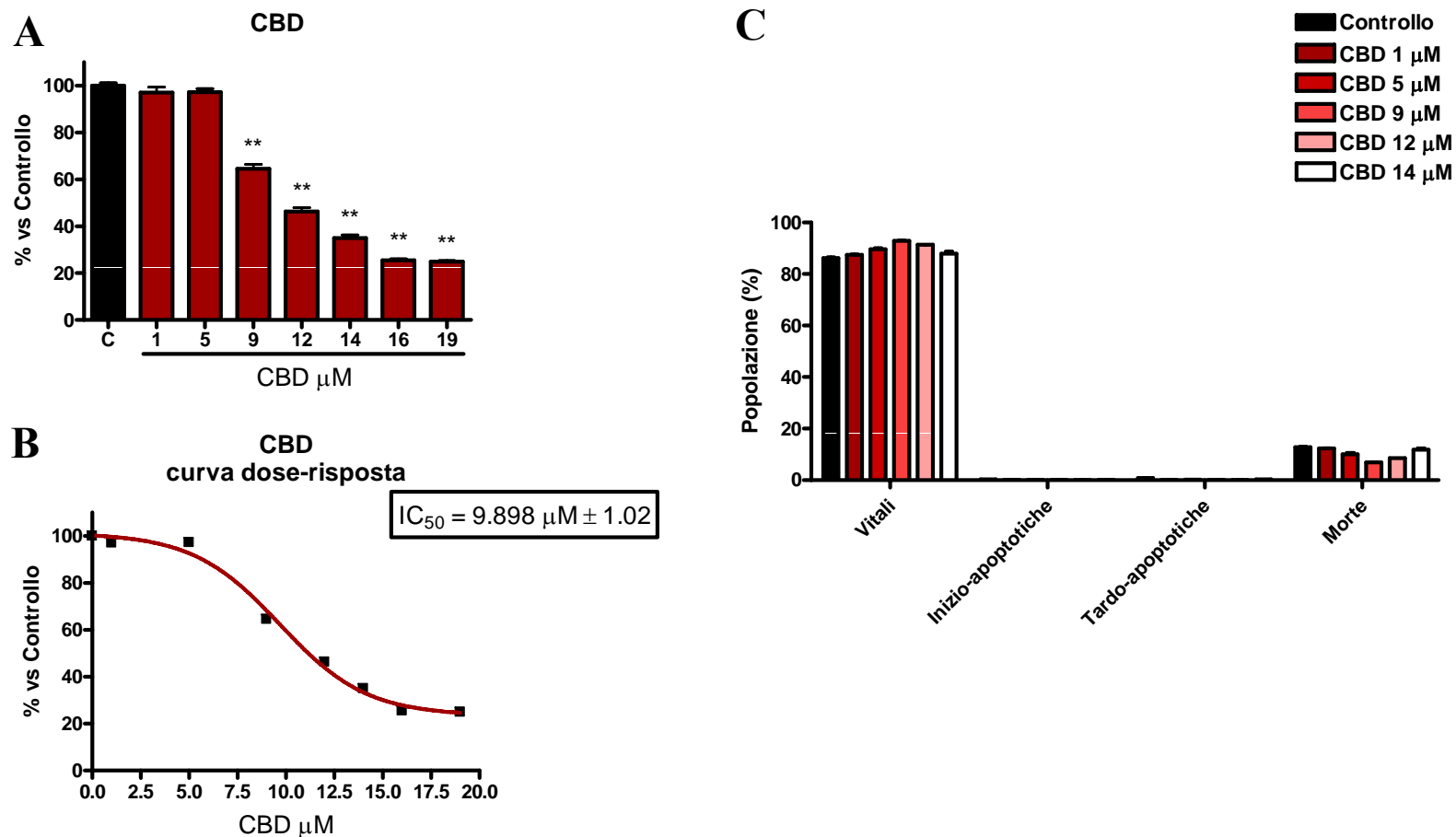
# EFFETTO DEL CBD SUL PROFILO DI ESPRESSIONE DI PROTEINE COINVOLTE NELLA PROGRESSIONE TUMORALE IN CELLULE U87-MG



**Fig. 5.** Effetto del CBD sul profilo di espressione di proteine coinvolte nella progressione tumorale in cellule di glioma U87-MG. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h e i surnatanti sono stati utilizzati per determinare i diversi livelli di proteine attraverso uno human antibody array kit. **(A)** Immagini rappresentative delle membrane con l'indicazione delle proteine analizzate. -: controllo negativo; +: controllo positivo; 1: VEGF; 2: uPA; 3: TIMP-4; 4: TIMP-1, 5: MMP-9; 6: SerpinaE1. **(B)** Analisi densitometrica dei segnali presenti sulle membrane. I livelli di espressione sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs Controllo

## Fig. 6

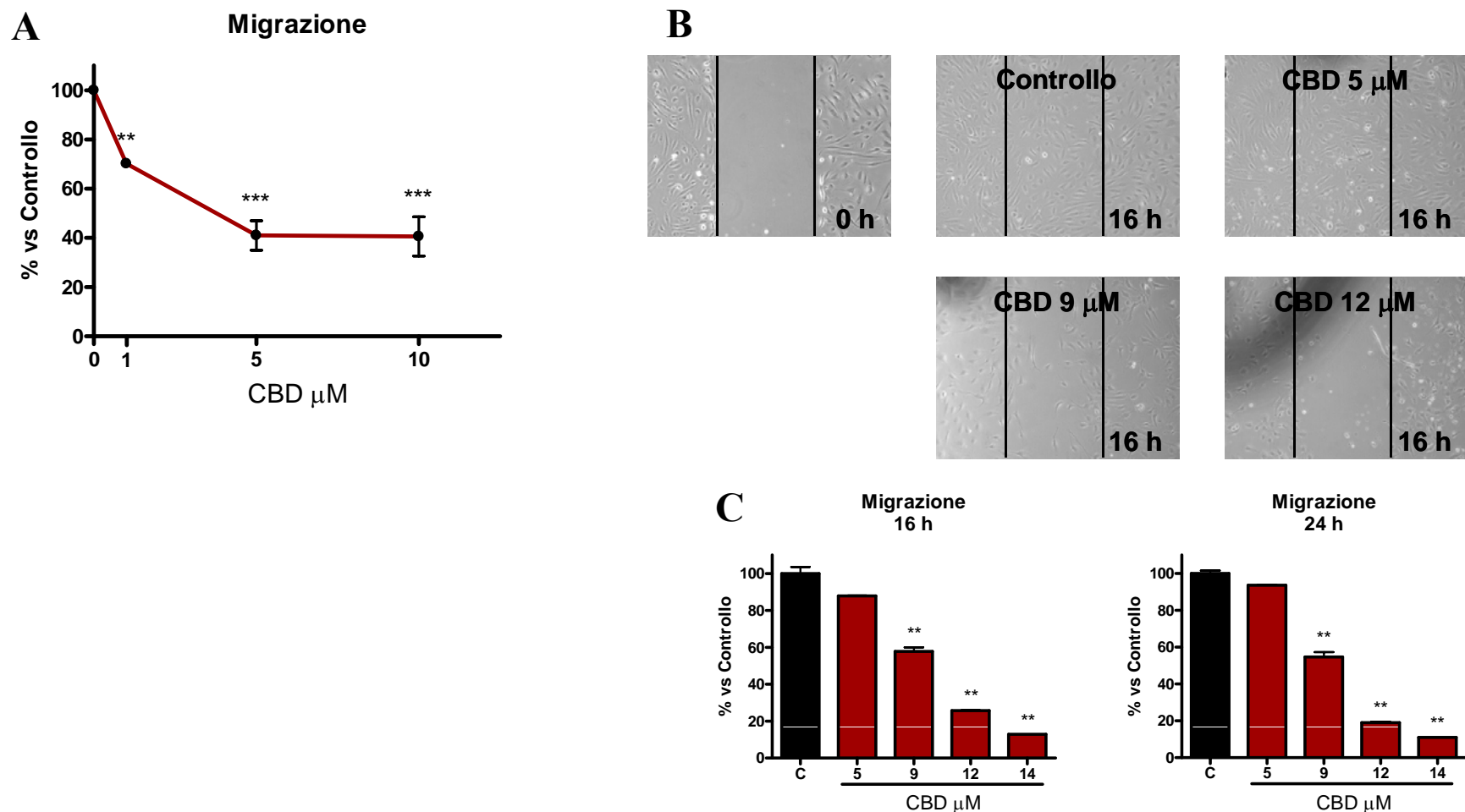
### EFFETTO DEL CBD SULLA VITALITÀ DI CELLULE ENDOTELIALI HUVEC



**Fig. 6.** (A) Effetto del CBD sulla vitalità di cellule endoteliali HUVEC. Le cellule sono cresciute in terreno completo al 2% di FBS con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h a 37°C. La vitalità cellulare è stata determinata con saggio MTT ed è stata espressa come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C] (B) Curva dose-risposta dell'effetto del CBD sulla vitalità delle cellule endoteliali HUVEC. (C) Le cellule sono cresciute in terreno completo al 2% di FBS con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h a 37°C. Le cellule sono state, poi raccolte, marcate sia con Annessina V sia con 7-ammino-actinomicina D, analizzate e quantificate tramite citometria di flusso. L'esperimento è stato ripetuto due volte ed ogni condizione è stata condotta in duplicato

## Fig. 7

### EFFETTO DEL CBD SULLA MIGRAZIONE DI CELLULE HUVE

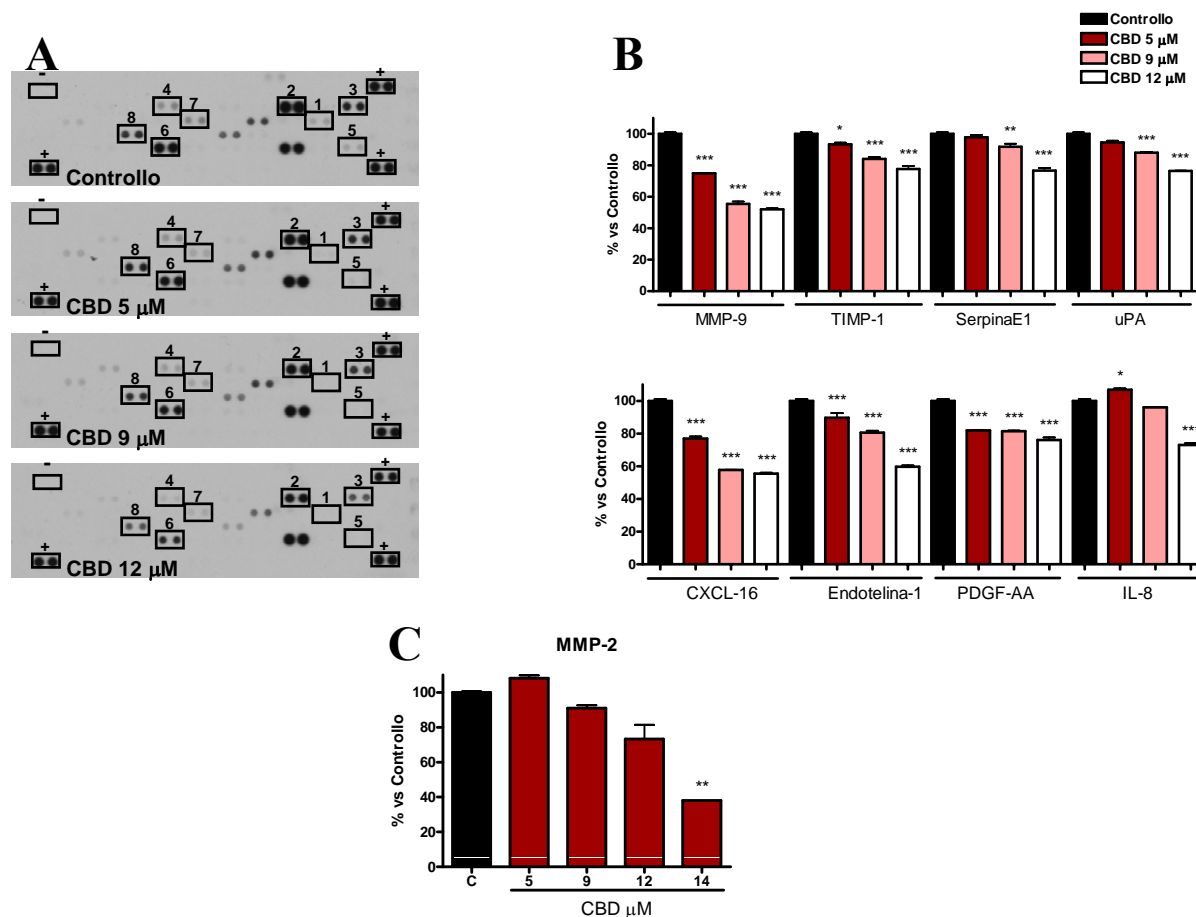


**Fig. 7.** Effetto del CBD sulla migrazione di cellule endoteliali HUVEC. **(A)** Test della camera di Boyden. Le cellule sono state pretrattate per 1 h con concentrazioni crescenti di CBD in terreno completo al 2% di FBS e gli esperimenti di chemiotassi sono stati poi condotti come descritto, usando terreno completo con FBS 10% come chemoattraente.

I risultati sono espressi come percentuale della massima migrazione indotta da FBS in assenza di CBD. Ogni condizione è stata valutata in doppio e i dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs Controllo. **(B)** Immagini rappresentative dello scratch wound healing assay dopo 16 h di trattamento. **(C)** Quantificazione delle cellule migrate nel solco dopo 16 h e 24 h di trattamento. I risultati sono espressi come percentuale rispetto alla massima migrazione del controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

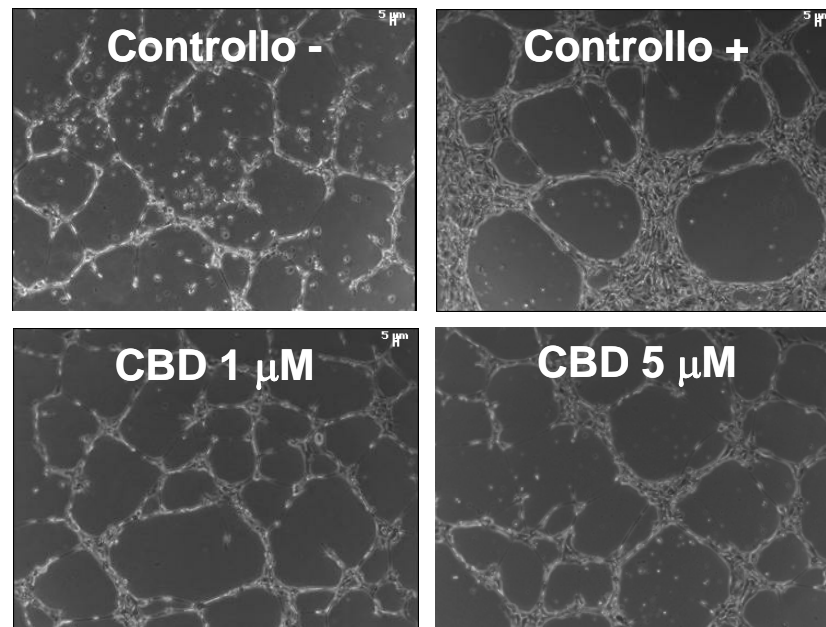
## Fig. 8

# EFFETTO DEL CBD SUL PROFILO DI ESPRESSIONE DI PROTEINE CORRELATE ALL'ANGIOGENESI IN CELLULE HUVE



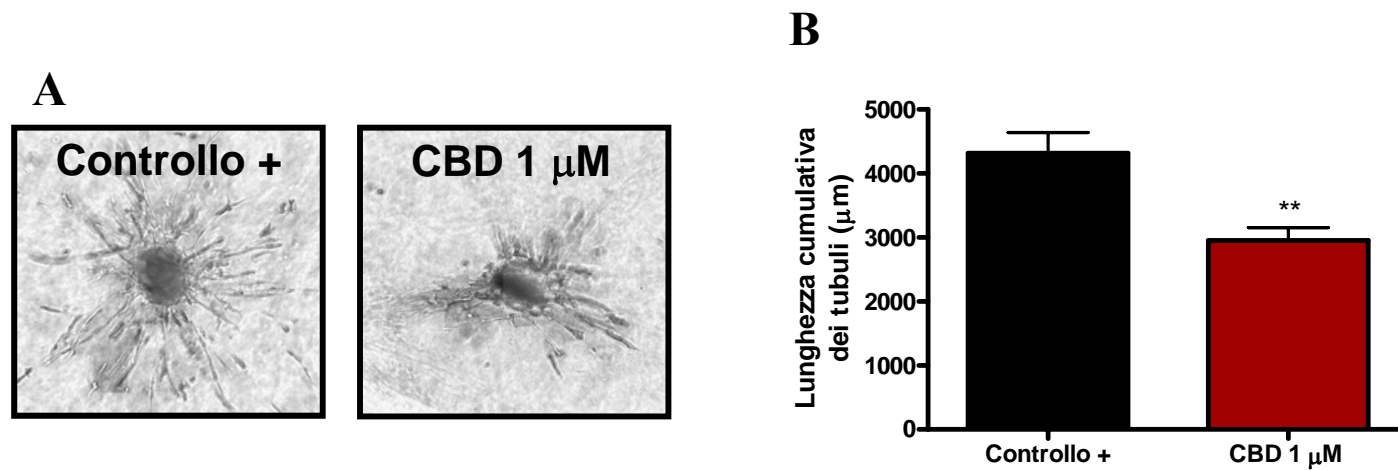
**Fig. 8** Effetto del CBD sul profilo di espressione di proteine coinvolte nell'angiogenesi in cellule endoteliali HUVEC. **(A)** Human antibody array kit. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h ed i surnatanti sono stati utilizzati per determinare i diversi livelli di proteine attraverso uno human antibody array kit. Sono mostrate immagini rappresentative delle membrane con l'indicazione delle proteine analizzate. -: controllo negativo; +: controllo positivo; 1: MMP-9; 2: TIMP-1; 3: SerpinaE1; 4: uPA; 5: CXCL16; 6: Endotelina-1; 7: PDGF-AA; 8: IL-8. **(B)** Analisi densitometrica dei segnali presenti sulle membrane. I livelli di espressione sono riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  vs Controllo. **(C)** Saggio ELISA. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di CBD per 24 h ed i surnatanti sono stati usati per determinare il livello di MMP-2 tramite ELISA. È mostrata la quantificazione dei livelli proteici nelle diverse condizioni sperimentali, riportati come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

**Fig. 9**  
**EFFETTO DEL CBD SULLA MORFOGENESI**  
**ENDOTELIALE *IN VITRO***



**Fig. 9.** Effetto del CBD sulla morfogenesi endoteliale *in vitro*. Le cellule sono cresciute su un substrato di matrigel in presenza del terreno da solo (Controllo -) o di terreno completo con 2% di FBS (Controllo +), in assenza o in presenza di diverse concentrazioni di CBD per 6 h a 37°C. Sono mostrate immagini rappresentative

**Fig. 10**  
**EFFETTO DEL CBD SULLA FORMAZIONE DI STRUTTURE  
SIMILI A CAPILLARI A PARTIRE DA SFEROIDI DI CELLULE HUVE**

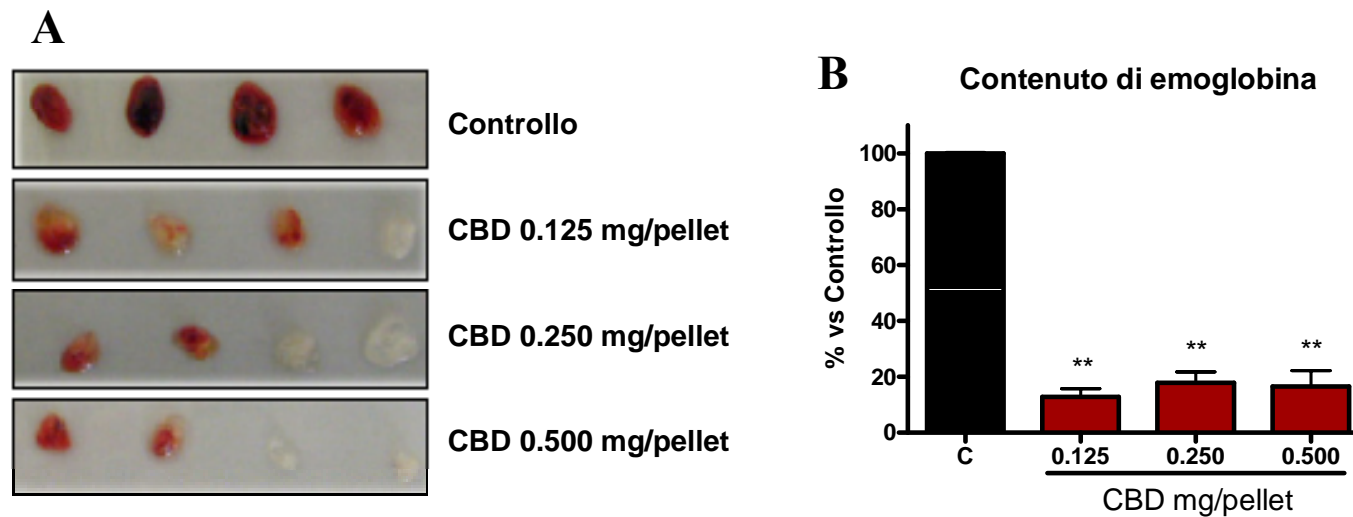


**Fig. 10.** Effetto del CBD sull'angiogenesi *in vitro* a partire da sferoidi. **(A)** Gli sferoidi di HUVEC standardizzati sono stati seminati in gel di collagene supplementato con VEGF (30 ng/ml) in assenza (Controllo +) e in presenza di CBD (1 μM) per 48 h. Sono mostrate immagini rappresentative dei gruppi sperimentali. **(B)** Quantificazione dell'accrescimento. I risultati sono espressi come la media ± S.E.M. della lunghezza cumulativa (μm) delle estroflessioni delle strutture capillari che emergono da 24-26 sferoidi individuali di ogni gruppo sperimentale. \*\* p<0.01 vs Controllo +



# Fig. 11

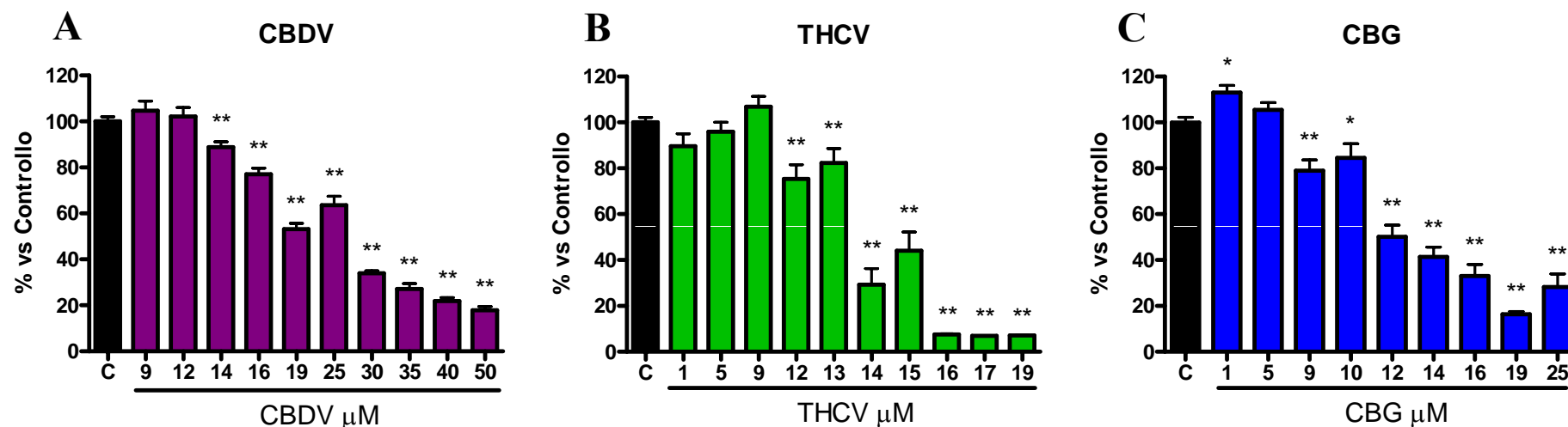
## EFFETTO DEL CBD SULL'ANGIOGENESI *IN VIVO*



**Fig. 11.** Effetto del CBD sull'angiogenesi *in vivo*. **(A)** Le spugne di matrigel contenenti fattori angiogenici (VEGF, TNF- $\alpha$  ed eparina) in presenza di dosi crescenti di CBD iniettate sottocute in topi C57/Black sono state recuperate dopo quattro giorni dall'inoculo e fotografate. Sono presentate immagini rappresentative. **(B)** La quantificazione del contenuto di emoglobina dei pellet è stata determinata tramite reazione con la soluzione di Drabkin e lettura allo spettrofotometro ed è stata espressa come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di due esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

## Fig. 12

### EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG

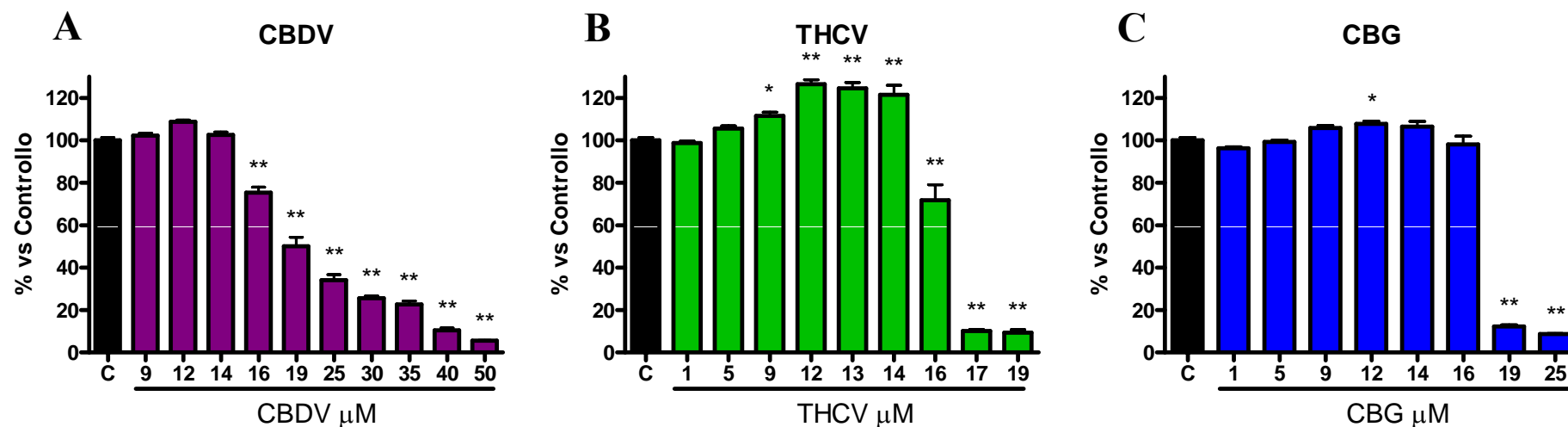


**Fig. 12.** (A) Saggio MTT: valutazione dell'effetto della CBDV sulla vitalità delle cellule di glioma umano U87-MG trattate con concentrazioni crescenti di farmaco per 24 h a 37°C. (B) Saggio MTT: valutazione dell'effetto del THCV sulla vitalità delle cellule di glioma umano U87-MG trattate con concentrazioni crescenti di farmaco per 24 h a 37°C. (C) Saggio MTT: valutazione dell'effetto del CBG sulla vitalità delle cellule di glioma umano U87-MG trattate con concentrazioni crescenti di farmaco per 24 h a 37°C. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

## Fig. 13

### EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA VITALITÀ DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G

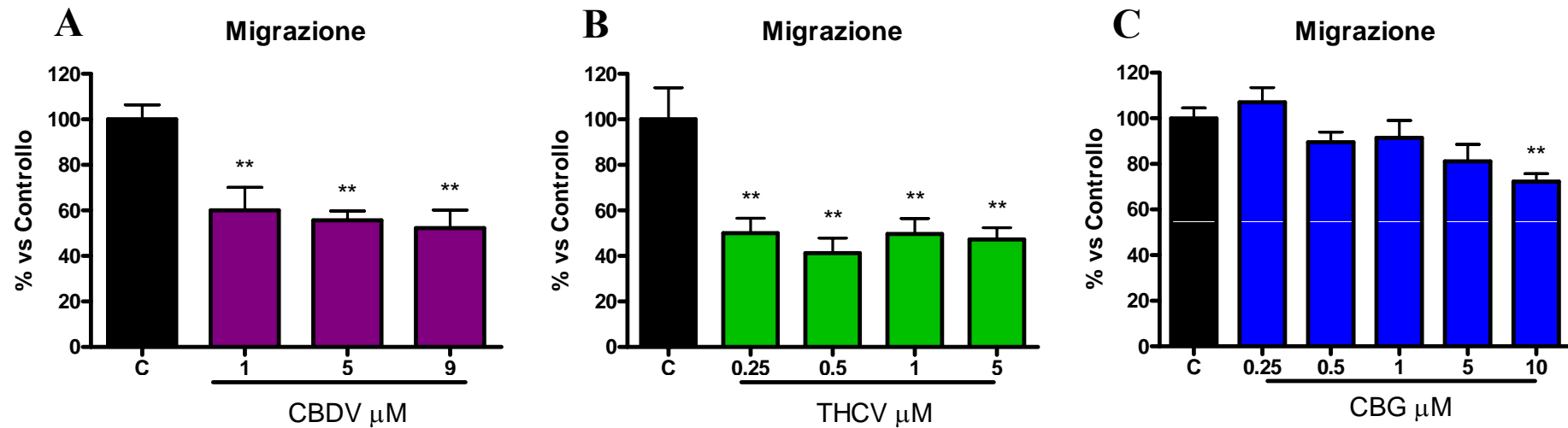


**Fig. 13.** (A) Saggio MTT: valutazione dell'effetto della CBDV sulla vitalità delle cellule di glioma umano T98G trattate con concentrazioni crescenti di farmaco per 24 h a 37°C. (B) Saggio MTT: valutazione dell'effetto del THCV sulla vitalità delle cellule di glioma umano T98G trattate con concentrazioni crescenti di farmaco per 24 h a 37°C. (C) Saggio MTT: valutazione dell'effetto del CBG sulla vitalità delle cellule di glioma umano T98G trattate con concentrazioni crescenti di farmaco per 24 h a 37°C. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

# Fig. 14

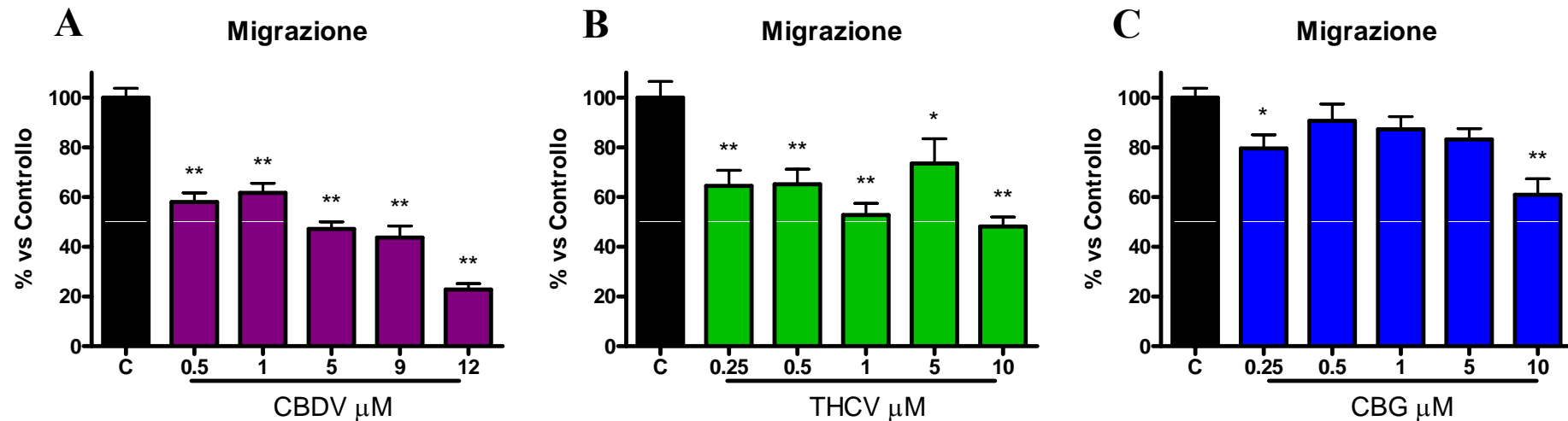
## EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG



**Fig. 14.** Effetto (A) della CBDV, (B) del THCV, (C) del CBG sulla migrazione di cellule di glioma umano. Le cellule U87-MG sono state trattate con concentrazioni crescenti di ciascun fitocannabinoide, seminate su di un filtro di PET e incubate per 22 h a 37°C. Le cellule che sono migrate fino alla superficie inferiore del filtro sono state quantificate. La migrazione è stata espressa come la percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

# Fig. 15

## EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ MIGRATORIA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G



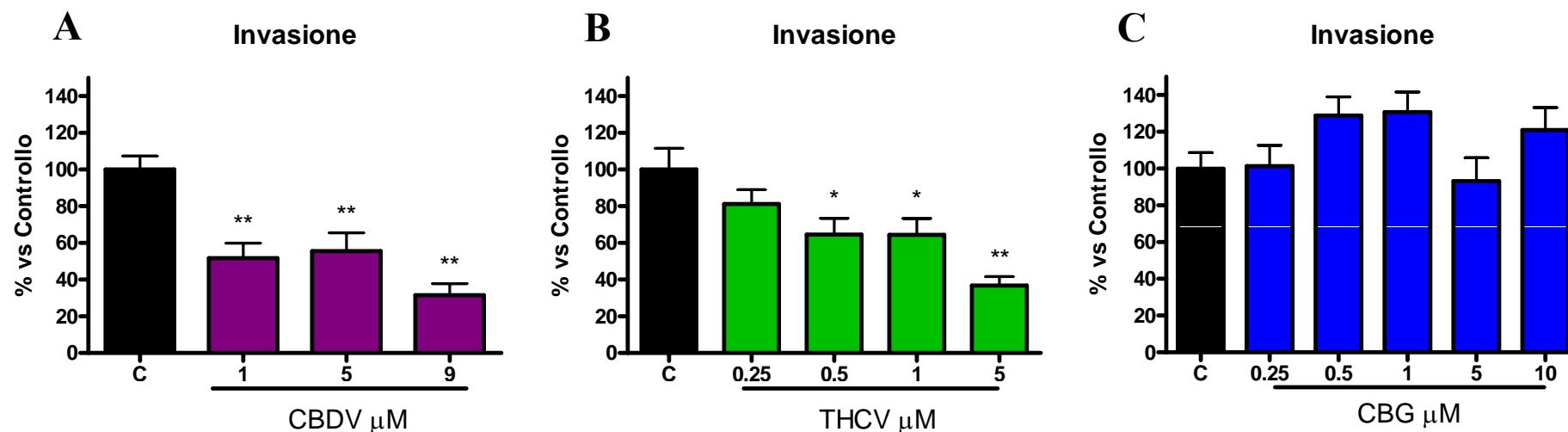
**Fig. 15.** Effetto (A) della CBDV, (B) del THCV, (C) del CBG sulla migrazione di cellule di glioma umano. Le cellule T98G sono state trattate con concentrazioni crescenti di ciascun fitocannabinoide, seminate su di un filtro di PET e incubate per 22 h a 37°C. Le cellule che sono migrate fino alla superficie inferiore del filtro sono state quantificate.

La migrazione è stata espressa come la percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

## Fig. 16

### EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO U87-MG

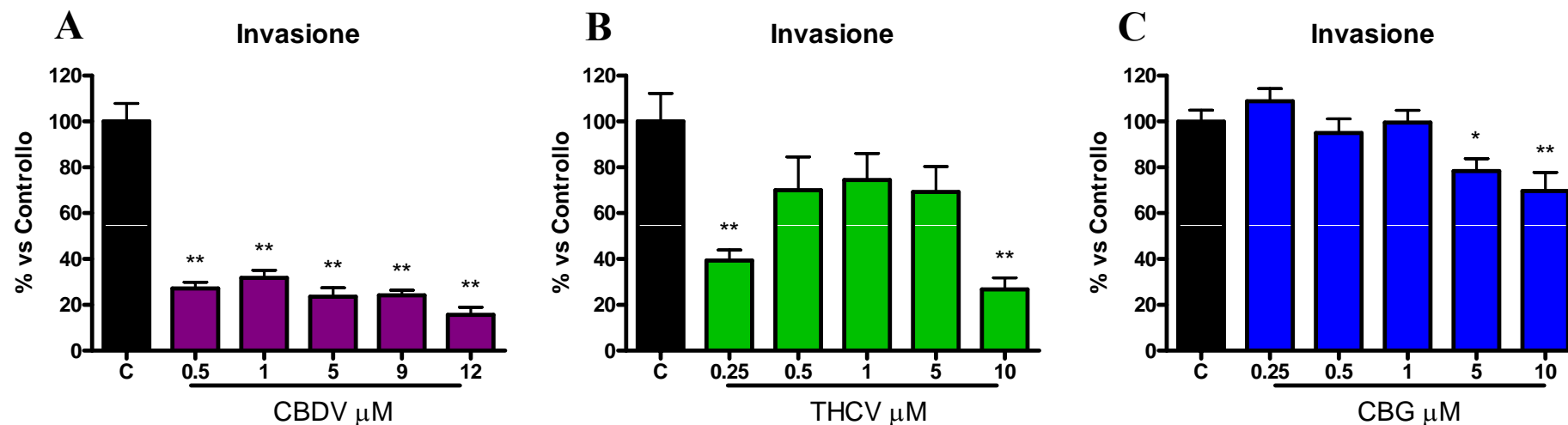


**Fig. 16.** Effetto (A) della CBDV, (B) del THCV, (C) del CBG sull'invasività di cellule di glioma umano. Le cellule U87-MG sono state trattate con concentrazioni crescenti di ciascun fitocannabinoide, seminate su di un filtro ricoperto di matrigel e incubate per 22 h a 37°C. Le cellule che sono migrate fino alla superficie inferiore del filtro sono state quantificate. L'invasione è stata espressa come la percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

# Fig. 17

## EFFETTO DI CBDV, THCV E CBG SULLA CAPACITÀ INVASIVA DI CELLULE DI GLIOMA UMANO T98G

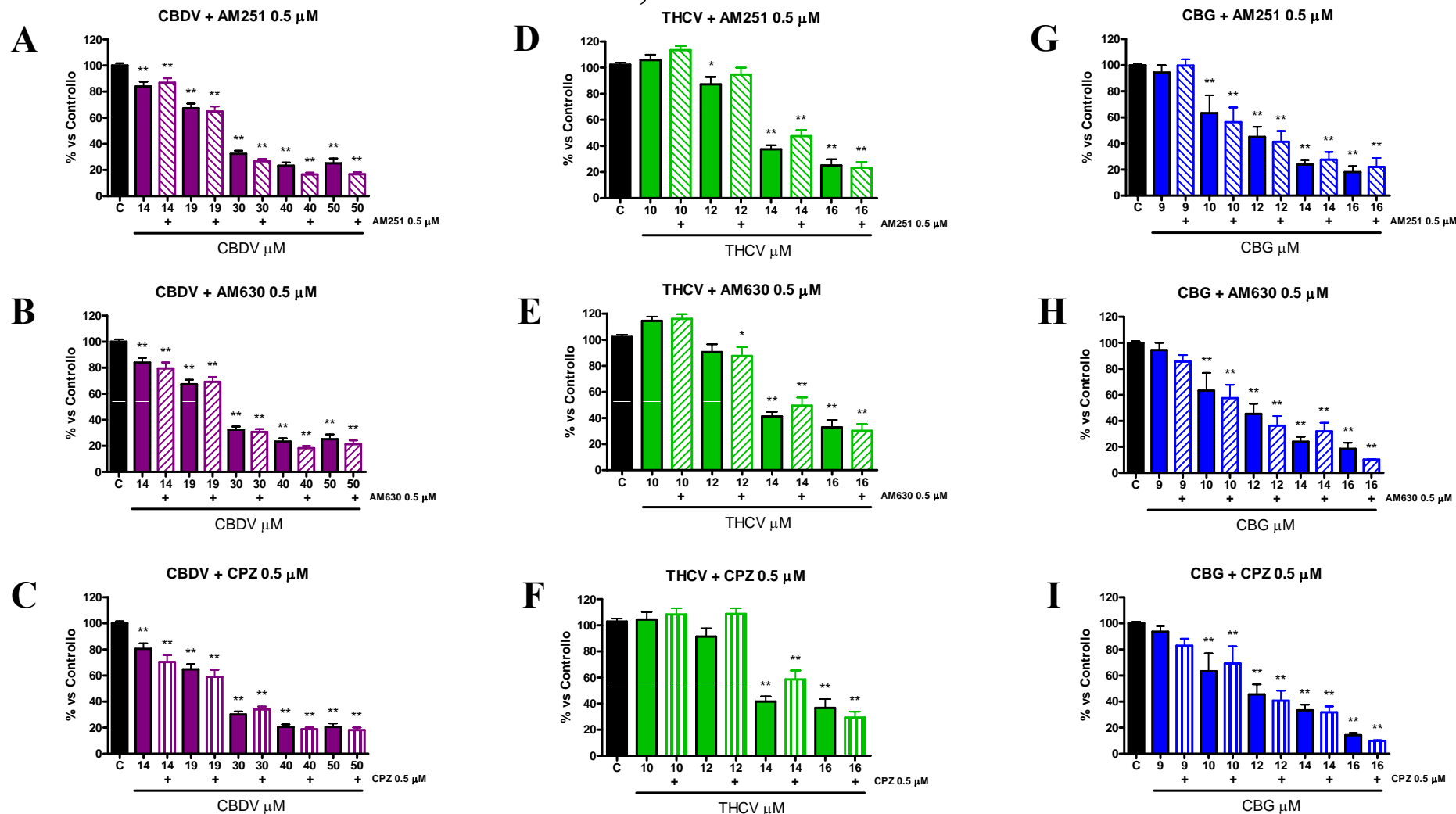


**Fig. 17.** Effetto (A) della CBDV, (B) del THCV, (C) del CBG sull'invasività di cellule di glioma umano. Le cellule T98G sono state trattate con concentrazioni crescenti di ciascun fitocannabinoide, seminate su di un filtro ricoperto di matrigel e incubate per 22 h a 37°C. Le cellule che sono migrate fino alla superficie inferiore del filtro sono state quantificate. L'invasione è stata espressa come la percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]

# Fig. 18

## IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI COINVOLTI NEGLI EFFETTI DI CBDV, THCV E CBG SU CELLULE U87-MG



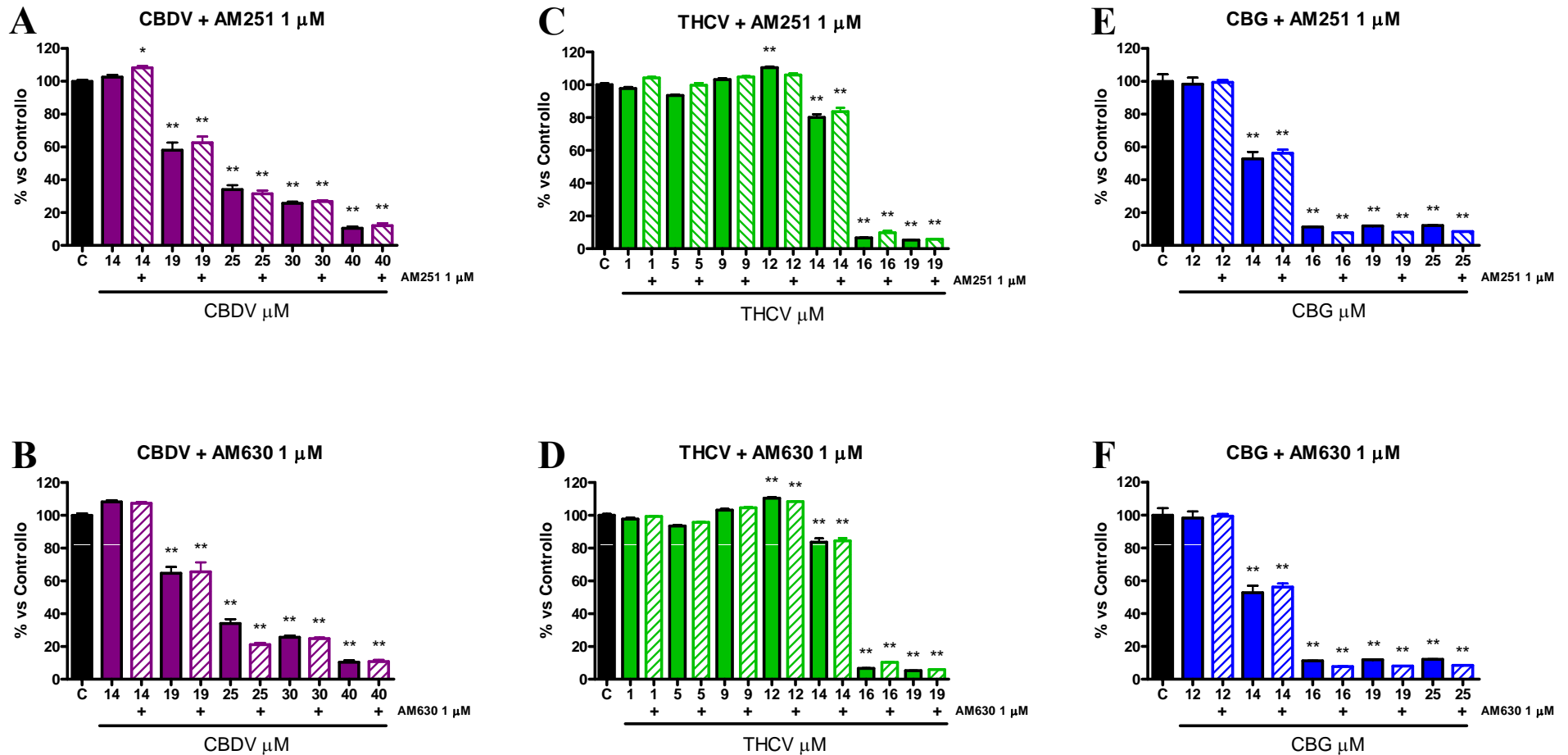
**Fig. 18.** Saggio MTT. Valutazione dell'effetto di CBDV, THCV e CBG sulla vitalità delle cellule di glioma umano U87-MG trattate con concentrazioni crescenti di ciascun farmaco per 24 h a 37°C in presenza di (A, D, G) AM251, antagonista del recettore CB1, (B, E, H) AM630, antagonista del recettore CB2, e (C, F, I) CPZ, antagonista del recettore TRPV1. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media  $\pm$  S.E.M. di tre esperimenti indipendenti.

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  vs Controllo [C]



# Fig. 19

## IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI COINVOLTI NEGLI EFFETTI DI CBDV, THCV E CBG SU CELLULE T98G



**Fig. 19.** Saggio MTT. Valutazione dell'effetto di CBDV, THCV e CBG sulla vitalità delle cellule di glioma umano T98G trattate con concentrazioni crescenti di ciascun farmaco per 24 h a 37°C in presenza di (A, C, E) AM251, antagonista del recettore CB1, e (B, D, F) AM630, antagonista del recettore CB2. I risultati sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo non trattato. I dati rappresentano la media ± S.E.M. di tre esperimenti indipendenti. \* p<0.05; \*\* p<0.01 vs Controllo [C]

**Tab. 20**  
**IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI COINVOLTI**  
**NEGLI EFFETTI DI CBDV, THCV E CBG SU CELLULE U87-MG**

	CBDV	THCV	CBG
Antagonismo CB1	NO	NO	NO
Antagonismo CB2	NO	NO	NO
Antagonismo TRPV1	NO	NO	NO

**Tab. 21**  
**IDENTIFICAZIONE DEI RECETTORI COINVOLTI**  
**NEGLI EFFETTI DI CBDV, THCV E CBG SU CELLULE T98G**

	CBDV	THCV	CBG
Antagonismo CB1	NO	NO	NO
Antagonismo CB2	NO	NO	NO

## **8. BIBLIOGRAFIA**

- Aaberg-Jessen C, Christensen K, Offenberg H, Bartels A, Dreehsen T, Hansen S, Schröder HD, Brünner N, Kristensen BW (2009). Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *J Neurooncol* 95: 117-128.
- Albini A, Fontanini G, Masiello L, Tacchetti C, Bigini D, Luzzi P, Noonan DM, Stetler-Stevenson WG (1994). Angiogenic potential in vivo by Kaposi's sarcoma cell-free supernatants and HIV-1 tat product: inhibition of KS-like lesions by tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *AIDS* 8: 1237-1244.
- Albini A, Brigati C, Ventura A, Lorusso G, Pinter M, Morini M, Mancino A, Sica A, Noonan DM (2009). Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target. *J Transl Med* 14: 7-5.
- Alozie SO, Martin BR, Harris LS, Dewey WL (1980). 3H-delta 9-Tetrahydrocannabinol, 3H-cannabinol and 3H-cannabidiol: penetration and regional distribution in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 12: 217-221.
- Andradas C, Caffarel MM, Pérez-Gómez E, Salazar M, Lorente M, Velasco G, Guzmán M, Sánchez C (2011). The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene* 30: 245-252.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 22: 1276-1312.
- Baek SH, Kim YO, Kwag JS, Choi KE, Jung WY, Han DS (1998). Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Arch Pharm Res* 21: 353-356.
- Bagnato A, Spinella F, Rosanò L (2008). The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 86: 473-484.
- Balsara RD, Ploplis VA (2008). Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thromb Haemost* 100: 1029-1036.
- Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, Urbaschek R, Garcia N Jr, Sanyal AJ, Kunos G (2001). Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 7: 827-832.

- Begg M, Pacher P, Bátkai S, Osei-Hyiaman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G (2005). Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 106: 133-145.
- Benelli R, Morini M, Carrozzino F, Ferrari N, Minghelli S, Santi L, Cassatella M, Noonan DM, Albini A (2002). Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J* 16: 267-269.
- Benelli R, Albini A, Noonan D (2003). Neutrophils and angiogenesis: potential initiators of the angiogenic cascade. In: Cassatella MA (ed). *The neutrophil: An emerging regulator of inflammatory and immune response*. Karger: Basel, pp 167-181.
- Bergers G, Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3: 401-410.
- Bifulco M, Di Marzo V (2002). Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med* 8: 547-550.
- Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazzo P (2006). Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *Br J Pharmacol* 148: 123-135.
- Blázquez C, Casanova ML, Planas A, Gómez del Pulgar T, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Aragonés J, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M (2003). Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J* 17: 529-531.
- Blázquez C, Carracedo A, Salazar M, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M (2008a). Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in gliomas: a new marker of cannabinoid antitumoral activity? *Neuropharmacology* 54: 235-243.
- Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M (2008b). Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res* 68: 1945-1952.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995). Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312: 637-641.
- Brazil DP, Hemmings BA (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26: 657-664.
- Brem S, Cotran R, Folkman J (1972). Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 48: 347-356.

- Brem S, Tsanaclis AM, Gately S, Gross JL, Herblin WF (1992). Immunolocalization of basic fibroblast growth factor to the microvasculature of human brain tumors. *Cancer* 70: 2673-2680.
- Burger PC, Vogel FS, Green SB, Strike TA (1985). Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56: 1106-1111.
- Burkey TH, Quock RM, Consroe P, Ehlert FJ, Hosohata Y, Roeske WR, Yamamura HI (1997). Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur J Pharmacol* 336: 295-298.
- Cantelmo AR, Cammarota R, Noonan DM, Focaccetti C, Comoglio PM, Prat M, Albini A (2010). Cell delivery of Met docking site peptides inhibit angiogenesis and vascular tumor growth. *Oncogene* 29: 5286-5298.
- Carchman RA, Harris LS, Munson AE (1976). The inhibition of DNA synthesis by cannabinoids. *Cancer Res* 36: 95-100.
- Carmeliet P, Jain RK (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Natur.* 407: 249-257.
- Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG (2010). Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT1A receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 159: 129-141.
- Cattaneo MG, Lucci G, Vicentini LM (2009). Oxytocin stimulates in vitro angiogenesis via a Pyk-2/Src-dependent mechanism. *Exp Cell Res* 315: 3210-3219.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA (2003). Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17: 1263-1293.
- Chi A, Norden AD, Wen PY (2007). Inhibition of angiogenesis and invasion in malignant gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 7: 1537-1560.
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* 25: 99-113.
- Curran S, Murray GI (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630.
- D'Alessio S, Blasi F (2009). The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. *Front Biosci* 14: 4575-4587.

- Dass K, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Sarkar FH (2008). Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treat Rev* 34: 122-136.
- de Meijer EP, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Moliterni VM, Ranalli P, Mandolino G (2003). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics* 163: 335-346.
- De Petrocellis L, Di Marzo V (2010). Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 5: 103-121.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 163: 1479-1494.
- DeAngelis LM (1998). Brain tumor therapy: new horizons, new hope. *Neurology* 50: 1209-1210.
- Demuth T, Berens ME (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 70: 217-228.
- Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.
- Di Cosimo S, Baselga J (2008). Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur J Cancer* 44: 2781-2790.
- Di Marzo V (2009). The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol Res* 60: 77-84.
- El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S (2010). Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav* 95: 434-442.



- ElSohly MA, Little TL Jr, Stanford DF (1992). Hexadeutero-11-nor-delta 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid: a superior internal standard for the GC/MS analysis of delta 9-THC acid metabolite in biological specimens. *J Anal Toxicol* 16: 188-191.
- Fassina G, Venè R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, Albin A (2004). Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res* 10: 4865-4873.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48: 443-450.
- Fellermeier M, Zenk MH (1998). Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett* 427: 283-285.
- Ferrari N, Tosetti F, De Flora S, Donatelli F, Noonan DM, Albin A (2010). Diet-derived phytochemicals: from cancer chemoprevention to cardio-oncological prevention. *Curr Drug Targets*.
- Folkman J (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31.
- Franceschi E, Tosoni A, Bartolini S, Mazzocchi V, Fioravanti A, Brandes AA (2009). Treatment options for recurrent glioblastoma: pitfalls and future trends. *Expert Rev Anticancer Ther* 5: 613-619.
- Fredriksson L, Li H, Eriksson U (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 197-204.
- Freimuth N, Ramer R, Hinz B (2010). Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 332: 336-344.
- Galanti G, Fisher T, Kventzel I, Shoham J, Gallily R, Mechoulam R, Lavie G, Amariglio N, Rechavi G, Toren A (2008). Delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression by downregulation of E2F1 in human glioblastoma multiforme cells. *Acta Oncol* 47: 1062-1070.
- Gallego C, Gupta SK, Heasley LE, Qian NX, Johnson GL (1992). Mitogen-activated protein kinase activation resulting from selective oncogene expression in NIH 3T3 and rat 1a cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 7355-7359.

- Gallia GL, Tyler BM, Hann CL, Siu IM, Giranda VL, Vescovi AL, Brem H, Riggins GJ (2009). Inhibition of Akt inhibits growth of glioblastoma and glioblastoma stem-like cells. *Mol Cancer Ther* 8: 386-393.
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6: 313-319.
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964). Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86: 1646-1647.
- Gauson LA, Stevenson LA, Thomas A, Baillie GL, Ross RA, Pertwee RG (2007). Cannabigerol behaves as a partial agonist at both CB1 and CB2 receptors. Symposium on the Cannabinoids. International Cannabinoid Research Society, p 206.
- Giese A, Loo MA, Rief MD, Tran N, Berens ME (1995). Substrates for astrocytoma invasion. *Neurosurgery* 37: 294-301.
- Gill EW, Paton WD, Pertwee RG (1970). Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of cannabis. *Nature* 228: 134-136.
- Glass M, Northup JK (1999). Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors. *Mol Pharmacol* 56: 1362-1369.
- Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, Shohami E, Spatz M (2004). Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 132: 87-92.
- Grant DS, Tashiro K, Segui-Real B, Yamada Y, Martin GR, Kleinman HK (1989). Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* 58: 933-943.
- Grinspoon L, Bakalar JB, Zimmer L, Morgan JP (1997). Marijuana addiction. *Science* 277: 749; author reply 750-752.
- Groft LL, Muzik H, Rewcastle NB, Johnston RN, Knäuper V, Lafleur MA, Forsyth PA, Edwards DR (2001). Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *Br J Cancer* 85: 55-63.
- Guzmán M, Galve-Roperh I, Sánchez C (2001). Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* 22: 19-22.
- Guzmán M (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 3: 745-755.

- Guzmán M, Duarte MJ, Blázquez C, Ravina J, Rosa MC, Galve-Roperh I, Sánchez C, Velasco G, González-Feria L (2006). A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer* 95: 197-203.
- Hanus L, Gopher A, Almog S, Mechoulam R (1993). Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that bind to the cannabinoid receptor. *J Med Chem* 36: 3032-3034.
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Chaefer L, Sawaya RE, Fuller GN (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 25: 55-57.
- Hollister LE (1974). Structure-activity relationships in man of cannabis constituents, and homologs and metabolites of delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology* 11: 3-11.
- Honkavuori M, Talvensaaari-Mattila A, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T, Santala M (2008). High serum TIMP-1 is associated with adverse prognosis in endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 28: 2715-2719.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29: 307-313.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54: 161-202.
- Hu G, Ren G, Shi Y (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation. *Oncogene* 30: 139-141.
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117: 4619-4628.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunological criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756.
- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G (1999). Cannabinoid-induced

mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14136-14141.

Jones NA, Hill AJ, Weston SE, Burnett MD, Stephens GJ, Whalley BJ, Williams CM (2011). Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure*.

Jonsson KO, Holt S, Fowler CJ (2006). The endocannabinoid system: current pharmacological research and therapeutic possibilities. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98: 124-134.

Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol* 7: 134-153.

Kesisis G, Broxterman H, Giaccone G (2007). Angiogenesis inhibitors. Drug selectivity and target specificity. *Curr Pharm Des* 13: 2795-2809.

Kleihues P, Sobin LH (2000). World Health Organization classification of tumors. *Cancer* 88: 2887.

Kogan NM (2005). Cannabinoids and cancer. *Mini Rev Med Chem* 5: 941-952.

Kogan NM, Blázquez C, Alvarez L, Gallily R, Schlesinger M, Guzmán M, Mechoulam R (2006). A cannabinoid quinone inhibits angiogenesis by targeting vascular endothelial cells. *Mol Pharmacol* 70: 51-59.

Kolch W (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351: 289-305.

Korff T, Augustin HG (1998). Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143: 1341-1352.

Korff T, Augustin HG (1999). Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci* 112: 3249-3258.

Lafleur MA, Hollenberg MD, Atkinson SJ, Knäuper V, Murphy G, Edwards DR (2001). Activation of pro-(matrix metalloproteinase-2) (pro-MMP-2) by thrombin is membrane-type-MMP-dependent in human umbilical vein endothelial cells and generates a distinct 63 kDa active species. *Biochem J* 357: 107-115.

- Lai Y, Shen Y, Liu XH, Zhang Y, Zeng Y, Liu YF (2011). Interleukin-8 induces the endothelial cell migration through the activation of phosphoinositide 3-kinase-Rac1/RhoA pathway. *Int J Biol Sci* 7: 782-791.
- Lakka SS, Gondi CS, Yanamandra N, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Rao JS (2003). Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth. *Cancer Res* 63: 2454-2461.
- Lee CY, Wey SP, Liao MH, Hsu WL, Wu HY, Jan TR (2008). A comparative study on cannabidiol-induced apoptosis in murine thymocytes and EL-4 thymoma cells. *Int Immunopharmacol* 8: 732-740.
- Lee JH, Choi JW, Kim YS (2011a). Serum TIMP-1 Predicts Survival Outcomes of Invasive Breast Carcinoma Patients: A Meta-analysis. *Arch Med Res*.
- Lee JH, Choi JW, Kim YS (2011b). Plasma or serum TIMP-1 is a predictor of survival outcomes in colorectal cancer: a meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis* 20: 287-291.
- Leon SP, Folkert RD, Black PM (1996). Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 77: 362-372.
- Liang KC, Lee CW, Lin WN, Lin CC, Wu CB, Luo SF, Yang CM (2007). Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 211: 759-770.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 1375-1387.
- Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 346: 835-840.
- Lorusso G, Vannini N, Sogno I, Generoso L, Garbisa S, Noonan DM, Albini A (2009). Mechanisms of hyperforin as an anti-angiogenic angioprevention agent. *Eur J Cancer* 45: 1474-1484.

- Lu KV, Jong KA, Rajasekaran AK, Cloughesy TF, Mischel PS (2004). Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Lab Invest* 84: 8-20.
- Mackie K, Hille B (1992). Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3825-3829.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995). Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15: 6552-6561.
- Makriyannis A (1995). Cannabinoid Receptors. In: Pertwee R (ed). Academic Press: London, pp 87-115
- Maor Y, Horowitz M, Gallily R, Mechoulam R (2005). Cannabigerol-dimethyl heptyl (CBG-DMH), a synthetic cannabinoid with hypotensive and vasorelaxant properties. Symposium on the Cannabinoids. International Cannabinoid Research Society, p 152.
- Marcu JP, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Horowitz MP, Lee J, Pakdel A, Allison J, Limbad C, Moore DH, Yount GL, Desprez PY, McAllister SD (2010). Cannabidiol enhances the inhibitory effects of delta9-tetrahydrocannabinol on human glioblastoma cell proliferation and survival. *Mol Cancer Ther* 9: 180-189.
- Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D (2004). Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 838-845.
- Massi P, Vaccani A, Bianchessi S, Costa B, Macchi P, Parolaro D (2006). The nonpsychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell Mol Life Sci* 63: 2057-2066.
- Massi P, Valenti M, Vaccani A, Gasperi V, Perletti G, Marras E, Fezza F, Maccarrone M, Parolaro D (2008). 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *J Neurochem* 104: 1091-1100.
- Massi P, Valenti M, Solinas M, Parolaro D (2010). Molecular Mechanisms Involved in the Antitumor Activity of Cannabinoids on Gliomas: Role for Oxidative Stress. *Cancers* 2: 1013-1026.

- McAllister SD, Chan C, Taft RJ, Luu T, Abood ME, Moore DH, Aldape K, Yount G (2005). Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *J Neurooncol* 74: 31-40.
- McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY (2007). Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 6: 2921-2927.
- McAllister SD, Murase R, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Allison J, Almanza C, Pakdel A, Lee J, Limbad C, Liu Y, Debs RJ, Moore DH, Desprez PY (2011). Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 129: 37-47.
- McCawley LJ, Matrisian LM (2001). Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13: 534-540.
- McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2006). Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: A novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharmacol* 70: 897-908.
- McPartland JM, Glass M, Pertwee RG (2007). Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br J Pharmacol* 152: 583-593.
- Mechoulam R, Shvo Y (1963). The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19: 2073-2078.
- Mechoulam R, Gaoni Y (1965). Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21: 1223-1229.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50: 83-90.
- Merkus FW (1971). Cannabivarin and tetrahydrocannabivarin, two new constituents of hashish. *Nature* 232: 579-580.
- Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW Jr (2001). Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *J Clin Oncol* 19: 1195-1206.

- Mo FM, Offertáler L, Kunos G (2004). Atypical cannabinoid stimulates endothelial cell migration via a Gi/Go-coupled receptor distinct from CB1, CB2 or EDG-1. *Eur J Pharmacol* 489: 21-27.
- Munro S, Thomas KL, Abu Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61–65.
- Murakami M, Simons M (2008). Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol* 15: 215-220.
- Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A (2008). Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer Metastasis Rev* 27: 31-40.
- Noonan DM, Sogno I, Albini A (2011). Plants and plant-derived products as cancer chemopreventive agents. In: Bagetta G, Cosentino M, Corasaniti MT, Sakurada S (ed). *Herbal medicines: development and validation of plant-derived medicines for human health*. CRC Press Inc.
- Oh WK, Vargas R, Jacobus S, Leitzel K, Regan MM, Hamer P, Pierce K, Brown-Shimer S, Carney W, Ali SM, Kantoff PW, Lipton A (2011). Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer* 117: 517-525.
- Park JB, Kwak HJ, Lee SH (2008). Role of hyaluronan in glioma invasion. *Cell Adh Migr* 2: 202-207.
- Pazos MR, Núñez E, Benito C, Tolón RM, Romero J (2005). Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 239-247.
- Pertwee RG (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74: 129-180.
- Pertwee RG (2005a). Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 168: 1-51.
- Pertwee RG (2005b). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J* 7: E625-E654.
- Pertwee RG (2005c). Cannabinoids as therapeutics. In: Mechoulam R (ed) *Birkhauser Verlag: Switzerland*, pp 47-65.



- Pertwee RG (2008). The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 153: 199-215.
- Piñeiro R, Maffucci T, Falasca M (2011). The putative cannabinoid receptor GPR55 defines a novel autocrine loop in cancer cell proliferation. *Oncogene* 30: 142-152.
- Pisanti S, Picardi P, Prota L, Proto MC, Laezza C, McGuire PG, Morbidelli L, Gazzero P, Ziche M, Das A, Bifulco M (2011). Genetic and pharmacologic inactivation of cannabinoid CB1 receptor inhibits angiogenesis. *Blood* 117: 5541-5550.
- Porter AC, Felder CC (2001). The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45-60.
- Preet A, Ganju RK, Groopman JE (2008). Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene* 27: 339-346.
- Rabquer BJ, Tsou PS, Hou Y, Thirunavukkarasu E, Haines GK 3rd, Impens AJ, Phillips K, Kahaleh B, Seibold JR, Koch AE (2011). Dysregulated expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 13: R18.
- Ramer R, Hinz B (2008). Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 100: 59-69.
- Ramer R, Merkord J, Rohde H, Hinz B (2010a). Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem Pharmacol* 79: 955-966.
- Ramer R, Rohde A, Merkord J, Rohde H, Hinz B (2010b). Decrease of plasminogen activator inhibitor-1 may contribute to the anti-invasive action of cannabidiol on human lung cancer cells. *Pharm Res* 27: 2162-2174.
- Rao JS (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3: 489-501.
- Rao JS (2004). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 3: 489-501.

- Ribatti D (2005). The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 128: 303-309.
- Rosenbaum T, Simon SA (2007). TRPV1 Receptors and Signal Transduction. In: Liedtke WB, Heller S (ed). *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press: Boca Raton (FL).
- Ross RA (2009). The enigmatic pharmacology of GPR55. *Trends Pharmacol Sci* 30: 156-163.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152: 1092-1101.
- Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 119: 1359-1372.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M (1998). Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *FEBS Lett* 436: 6-10.
- Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, Mukhtar H (2008). Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Res* 68: 339-342.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF (1999). Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64: 193-198.
- Semenza GL (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721-732.
- Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A (2011). Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther* 10: 1161-1172.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB (2000). The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129: 227-230.

- Stefansson S, McMahon GA, Petitclerc E, Lawrence DA (2003). Plasminogen activator inhibitor-1 in tumor growth, angiogenesis and vascular remodeling. *Curr Pharm Des* 9: 1545-1564.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995). 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97.
- Torres S, Lorente M, Rodríguez-Fornés F, Hernández-Tiedra S, Salazar M, García-Taboada E, Barcia J, Guzmán M, Velasco G (2011). A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Mol Cancer Ther* 10: 90-103.
- Tran NL, McDonough WS, Savitch BA, Fortin SP, Winkles JA, Symons M, Nakada M, Cunliffe HE, Hostetter G, Hoelzinger DB, Rennert JL, Michaelson JS, Burkly LC, Lipinski CA, Loftus JC, Mariani L, Berens ME (2006). Increased fibroblast growth factor-inducible 14 expression levels promote glioma cell invasion via Rac1 and nuclear factor-kappaB and correlate with poor patient outcome. *Cancer Res* 66: 9535-9542.
- Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M (2009). The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 32-71.
- Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D (2005). Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 144: 1032-1036.
- Valenzano KJ, Sun Q (2004). Current perspectives on the therapeutic utility of VR1 antagonists. *Curr Med Chem* 11: 3185-3202.
- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G (1997). Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 390: 518-521.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003). Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23: 1398-1405.
- Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, Ridge SA, Mackie K, Greasley PJ, Ross RA, Rogers MJ (2009). The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 16511-16516.

- Yamada T, Ueda T, Shibata Y, Ikegami Y, Saito M, Ishida Y, Ugawa S, Kohri K, Shimada S (2010). TRPV2 activation induces apoptotic cell death in human T24 bladder cancer cells: a potential therapeutic target for bladder cancer. *Urology* 76: 509.e1-7.
- Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 278: 15911-15916.
- Zhuge X, Murayama T, Arai H, Yamauchi R, Tanaka M, Shimaoka T, Yonehara S, Kume N, Yokode M, Kita T (2005). CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1295-1300.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sørsgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED (1999). Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.