

FRANCISCO CARLOS MACHADO ROCHA

**REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA DE ESTUDOS
CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS SOBRE OS EFEITOS
ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
De Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo

2010

FRANCISCO CARLOS MACHADO ROCHA

**REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA DE ESTUDOS
CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS SOBRE OS EFEITOS
ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Dartiu Xavier da
Silveira Filho

São Paulo

2010

Rocha, Francisco Carlos Machado

**Revisão Sistemática da Literatura de Estudos Clínicos e Experimentais
Sobre os Efeitos Antitumorais dos Canabinóides / Francisco Carlos Machado**

Rocha – São Paulo, 2010. 366 p.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Psiquiatria.

Orientador: Prof. Dr. Dartiu Xavier da Silveira Filho

Título em Inglês: Systematic Review of the Literature of Clinical and Experimental Studies on the Antitumoral Effects of Cannabinoids

1. Cannabis 2. Câncer 3. Efeito Antitumoral 4- Estudos clínicos 5- Estudos experimentais 6- Revisão sistemática da literatura [tipo de publicação]

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PSIQUIATRIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Cássio do Nascimento Pitta

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Jair de Jesus Mari

FRANCISCO CARLOS MACHADO ROCHA

REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA DE ESTUDOS
CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS SOBRE OS EFEITOS
ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dartiu Xavier da Silveira Filho – Prof. Adjunto Livre-Docente do Departamento de Psiquiatria – UNIFESP/EPM

Prof. Dr. Sérgio Baxter Andreoli – Prof. Adjunto do Departamento de Psiquiatria – UNIFESP/EPM

Prof. Dr. Isaac Germano Karniol – Prof. Titular do Departamento de Psiquiatria da UNICAMP e da UNISA

Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro – Prof. Titular do Departamento de Epidemiologia da Universidade Católica de Santos e Prof. Adjunto do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina do Centro Universitário Lusíada

Prof. Dr. Thomaz Augusto Alves da Rocha e Silva – Prof. do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

SUPLENTE:

Prof. Dr. Álvaro Nagib Atallah – Prof. Titular do Departamento de Medicina e Chefe da Disciplina de Medicina de Urgência e Medicina Baseada em Evidências – UNIFESP/EPM. Diretor do Centro Cochrane do Brasil

Prof. Dr. Antônio Waldo Zuardi – Prof. Titular do Departamento de Psiquiatria e Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

**CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento
De Pessoal de Nível Superior apoiou o
desenvolvimento desta pesquisa.**

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À minha querida esposa Rita, pela luz que representa em minha vida. Sou muito grato por seu companheirismo em mais esta etapa de nossas vidas. Te amo!

Aos meus queridos Lucas, Pedro e Yasmin, que representam o universo através de seus olhares. Também aos outros três filhos, que tão pouco tempo tiveram nesta existência.

Aos meus pais José e Maria Terezinha, pelo exemplo de perseverança e fé.

Aos meus irmãos Mauro, Meire, Wander e José Cláudio, por serem quem são e pelos ensinamentos que constantemente me proporcionam.

Ao Prof. Dr. Dartiu Xavier da Silveira Filho, pela serenidade, sensibilidade e saber. Agradeço muito a generosa confiança depositada em mim bem como as oportunidades oferecidas nestes quase dez anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Jair Guilherme dos Santos Júnior, meu co-orientador e co-revisor nesta tese, agradeço a confiança e a oportunidade de tê-lo como parceiro nesta caminhada. A sua amizade, presteza e conhecimento espelham um grande professor e pesquisador.

Ao Prof. Dr. Sérgio Carlos Stefano, meu co-orientador e co-revisor na tese de mestrado, agradeço a inspiração de um grande pesquisador que trabalha com o coração. Você é um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Álvaro Nagib Atallah, presidente da Colaboração Cochrane do Brasil e responsável pela difusão da metodologia de Revisão Sistemática neste país, agradeço a presteza de me receber e ofertar gentilmente as informações preciosas que necessitava.

Ao querido Dr. João Francisco Mota Fierro, pela amizade, carinho e dedicação na abertura de caminhos da verdade.

Ao querido Dr. Édson Rodrigues da Silva, pela coerência e verdade que representa em minha vida.

Aos mestres e ao mundo espiritual.

Aos pacientes com câncer, para quem dedico esta tese.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	8
3. MÉTODO	10
3.1. Revisão Sistemática e Metanálise	11
3.2. Critério de Seleção dos Estudos	12
3.3 Critério de Exclusão dos Estudos	13
3.4. Pesquisa Bibliográfica	13
3.5. Avaliação da Qualidade Metodológica	21
3.6. Medidas de Desfecho	22
3.7. Processo de Seleção dos Estudos	22
3.8. Análise Estatística	23
3.9. Contato com os Autores	23
3.10. Aspectos Éticos	23
4. RESULTADOS	24
- Características dos Estudos Incluídos na Revisão Sistemática – tabela	27
- Características dos Estudos Incluídos na Revisão Sistemática	97
- Características dos Estudos Excluídos da Revisão Sistemática	110
5. DISCUSSÃO	112
- Uma visão geral dos mecanismos modulados pelos canabinóides	113
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos gliomas	117
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos neuroblastomas	139

- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos feocromocitomas -----	144
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de próstata -----	147
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de mama -----	158
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores do cérvix uterino -----	176
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de tireóide -----	183
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de pulmão -----	192
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nas leucemias e linfomas -----	197
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de pele -----	215
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores pancreáticos -----	221
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de origem hepática -----	225
- Efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores colo-retais -----	233
- Canabinóides, Imunidade e Efeito Bifásico -----	248
- Seletividade dos Canabinóides na Ação Antitumoral -----	250
- Canabinóides e Efeitos Colaterais -----	252
- Limitações do Estudo -----	256
6. CONCLUSÕES -----	257
7. IMPLICAÇÕES PARA A PESQUISA -----	268
8. IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA -----	271
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	273
10. ABSTRACT -----	362
11. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA -----	365

RESUMO

RESUMO

Objetivo: Avaliar, através de uma revisão sistemática da literatura, os efeitos antitumorais dos canabinóides em qualquer tipo de neoplasia, utilizando como amostra seres humanos e animais de laboratório com tumores, bem como culturas de células tumorais. **Método:** A pesquisa incluiu as seguintes bases eletrônicas de dados: PUBMED, EMBASE, LILACS e “The Cochrane Collaboration Controlled Trials Register”. Todos os estudos publicados que envolveram os efeitos antitumorais (mecanismos celulares e moleculares) dos canabinóides foram considerados para esta revisão. Desta forma, foram levados em conta não somente ensaios clínicos (randomizados ou não) como também estudos experimentais *in vivo* e *in vitro*. A estratégia de busca bibliográfica compreendeu todas as publicações de cada base de dados até 31 de dezembro de 2009. O exame minucioso de todas as referências bibliográficas dos artigos importantes para esta revisão (incluindo artigos de revisão) foi igualmente realizado com o objetivo de selecionar artigos que não tivessem sido capturados pela estratégia de busca eletrônica. **Resultados:** De 3.920 artigos inicialmente identificados, 117 preencheram os critérios de inclusão para esta revisão. Todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática foram experimentais (*in vivo* e/ou *in vitro*), excetuando-se um estudo clínico piloto fase I/II em humanos. Em todos os estudos experimentais incluídos, os canabinóides exerceram atividade antitumoral *in vitro* e/ou evidência antitumoral *in vivo* em vários modelos de células tumorais e tumores, respectivamente. As atividades antitumorais incluíram: efeitos antiproliferativos (sequestro do ciclo celular), diminuição da viabilidade e morte celular por toxicidade, apoptose, necrose, autofagia, efeitos antiangiogênicos e antimigratórios. As evidências antitumorais incluíram: diminuição do tamanho tumoral, efeitos antiangiogênicos e antimetastáticos. Adicionalmente, a maioria dos estudos descreveu que os canabinóides apresentaram seletividade na ação antitumoral em vários modelos tumorais. Desta forma, as células normais usadas como controle não foram atingidas. O fator segurança na administração dos canabinóides também foi demonstrado *in vivo*, em ratos com tumores marcados com células tumorais. O único estudo realizado em humanos, por sua vez,

demonstrou segurança na administração intratumoral do delta-9-THC em pacientes com glioblastoma multiforme recorrente. **Conclusões:** Os vários canabinóides testados em múltiplos modelos de tumores apresentaram efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*. Estes achados indicam que os canabinóides são compostos promissores para o tratamento das neoplasias. No entanto, pesquisas em seres humanos através de ensaios clínicos randomizados, metodologicamente bem conduzidos, devem ser realizadas para a avaliação de eficácia dos mesmos antes que eles possam ser indicados para esta finalidade. Este é o caso do delta-9-THC e do canabidiol, que já foram testados e aprovados para uso em humanos em outras condições clínicas. Outros canabinóides, no entanto, necessitam ainda de pesquisas farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas antes de poderem ser testados em seres humanos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A maconha tem sido utilizada pelo homem ao longo de sua história para diversos fins. As referências mais remotas de seu uso são de mais de 12000 anos atrás. Fragmentos de relatos de séculos a.C. apontam a Ásia Central como o local de início do plantio de maconha para uso médico (Karniol, 2000). O uso de cannabis como tratamento para uma variedade de doenças ajudou sua propagação na Antiga Ásia e no mundo ocidental. Foi utilizada no tratamento para dor, controle do peso, espasmos musculares, pouco apetite, náuseas, insônia, asma e depressão. Adicionalmente, seu uso foi reportado para aliviar dores funcionais, sintomas pré-menstruais e cólicas menstruais desde os tempos antigos até os dias atuais (Grotenhermen, 2002).

O médico irlandês W. B. O'Shanghnessy fez vários testes toxicológicos em animais de laboratório. Convencido da segurança desta substância para tratamento ele introduziu a cannabis no mundo ocidental em 1839, com a publicação de um tratado sobre suas várias possibilidades de uso terapêutico (Adams and Martin, 1996; Karniol, 2000; Fankhauser, 2002). No entanto, o seu uso terapêutico permaneceu aceito até o início do século XX.

A maconha foi listada na farmacopéia americana até 1944 (Bonnie and Whitebread, 1974), época na qual foi retirada desta lista devido à pressão política para banir o seu uso social nos EUA (Walsh et al., 2003). Embora tenha permanecido na farmacopéia até esta data, já em 1937 o seu uso médico foi praticamente abolido em função da "Marijuana Tax Act" (Lemberger, 1980), em que o transporte da maconha passou a ser taxado com custos muito altos, o que desestimulou os setores que trabalhavam com esta droga para fins medicinais. Entre 1940 e 1950, o uso medicinal e a pesquisa decaíram marcadamente, principalmente nos Estados Unidos.

A condição de ilegalidade conferida a esta substância na Convenção Internacional sobre Drogas Narcóticas de 1961 e complementada pelo protocolo de 1972 a coloca no "Schedule I". As substâncias pertencentes a esta categoria são proibidas de serem cultivadas, portadas ou vendidas e não lhe são atribuídas

nenhum uso medicinal (Machado, 1992; Adams and Martin, 1996; WHO, 1997; Hall, 1998). Este entendimento foi extremamente importante para o desencorajamento do seu uso terapêutico pelos profissionais de saúde e pelo desinteresse de pesquisas na área.

A cannabis é uma planta dióica, ou seja, de sexos separados. As folhas e as inflorescências, principalmente da planta feminina, secretam uma resina que contém princípios ativos chamados canabinóides (Karniol, 2000). Dos quase 80 canabinóides existentes nesta planta, o isômero delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) é o mais importante do ponto de vista farmacológico e toxicológico (Karniol, 2000; Fankhauser, 2002). Outros fitocannabinóides relevantes incluem o delta-8-THC, que é quase tão ativo quanto o delta-9-THC (THC), mas menos abundante; cannabinol, que é produzido em grandes quantidades, porém é um fraco agente canabimimético; canabidiol, que não possui atividade canabimimética, mas é abundante (Guzmán, 2003). É importante ressaltar que, além dos canabinóides, existem mais de 400 constituintes na planta que podem influenciar suas ações (Karniol, 2000).

Os canabinóides apresentam dois endocannabinóides bem estabelecidos: anandamida (AEA), primeiramente descrita pelo grupo do Dr. Mechoulam (Devane et al., 1992) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Estes endocannabinóides, diferente dos neurotransmissores clássicos, são produzidos por demanda, após a despolarização dos neurônios do terminal pós-sináptico. Os mesmos não são armazenados em vesículas sinápticas e, portanto, são prontamente liberados no espaço extracelular após sua produção (Sugiura et al., 1995, Freund et al., 2003). Existem também os compostos chamados de 'cannabinoid-like' que são presentes nos cérebros de humanos, ratos e camundongos (Di Marzo, 1998a; Macarrone & Finazzi-Agró, 2002a). São eles a N-palmitoiletanolamina (PEA), N-oleoiletanolamina (OEA), e N-estearoiletanolamina (SEA) (Mechoulam et al., 2002). No cérebro, eles podem inibir a degradação da AEA e 2-AG e, por conseguinte, aumentar a sua atividade (Mechoulam et al., 2002).

Até o presente momento, foi descrito que os endocanabinóides interagem com cinco receptores: receptor CB1, CB2, vanilóide (TPRV1), GPR55 e PPAR α (embora pouco se saiba sobre o papel funcional da interação dos endocanabinóides com os dois últimos receptores) (Caterina et al., 1997; Sawzdargo et al., 1999; Howlett et al., 2002; Ross, 2003; Mackie and Stella, 2006; Ryberg et al., 2007; Sun et al., 2007). Os receptores CB1 e CB2 são receptores acoplados à proteína Gi/o (Howlett, 2002). O CB1 se expressa de forma abundante no cérebro, mas também em nervos periféricos terminais e em outros locais como testículos, olhos, endotélio vascular e baço (Guzmán, 2003). Já o CB2 foi inicialmente descrito como um receptor que se expressava quase que exclusivamente no sistema imunológico, como nas células dos linfócitos B e T e macrófagos e tecidos como baço, tonsilas e linfonodos (Howlett et al., 2002; Porter and Felder, 2001). Estudos recentes, no entanto, mostram a existência destes receptores no sistema nervoso central, particularmente nas células da microglia, células do glioma, astrócitos e certas subpopulações neurais (Fernandez-Ruiz et al., 2007). O receptor ionotrópico TRPV1 também é expresso em diferentes regiões encefálicas (Mezey et al., 2000; Marinelli et al., 2005; Cristino et al., 2006) e periféricas (Chen et al., 2003; Southall et al., 2003; Akiba et al., 2004; Golech et al., 2004; Saunders et al., 2007). Os mesmos apresentam uma significativa co-expressão com os receptores CB1 em várias regiões, resultando em uma potencialização funcional da sinalização mediada por estes receptores (Mezey et al., 2000; Hermann et al., 2003; Cristino et al., 2006).

Além dos endocanabinóides, existem três principais classes estruturais de ligantes de agonistas canabinóides: i. canabinóides análogos ao THC 'clássicos'; ii. canabinóides análogos ao THC 'não-clássicos' (bicíclicos e tricíclicos); iii. aminoalquilindoles (Guzmán, 2003). Os canabinóides clássicos incluem os canabinóides produzidos pela planta da *Cannabis sativa* e outros sintetizados pela Universidade Hebraica de Israel (séries HU) (Guzmán et al., 2001a). Os canabinóides não-clássicos são um grupo composto de diferentes sintéticos análogos ao THC (bicíclicos e tricíclicos) e o seu principal representante é o CP-55,940 (Guzmán et al., 2001a). Os aminoalquilindoles, à parte dos inibidores da

ciclooxigenase, são compostos canabimiméticos. Este grupo é representado pelo WIN-55,212-2 (Guzmán et al., 2001a).

Através de modificações seletivas de estruturas químicas das moléculas dos canabinóides, foram criados agonistas (Guzmán, 2003) e antagonistas (Howlett, 2002; Pertwee, 2000) sintéticos seletivos para os receptores CB1 e CB2. Estes novos compostos representam excelentes ferramentas farmacológicas para o estudo do sistema endocanabinóide, bem como podem servir como um padrão para o desenho de drogas clinicamente úteis (Guzmán, 2003). Vale ressaltar que, às vezes, estes compostos se comportam como agonistas inversos ao invés de antagonistas (Velasco et al., 2007).

Os canabinóides endógenos, seus receptores e seus processos de síntese, recaptura e degradação, constituem o que se chama de sistema endocanabinóide (Piomelli, 2003). Muita das ações farmacológicas do sistema endocanabinóide se dá pela sua propriedade modulatória com outros sistemas de neurotransmissão (Pertwee, 1990; Adams and Martin, 1996; Mallet and Beninger, 1996; Felder and Glass, 1998), abrindo um grande potencial para a descoberta de drogas terapêuticas que nele atuem (Karniol, 2000).

Os efeitos terapêuticos da cannabis e de seu principal agente farmacológico, o delta-9-THC, têm sido estudados por pesquisadores de diferentes países, incluindo suas ações no glaucoma, esclerose múltipla, anorexia associada à AIDS, enxaqueca, epilepsia, dor crônica, depressão, náusea e vômito decorrente de quimioterapia em pacientes com câncer, entre outras (Grotenherman, 2002). Estas pesquisas tem colaborado para a desmistificação do uso terapêutico da planta.

O fitocanabinóide canabidiol (CBD), por sua vez, tem sido alvo de grande interesse por parte dos pesquisadores pela verificação de que o mesmo não apresenta efeitos psicoativos (Cunha et al., 1980; Carlini and Cunha, 1981). Estudos sobre as interações entre o delta-9-THC e o CBD também tem sido o foco de diversas pesquisas. Além dos efeitos medicinais verificados para o CBD (Vaccani et al., 2005; Massi et al., 2006; Ligresti et al., 2006), o mesmo apresenta efeito modulatório nas ações do delta-9-THC, diminuindo os efeitos colaterais do

mesmo (Russo, 2006a). Esta observação foi primordialmente verificada por pesquisadores brasileiros (Karniol and Carlini, 1973; Karniol et al., 1974; Zuardi et al., 1982). No Brasil, o professor Ribeiro do Valle foi pioneiro nas pesquisas farmacológicas sobre a *Cannabis sativa* (Vieira et al., 1967; Valle et al., 1968). O CBD, em particular, tem sido estudado por vários pesquisadores brasileiros em diferentes modelos de doenças in vivo (Carlini et al, 1973; Carlini et al, 1975; Mechoulam and Carlini, 1978; Consroe et al., 1982; Leite et al., 1982, Zuardi et al., 1991) e em humanos (Cunha et al., 1980; Carlini and Cunha, 1981; Zuardi et al., 2009; Hallak et al., 2010).

Embora a maconha não tenha retornado à farmacopéia americana, em 1986 o FDA aprovou o uso medicinal do delta-9-THC em pacientes com câncer para o alívio dos efeitos colaterais de náusea e vômito decorrentes de quimioterapia (Walsh et al., 2003; Machado Rocha et al., 2008). Até o momento, duas medicações, Marinol (dronabinol, delta-9-THC) e Cesamet (nabilone), são aprovadas para este fim (Machado Rocha et al., 2008). O Marinol, por sua vez, também é aprovado para o tratamento da anorexia e caquexia em pacientes com AIDS (Grotenhermen, 2002).

Discussões sobre o viés ideológico da proibição do uso da cannabis para fins medicinais vem ocorrendo em diversos núcleos de pesquisadores. Salienta-se que a Organização Mundial de Saúde, em Convenção das Nações Unidas sobre Drogas Psicotrópicas realizada em 2003, propôs que o delta-9-THC deveria ser reclassificado para "Schedule IV" (WHO, 2003; Carlini, 2004). As substâncias pertencentes a esta categoria são aquelas que não apresentam risco substancial para a saúde pública e que sua forma de abuso é rara (WHO, 2003; Carlini, 2004).

A atividade anti-neoplásica do THC e de seus análogos foram primeiramente observados no início dos anos 70 (Munson et al., 1975), antes das descobertas dos receptores canabinóides e dos endocanabinóides. No entanto, a despeito do grande potencial de interesse do tema, não houve investigações aprofundadas sobre o mesmo neste período (Bifulco and Di Marzo, 2002). Por outro lado, estudos recentes sugerem que drogas que mimetizam o sistema endocanabinóide podem ser usadas para retardar ou bloquear o desenvolvimento

do câncer (Bifulco and Di Marzo, 2002; Derkinderen et al., 2004; Velasco et al., 2004; Carter and Ugalde, 2004; Bifulco et al., 2006; Vignot et al., 2006; Bifulco et al., 2007). Estes efeitos são decorrentes da ação dos canabinóides em diversos mecanismos celulares e moleculares diretamente relacionados com o controle da proliferação e sobrevivência celular (Bouaboula et al., 1995; Derkinderen et al., 1996; Liu et al., 2000; Gómez Del Pulgar et al., 2000; Rueda et al., 2002). Adicionalmente estes efeitos são tanto dependentes quanto independentes da ativação dos receptores canabinóides. Neste sentido, os endocanabinóides exercem um papel central no controle do destino celular.

Esta revisão sistemática teve como proposta localizar toda informação científica disponível sobre o efeito antitumoral dos canabinóides na literatura mundial, e agrupar os seus resultados no intuito de fornecer um panorama dos efeitos medicinais dos canabinóides no tratamento do câncer.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Objetivo geral:

- Avaliar os efeitos antitumorais dos canabinóides no tratamento de qualquer tipo de câncer em estudos *in vivo* (humanos e animais de laboratório) e *in vitro* (cultura de células tumorais).

Ojetivos específicos:

- Avaliar os efeitos celulares e moleculares dos canabinóides envolvidos na toxicidade, morte celular tumoral e/ou efeitos antiproliferativos, bem como os seus efeitos na diminuição do crescimento tumoral
- Avaliar os efeitos celulares e moleculares dos canabinóides envolvidos nos seus efeitos antiangiogênicos
- Avaliar os efeitos celulares e moleculares dos canabinóides envolvidos nos seus efeitos antimetastáticos

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Revisão Sistemática e Metanálise

A revisão sistemática é uma forma de conduzir revisões da literatura com o mesmo rigor científico verificado na condução de ensaios clínicos. Dessa forma, descreve os critérios de inclusão e exclusão a serem aplicados, o método de avaliação da qualidade metodológica e a forma como os resultados serão apresentados.

Caracteriza-se por uma pesquisa exaustiva e uma análise objetiva da literatura disponível, utilizando-se de uma metodologia pré-estabelecida em um protocolo, possibilitando a replicação da estratégia utilizada, com uma seleção justificada dos estudos e uma análise da qualidade metodológica dos mesmos. É uma tentativa de sintetizar todas as informações em um dado momento sobre uma questão específica. Ela pode ou não incluir metanálise, método que permite a estimativa do efeito das intervenções (Glass, 1976; Cucherat, 1997).

A metanálise distingue três formas de análise de pesquisas: i. a *primária* ou análise dos dados originais; ii. a *secundária* ou reanálise dos dados originais, com o objetivo de se responder a novas questões; iii. a *metanálise*, ou seja, análise da análise, que constituiria “o método que analisaria estatisticamente o conjunto dos resultados de vários estudos individuais com o objetivo de integrar os achados” (Glass, 1976). A metanálise, mais do que uma simples técnica estatística, é um procedimento. Esta síntese proporciona ganho de poder estatístico na pesquisa dos efeitos de determinado tratamento, maior precisão na estimativa do tamanho do efeito e permite, em casos de resultados aparentemente discordantes, uma visão global da situação.

Aplicadas recentemente à medicina, a revisão sistemática e a metanálise respondem à necessidade crescente de acompanhamento dos avanços e das evidências, sobre as quais devem se apoiar as decisões terapêuticas.

3.2 Critérios de Seleção dos Estudos

Tipos de Estudo:

Todos os estudos publicados que envolveram efeitos antitumorais (mecanismos celulares e moleculares) dos canabinóides foram incluídos:

- Ensaios clínicos, metodologicamente adequados, randomizados ou não, em seres humanos que utilizaram cannabis (e/ou canabinóides) no tratamento antitumoral de qualquer tipo de câncer.
- Estudos experimentais que avaliaram os mecanismos antitumorais dos canabinóides em qualquer tipo de câncer em animais de laboratório, bem como o uso de canabinóides em qualquer linha de células tumorais.

Tipos de Participantes (amostra):

- Pessoas com qualquer tipo de câncer, independente de sexo, idade e local de tratamento
- Animais de laboratório com qualquer tipo de tumor
- Células tumorais em experimentos *in vitro*

Tipos de Intervenção:

Intervenções farmacológicas à base de produtos derivados de cannabis (canabinóides) e/ou cannabis fumada, independente do tempo de intervenção e da associação a outros tipos de terapia antitumorais nos seguintes casos: i. em pacientes com qualquer tipo de câncer; ii. em animais de laboratório com tumores; iii. em células tumorais em experimentos *in vitro*.

3.3 Critérios de exclusão dos estudos:

- estudos não publicados
- estudos que descreveram outros mecanismos além dos "celulares" e "moleculares"
- estudos nos quais os mecanismos envolvidos nos efeitos antitumorais dos canabinóides foram somente supostos e não evidenciados.
- Artigos narrativos de revisão (estes artigos foram usados para verificação de referências bibliográficas)

3.4 Pesquisa Bibliográfica

Foram realizadas busca nas seguintes bases eletrônicas de dados: MEDLINE (PUBMED), EMBASE, LILACS e “The Cochrane Collaboration Controlled Trials Register”. A estratégia de busca bibliográfica compreendeu o período inicial das bases de dados até 31 de dezembro de 2009.

A expressão de busca baseou-se nas seguintes categorias de MESH Terms (“Medical Subject Heading”): “cannabis”, “cannabinoids”, “endocannabinoids”, “cannabinoid receptors”, “neoplasms”, “cultured tumor cells”, “antineoplastic drugs”, “fatty acid synthesis inhibitors”, “antimitotic drugs”, “cancer treatment protocol”. As diferentes estratégias de busca utilizadas para as diversas bases de dados são apresentadas abaixo.

As referências bibliográficas de todos os estudos considerados relevantes para esta revisão foram examinadas detalhadamente, a fim de encontrar estudos não identificados na pesquisa eletrônica.

Segue a descrição das bases de dados mencionadas:

3.4.1 MEDLINE (Silver Platter, SPIRS v2.0)

MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*) é um banco de dados composto por 3500 jornais e revistas, cobrindo todas as áreas das ciências da saúde. Corresponde basicamente às mesmas fontes encontradas no *Index Medicus*, na estrutura mais detalhada já desenvolvida para pesquisa *online*, sendo 75% das referências de publicações de língua inglesa (Armstrong, 1993).

Segue a estratégia de busca utilizada para o MEDLINE.

("neoplasms"[MeSH Terms] OR "neoplasms"[All Fields]) AND ("1"[PDAT] :
 "2009/12/31"[PDAT]) OR ("cultured tumour cells"[All Fields] OR "tumor cells,
 cultured"[MeSH Terms] OR ("tumor"[All Fields] AND "cells"[All Fields] AND
 "cultured"[All Fields]) OR "cultured tumor cells"[All Fields] OR ("cultured"[All Fields]
 AND "tumor"[All Fields] AND "cells"[All Fields])) AND ("1"[PDAT] :
 "2009/12/31"[PDAT]) OR ("antineoplastic agents"[MeSH Terms] OR
 ("antineoplastic"[All Fields] AND "agents"[All Fields]) OR "antineoplastic agents"[All
 Fields] OR ("antineoplastic"[All Fields] AND "drugs"[All Fields]) OR "antineoplastic
 drugs"[All Fields] OR "antineoplastic agents"[Pharmacological Action]) AND
 ("1"[PDAT] : "2009/12/31"[PDAT]) OR ("fatty acid synthesis inhibitors"[MeSH
 Terms] OR ("fatty"[All Fields] AND "acid"[All Fields] AND "synthesis"[All Fields]
 AND "inhibitors"[All Fields]) OR "fatty acid synthesis inhibitors"[All Fields] OR "fatty
 acid synthesis inhibitors"[Pharmacological Action]) AND ("1"[PDAT] :
 "2009/12/31"[PDAT]) OR ("antimitotic agents"[MeSH Terms] OR ("antimitotic"[All
 Fields] AND "agents"[All Fields]) OR "antimitotic agents"[All Fields] OR
 ("antimitotic"[All Fields] AND "drugs"[All Fields]) OR "antimitotic drugs"[All Fields]
 OR "antimitotic agents"[Pharmacological Action]) AND ("1"[PDAT] :
 "2009/12/31"[PDAT]) OR ("antineoplastic protocols"[MeSH Terms] OR
 ("antineoplastic"[All Fields] AND "protocols"[All Fields]) OR "antineoplastic
 protocols"[All Fields] OR ("cancer"[All Fields] AND "treatment"[All Fields] AND
 "protocol"[All Fields]) OR "cancer treatment protocol"[All Fields]) AND ("1"[PDAT] :

"2009/12/31"[PDAT]) AND (("marijuana abuse"[MeSH Terms] OR ("marijuana"[All Fields] AND "abuse"[All Fields]) OR "marijuana abuse"[All Fields] OR "cannabis"[All Fields] OR "cannabis"[MeSH Terms]) AND ("1"[PDAT] : "2009/12/31"[PDAT]) OR (cannabacea[All Fields] OR cannabaceae[All Fields] OR cannabaceae/immunology[All Fields] OR cannabaceae/metabolism[All Fields] OR cannabaceae/physiology[All Fields] OR cannabainoid[All Fields] OR cannabalized[All Fields] OR cannabanoid[All Fields] OR cannabi[All Fields] OR cannabias[All Fields] OR cannabic[All Fields] OR cannabichromanone[All Fields] OR cannabichromene[All Fields] OR cannabichromenic[All Fields] OR cannabicitran[All Fields] OR cannabicoumaronic[All Fields] OR cannabicyclohexanol[All Fields] OR cannabicyclol[All Fields] OR cannabidinoid[All Fields] OR cannabidinoids[All Fields] OR cannabidiol[All Fields] OR cannabidiol/agonists[All Fields] OR cannabidiol/analysis[All Fields] OR cannabidiol/blood[All Fields] OR cannabidiol/chemistry[All Fields] OR cannabidiol/immunology[All Fields] OR cannabidiol/metabolism[All Fields] OR cannabidiol/pharmacokinetics[All Fields] OR cannabidiol/pharmacology[All Fields] OR cannabidiol/thc[All Fields] OR cannabidiol/toxicity[All Fields] OR cannabidiol/urine[All Fields] OR cannabidiol's[All Fields] OR cannabidiolic[All Fields] OR cannabidiolique[All Fields] OR cannabidiolocarbonsaure[All Fields] OR cannabidiols[All Fields] OR cannabidivarin[All Fields] OR cannabidol[All Fields] OR cannabidolic[All Fields] OR cannabielsoin[All Fields] OR cannabies[All Fields] OR cannabiflavonoids[All Fields] OR cannabifolactone[All Fields] OR cannabifolia[All Fields] OR cannabifolius[All Fields] OR cannabigerol[All Fields] OR cannabigerolate[All Fields] OR cannabigerolic[All Fields] OR cannabilactone[All Fields] OR cannabilactones[All Fields] OR cannabilism[All Fields] OR cannabimimetic[All Fields] OR cannabimimetic'[All Fields] OR cannabimimetically[All Fields] OR cannabimimetics[All Fields] OR cannabimimetric[All Fields] OR cannabina[All Fields] OR cannabinaceae[All Fields] OR cannabinaceas[All Fields] OR cannabinacees[All Fields] OR cannabinceae[All Fields] OR cannabinergic[All Fields] OR cannabinergics[All Fields] OR cannabinerolic[All Fields] OR cannabinimimetic[All Fields] OR cannabiniod[All

Fields] OR cannabinioid[All Fields] OR cannabinlid[All Fields] OR cannabinnoid[All Fields] OR cannabinnoids[All Fields] OR cannabino[All Fields] OR cannabinod[All Fields] OR cannabinodiergic[All Fields] OR cannabinodiol[All Fields] OR cannabinoic[All Fields] OR cannabinoid[All Fields] OR cannabinoid/anandamide[All Fields] OR cannabinoid/cocaine[All Fields] OR cannabinoid/endocannabinoid[All Fields] OR cannabinoid/melanocortin[All Fields] OR cannabinoid/metabotropic[All Fields] OR cannabinoid/opioid[All Fields] OR cannabinoid/vanilloid[All Fields] OR cannabinoid'[All Fields] OR cannabinoid's[All Fields] OR cannabinoid1[All Fields] OR cannabinoid2[All Fields] OR cannabinoidagonisten[All Fields] OR cannabinoidbefunde[All Fields] OR cannabinoide[All Fields] OR cannabinoiden[All Fields] OR cannabinoider[All Fields] OR cannabinoidergic[All Fields] OR cannabinoidernas[All Fields] OR cannabinoides[All Fields] OR cannabinoidfuhrung[All Fields] OR cannabinoidgehalt[All Fields] OR cannabinoidhyperemesis[All Fields] OR cannabinoidi[All Fields] OR cannabinoidic[All Fields] OR cannabinoidiol[All Fields] OR cannabinoidkonzentrationen[All Fields] OR cannabinoidreceptorer[All Fields] OR cannabinoids[All Fields] OR cannabinoids/agonists[All Fields] OR cannabinoids/analysis[All Fields] OR cannabinoids/biosynthesis[All Fields] OR cannabinoids/blood[All Fields] OR cannabinoids/cannabimimetics[All Fields] OR cannabinoids/chemistry[All Fields] OR cannabinoids/classification[All Fields] OR cannabinoids/contraindications[All Fields] OR cannabinoids/economics[All Fields] OR cannabinoids/endocannabinoids[All Fields] OR cannabinoids/genetics[All Fields] OR cannabinoids/history[All Fields] OR cannabinoids/immunology[All Fields] OR cannabinoids/metabolism[All Fields] OR cannabinoids/pharmacokinetics[All Fields] OR cannabinoids/pharmacology[All Fields] OR cannabinoids/poisoning[All Fields] OR cannabinoids/secretion[All Fields] OR cannabinoids/toxicity[All Fields] OR cannabinoids/urine[All Fields] OR cannabinoids'[All Fields] OR cannabinoidsystem[All Fields] OR cannabinoidsystems[All Fields] OR cannabinol[All Fields] OR cannabinol/analysis[All Fields] OR cannabinol/biosynthesis[All Fields] OR cannabinol/blood[All Fields] OR cannabinol/chemistry[All Fields] OR

cannabinol/history[All Fields] OR cannabinol/immunology[All Fields] OR
cannabinol/metabolism[All Fields] OR cannabinol/pharmacokinetics[All Fields] OR
cannabinol/pharmacology[All Fields] OR cannabinol/poisoning[All Fields] OR
cannabinol/toxicity[All Fields] OR cannabinol/urine[All Fields] OR cannabinolate[All
Fields] OR cannabinold[All Fields] OR cannabinole[All Fields] OR cannabinolen[All
Fields] OR cannabinoles[All Fields] OR cannabinoli[All Fields] OR cannabinolic[All
Fields] OR cannabinoids[All Fields] OR cannabinomania[All Fields] OR
cannabinomimetic[All Fields] OR cannabinomimetics[All Fields] OR
cannabinomimetikum[All Fields] OR cannabinomodulatory[All Fields] OR
cannabinsids[All Fields] OR cannabinu[All Fields] OR cannabinum[All Fields] OR
cannabinus[All Fields] OR cannabio[All Fields] OR cannabiol[All Fields] OR
cannabionid[All Fields] OR cannabionoid[All Fields] OR cannabionoids[All Fields]
OR cannabiorci[All Fields] OR cannabiorcichromenic[All Fields] OR cannabiose[All
Fields] OR cannabiosis[All Fields] OR cannabique[All Fields] OR cannabiques[All
Fields] OR cannabiripsol[All Fields] OR cannabis[All Fields] OR
cannabis/addiction[All Fields] OR cannabis/alcohol[All Fields] OR
cannabis/amphetamine[All Fields] OR cannabis/analysis[All Fields] OR
cannabis/biosynthesis[All Fields] OR cannabis/blood[All Fields] OR
cannabis/cannabinoid[All Fields] OR cannabis/cannabinoids[All Fields] OR
cannabis/chemistry[All Fields] OR cannabis/classification[All Fields] OR
cannabis/cocaine[All Fields] OR cannabis/cytology[All Fields] OR
cannabis/determination[All Fields] OR cannabis/effects[All Fields] OR
cannabis/enzymology[All Fields] OR cannabis/genetics[All Fields] OR
cannabis/history[All Fields] OR cannabis/humulus[All Fields] OR
cannabis/immunology[All Fields] OR cannabis/indica[All Fields] OR
cannabis/injurious[All Fields] OR cannabis/kg[All Fields] OR cannabis/mandrax[All
Fields] OR cannabis/marijuana[All Fields] OR cannabis/metabolism[All Fields] OR
cannabis/methaqualone[All Fields] OR cannabis/methaqualone/tobacco[All Fields]
OR cannabis/microbiology[All Fields] OR cannabis/neuroleptics[All Fields] OR
cannabis/other[All Fields] OR cannabis/pharmacology[All Fields] OR
cannabis/physiology[All Fields] OR cannabis/poisoning[All Fields] OR

cannabis/psychosis[All Fields] OR cannabis/simulants[All Fields] OR
cannabis/standards[All Fields] OR cannabis/thc[All Fields] OR cannabis/therapy[All
Fields] OR cannabis/tobacco/methaqualone[All Fields] OR cannabis/toxicity[All
Fields] OR cannabis/toxicology[All Fields] OR cannabis/ultrastructure[All Fields]
OR cannabis/urine[All Fields] OR cannabis/virology[All Fields] OR cannabis'[All
Fields] OR cannabis's[All Fields] OR cannabisabhangigen[All Fields] OR
cannabisabhangigkeit[All Fields] OR cannabisabusus[All Fields] OR
cannabisambulanz[All Fields] OR cannabisativine[All Fields] OR
cannabisbezogene[All Fields] OR cannabisbol[All Fields] OR cannabisbruk[All
Fields] OR cannabisbruket[All Fields] OR cannabiscitrin[All Fields] OR
cannabisdrogen[All Fields] OR cannabiserlebnisse[All Fields] OR
cannabisforskning[All Fields] OR cannabisgebrauchenden[All Fields] OR
cannabisgebruik[All Fields] OR cannabisgeinduceerde[All Fields] OR
cannabisharz[All Fields] OR cannabisin[All Fields] OR cannabisinhaltstoffen[All
Fields] OR cannabisins[All Fields] OR cannabisintoksikation[All Fields] OR
cannabisis[All Fields] OR cannabiskonsum[All Fields] OR cannabiskonsums[All
Fields] OR cannabislike[All Fields] OR cannabism[All Fields] OR cannabisme[All
Fields] OR cannabismetabolitter[All Fields] OR cannabismisbrugere[All Fields] OR
cannabissmissbruk[All Fields] OR cannabissmissbruket[All Fields] OR
cannabisnaiven[All Fields] OR cannabisplanzen[All Fields] OR cannabispiran[All
Fields] OR cannabispiranol[All Fields] OR cannabispirenone[All Fields] OR
cannabispiro[All Fields] OR cannabispirol[All Fields] OR cannabispirone[All Fields]
OR cannabisproblemer[All Fields] OR cannabisproduken[All Fields] OR
cannabisprodukten[All Fields] OR cannabispsychosen[All Fields] OR
cannabispsykoser[All Fields] OR cannabisstoffene[All Fields] OR
cannabisstoffer[All Fields] OR cannabistilbene[All Fields] OR cannabistilbenes[All
Fields] OR cannabiswirkstoffe[All Fields] OR cannabitriol[All Fields] OR
cannabium[All Fields] OR cannabivarichromene[All Fields] OR cannabivarin[All
Fields] OR cannabivarins[All Fields] OR cannable[All Fields] OR cannabmimetic[All
Fields] OR cannaboid[All Fields] OR cannaboids[All Fields] OR cannabrava[All
Fields] OR cannaby[All Fields]) AND ("1"[PDAT] : "2009/12/31"[PDAT]) OR

("cannabinoids"[MeSH Terms] OR "cannabinoids"[All Fields]) AND ("1"[PDAT] : "2009/12/31"[PDAT]) OR ("endocannabinoids"[MeSH Terms] OR "endocannabinoids"[All Fields] OR "endocannabinoids"[Pharmacological Action]) AND ("1"[PDAT] : "2009/12/31"[PDAT]) OR ("receptors, cannabinoid"[MeSH Terms] OR ("receptors"[All Fields] AND "cannabinoid"[All Fields]) OR "cannabinoid receptors"[All Fields] OR ("cannabinoid"[All Fields] AND "receptors"[All Fields])) AND ("1"[PDAT] : "2009/12/31"[PDAT]))

3.4.2 EMBASE (BIDS online)

EMBASE é o nome comercial do banco de dados *Excerpta Medica*. Este banco de dados contém referências de 4700 jornais e revistas de 110 diferentes países, sendo 56% dessas publicações provenientes do continente europeu (Armstrong, 1993).

A estratégia de busca para o EMBASE foi a mesma utilizada para o MEDLINE.

- #1 'neoplasm'/exp
- #2 'tumor cell culture'/exp
- #3 'antineoplastic activity'/exp
- #4 'antineoplastic agent'/exp
- #5 'clinical protocol'
- #6 #1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5
- #7 'cannabis'/exp
- #8 'cannabinoid'/exp
- #9 'cannabinoid'/exp AND 'receptor'/exp
- #10 'endocannabinoid'/exp
- #11 'cannabis'/exp AND 'smoking'/exp
- #12 'cannabis'/exp AND derivative
- #13 #7 OR #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR #12
- #14 #6 AND #13

3.4.3 LILACS (BIREME, CD-ROM)

LILACS (Literatura Latino Americana em Ciência da Saúde) é composta basicamente por referências de jornais, livros, dissertações e teses publicadas em português, espanhol ou inglês, nos países das Américas do Sul, Central e Caribe (Armstrong, 1993).

Segue a estratégia de busca elaborada para o LILACS.

cannabis or cannab\$ or cannabinoids or endocannabinoids or cannabinoid receptors [Words] and neoplasms or neop\$ or canc\$ or cultured tumor cells or antineoplastic drugs or antimetabolic drugs or fatty acid synthesis inhibitors or cancer treatment protocol [Words]

3.4.4 COCHRANE CONTROLLED TRIALS REGISTER

O *Registro Cochrane dos Ensaio Clínicos Controlados* (CCTR) é um banco de dados com todas as referências bibliográficas dos ensaios clínicos identificados por membros da *Colaboração*, como parte de um esforço internacional de criar uma fonte de dados não tendenciosa para a realização de revisões sistemáticas. Esse banco de dados, atualmente com mais de 130.000 referências, tem como principal característica o resultado da pesquisa manual executada nos principais jornais em ciências da saúde.

Segue a estratégia de busca utilizada para o COCHRANE CONTROLLED TRIALS REGISTER.

((cannabis or cannabinoids or endocannabinoids or cannabinoid and receptors) and (neoplasms or cultured and tumor and cells or antineoplastic and drugs or antimetabolic and drugs or fatty and acid and synthesis and inhibitors))

3.5 Avaliação da Qualidade Metodológica

A avaliação da qualidade metodológica dos estudos clínicos é considerada de vital importância na condução de revisões sistemáticas e na busca da melhor evidência disponível do efeito terapêutico de uma intervenção. Os estudos clínicos controlados randomizados são considerados o meio mais confiável para avaliar o efeito de um tratamento (WHO, 1997).

A avaliação crítica de cada um dos ensaios clínicos a serem inseridos numa revisão sistemática é crucial para limitar potenciais vieses (*bias*) ou erros sistemáticos, para auxiliar nas possíveis comparações a serem realizadas e servir como guia na interpretação dos achados finais (Mulrow & Oxman, 1997). Isso se dá através da análise minuciosa dos processos de distribuição aleatória (randomização), além da verificação de como os indivíduos que deixaram o estudo antes do seu término foram tratados na análise estatística (*análise por intenção de tratar*). Em uma metanálise, o seguimento em duplo-cego e a análise por intenção de tratar são fundamentais para reduzir os chamados fatores de confusão no seguimento dos pacientes e na avaliação dos resultados.

No entanto, a presente revisão sistemática não encontrou estudos randomizados para os desfechos a que se propôs. O único estudo incluído sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides em humanos foi um estudo clínico piloto fase I/II. Todos os outros estudos incluídos foram experimentais. Desta forma, a qualidade metodológica apresentou-se intrínseca, pois houve a descrição detalhada, por parte dos autores, de todos os procedimentos experimentais realizados. Portanto, não foram utilizados os critérios de avaliação metodológica do Manual da Colaboração Cochrane (Mulrow & Oxman, 1997; Jadad et al., 1996) para a avaliação da qualidade metodológica.

Através dos critérios de inclusão, foram selecionados todos os estudos publicados que, com as devidas limitações inerentes aos estudos experimentais, forneceram o que se tem de evidência científica sobre estes desfechos atualmente. Pelos motivos expostos acima, não foi possível a realização de metanálise.

3.6 Medidas de Desfecho

Os seguintes desfechos foram avaliados:

3.6.1 Desfechos de Eficácia

- efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo*
- efeitos antiangiogênicos *in vitro* e *in vivo*
- efeitos antimetastáticos *in vitro* e *in vivo*

3.6.2 Segurança da administração dos canabinóides

- Segurança (seletividade) da administração dos canabinóides *in vitro*
- Segurança (seletividade) da administração dos canabinóides *in vivo*

3.7 Processo de Seleção dos Estudos

Através da estratégia de busca anteriormente mencionada, foram identificados 3920 artigos. Foi efetuada uma varredura através dos títulos destes artigos, no sentido de excluir aqueles que não se enquadravam nos objetivos desta revisão. A partir daí, 1268 resumos foram avaliados detalhadamente. Até esta etapa, a avaliação foi realizada por um revisor. Os artigos completos de estudos clínicos randomizados para possível inclusão nesta revisão foram avaliados por dois revisores independentes (co-revisor: Jair Guilherme Santos-Junior). Estes não estavam cegos para os nomes dos autores, instituições e jornais de publicação. Por fim, 199 artigos completos foram analisados. Salienta-se que foi realizada uma busca das referências bibliográficas de todos os artigos considerados importantes para esta revisão (artigos incluídos e revisões).

A avaliação foi feita de acordo com os critérios de inclusão. 117 artigos preencheram os critérios de inclusão nesta revisão, sendo que houve discordância entre os revisores sobre a inclusão de 3 artigos. Foi realizada então uma reunião de arbitragem com o orientador, em que se chegou a um consenso e estes três artigos foram incluídos.

3.8 Análise Estatística

Esta revisão sistemática não permitiu a realização de metanálise de estudos de eficácia. Isso porque não foram contemplados estudos clínicos metodologicamente adequados em humanos, bem como não houve comparação, em humanos, dos canabinóides com outras drogas antitumorais para análise de eficácia dos mesmos nos desfechos propostos. Em relação aos estudos em animais *in vivo*, houve estudos metodologicamente adequados, mas que não contemplaram comparações com outras drogas. Dessa forma, também não foi possível a realização de metanálise de estudos de eficácia *in vivo*.

3.9 Contato com os Autores

Não foi necessário o contato com os autores para esclarecimento dos dados de seus estudos.

3.10 Aspectos Éticos

O protocolo de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

RESULTADOS

4. RESULTADOS

De 3.920 artigos inicialmente identificados, 117 preencheram os critérios de inclusão para esta revisão. Exceto um estudo (Guzmán, 2006), que foi realizado em humanos num ensaio clínico piloto fase I/II (Guzmán, 2006), os demais artigos foram experimentais. A tabela de estudos incluídos apresenta 122 artigos. Vale ressaltar que, para fins didáticos, cinco artigos foram apresentados duas vezes, já que os mesmos avaliaram os efeitos de determinados canabinóides em diferentes modelos de células tumorais (End, 1977; Sánchez, 1998; Bari, 2005; Melck, 2000; Macarrone, 2000).

Quanto aos tipos tumorais nos quais foram avaliados a ação antitumoral dos canabinóides os estudos seguiram a seguinte distribuição: gliomas (30 artigos), neuroblastomas (6 artigos), feocromocitomas (4 artigos), próstata (8 artigos), mama (15 artigos), cérvix uterino (5 artigos), tireóide (5 artigos), pulmão (5 artigos), leucemias (17 artigos), pele (3 artigos), pâncreas (2 artigos), de origem hepática (5 artigos), colo-retais (11 artigos). Além disso, seis tumores foram incluídos com apenas um artigo: timoma, carcinoma epitelial oral, sarcoma de Kaposi, rhabdomyosarcoma, osteossarcoma e câncer gástrico. Neste caso, os mesmos foram inseridos apenas na 'tabela de estudos incluídos', não sendo portanto descritos na 'discussão' devido à ausência de necessidade para tal.

Finalmente, na tabela de estudos incluídos, bem como na seção 'discussão' foram descritos os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ação antitumoral dos canabinóides. Vale ressaltar que quando os pesquisadores realizaram experimentos mais específicos, a sequência dos eventos mediadores da ação antitumoral destes compostos foi descrita.

Resultados - Características dos estudos incluídos – tabela

Estudo	Métodos	Amostra Tumoral	Intervenções e Esquemas Terapêuticos	Desfechos	Mecanismos Celulares e Moleculares
			GLIOMAS		
End 1977	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6 do glioma de ratos	- delta-9-THC (1, 10, 100 µM) por 5 dias	Efeitos antiproliferativos	- morte das células com a dosagem máxima
Sánchez 1998a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6.9 do glioma; células U373 MG do astrocitoma humano	delta-9-THC (0.25-1 µM) por 4-5 dias	Efeitos antiproliferativos	- apoptose, não mediada pelo receptor CB1 - hidrólise da esfingomielina (aumento da ceramida) - seletividade
Galve-Roperh 2000	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- <i>in vitro</i> : cels C6.9 e C6.4 do glioma - <i>in vivo</i> : ratos com tumores estabelecidos marcados com células C6 do glioma (inj. intratumoral)	- <i>in vitro</i> : delta-9-THC (1 µM) por 5 dias - <i>in vivo</i> : ratos imunossuficientes: delta-9-THC 500-2500 µg; WIN 55,212-2 50-250 µg; ratos imunodeprimidos: delta-9-THC 500 µg; WIN 50 µg	Efeitos antitumorais <i>in vivo</i> e os mecanismos envolvidos	- morte celular tumoral <i>in vitro</i> (C6.9 apenas) - envolvimento dos receptores canabinóides CB1 e CB2 - acumulação de ceramida - ativação da ERK - <i>in vivo</i> : diminuição significativa dos tumores (C6.9) em relação controle

Retch 2001	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cultura de células C6 do glioma de ratos e U87 do glioma humano</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com células U87 do glioma humano</p>	<p>- <i>in vitro</i>: AJA (0-100 μM) X delta-8-THC (0-100 μM) em células C6 e U87</p> <p>- <i>in vivo</i>: AJA (0.1 mg/kg) X delta-8-THC (20 mg/kg) X controle, em ratos marcados com células U87</p>	Efeitos antitumorais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- ação citostática do AJA mediada pelo receptor CB2</p> <p>- ação do delta-8-THC mediada pelos receptores CB1 e CB2</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa dos tumores em relação ao controle; tolerância</p>
Jacobsson 2001	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6	- AEA, 2-AG, PEA, meAEA, JWH015, CP 55,940, WIN 55,212-2 (em concentrações de 0.01-10 μ M) por 4 dias	<p>- efeitos antiproliferativos</p> <p>- efeitos dos mecanismos receptores e da ceramida</p>	<p>- apoptose</p> <p>- mediação dos receptores CB e VR na apoptose induzida pelos canab. endógenos, ocorrendo o contrário com os canab. sintéticos.</p> <p>- estresse oxidativo e aumento do cálcio intracelular</p> <p>- possível mediação da ceramida</p>
Sánchez 2001a	Estudo experimental <i>in vivo</i>	<p>- biópsias obtidas de ratos imunodeficientes com gliomas (C6) marcados</p> <p>- biópsias obtidas de ratos imunodeficientes com gliomas marcados com células de astrocitomas humanos grau IV</p>	<p>- injeção intratumoral do JWH-133 (50 μg/dia) por período \leq8 dias vs veículo (controle) em ratos imunodeficientes marcados com células C6</p> <p>- injeção intratumoral de JWH-133 (50 μg/dia) por 25 dias vs veículo (controle) em ratos imunodeficientes marcados com células do astrocitoma humano grau IV</p>	<p>- regressão das células C6 do glioma <i>in vivo</i> pela ativação dos receptores CB2</p> <p>- regressão das células do astrocitoma humano <i>in vivo</i> pela ativação dos receptores CB2</p>	<p>- apoptose</p> <p>- síntese de ceramida <i>de novo</i> - ativação da ERK</p> <p>- mediação do receptor CB2</p> <p><i>in vivo</i>:</p> <p>- diminuição significativa dos tumores tratados com ambos os canabinóides em relação ao controle</p>

Gómez del Pulgar 2002a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6.9 e C6.4	- delta-9-THC (0.5 µM) por 5 dias	- avaliar o efeito tardio da ceramida e sua influência na modulação da ERK e da PKB	- apoptose nas células C6.9 (mas não C6.4) - mediação pela ativação da ERK e diminuição da PKB - mediação da ceramida <i>de novo</i> , que precedeu os eventos acima
Macarrone 2002b	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6	- SEA (0.1-1 µM), HU-210 (1 µM) por 24 e 48 hs	- avaliar a atividade da SEA nas células C6 do glioma	- SEA induziu apoptose - mediação pela ativação da cascata do araquidonato (elevação do cálcio intracelular e rompimento mitocondrial). - o óxido nítrico aumenta a apoptose pela SEA - HU-210 (1 µM) aumenta a síntese do óxido nítrico, e sua coincubação com a SEA dobrou a apoptose induzida pela mesma (0.1 µM)
Blázquez 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- células vasculares endoteliais - biópsias obtidas de tumores de ratos imunodefíc. Marcados com cels C6 - biópsias obtidas de tumores de ratos imunodefíc. marcados com cels de astrocitomas humanos grau IV	- <i>in vitro</i> : JWH-133 (25 nM), WIN 55,212-2 (25 nM), HU-210 (25 nM) e delta-9-THC (1 µM) por 18 h (avaliação migração) e 48 h (avaliação apoptose) - <i>in vivo</i> : inj. intratumoral do JWH-133 (50 µg/dia; ≤8 dias; cels C6) ou (50 µg/dia; 25 dias; cels astrocitoma humano grau IV) vs veículo em ratos imunodefíc. marcados com estas células	- avaliar os efeitos dos canabinóides na inibição da angiogênese tumoral	- efeito apoptótico e antimigratório pelo JWH-133 na vasculatura endotelial mediado pelo CB2 - efeito apoptótico e antimigratório pelo WIN na vasculatura endotelial mediado pelo CB1 e CB2 - efeito apoptótico dos canabinóides mediado pela ativação da ERK - <i>in vivo</i> : diminuição da expressão da VEGF, da Agn2 e da MMP2 pelo JWH nos tumores marcados com cels C6 e do astrocitoma grau IV

Fowler 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6 do glioma	- AEA (3, 5 μ M), meAEA (5, 10 μ M), 2-AG (IC ₅₀ =5.51 \pm 0.04), 1-AG (IC ₅₀ =5.73 \pm 0.06) por 4 dias	- comparar os efeitos do 2-AG com os do 1-AG - verificar se os fosfatos ester solúveis em água da AEA e da meAEA tem efeitos parecidos com os do 2-AG e 1-AG - determinar se compostos que aumentam o AA influenciam na prolif. celular	- 2-AG = 1-AG em potência antiproliferativa e mediação dos receptores CB e VR - aumento indireto do cálcio intracelular pela ação do 1-AG nos receptores vanilóides - AEA e meAEA também apresentaram efeitos antiprolif. - o aumento do AA não teve efeito na proliferação - OBS: identificação de um mecanismo foi impedido por uma larga variação inter-experimental na sensibilidade das células para os efeitos antiproliferativos do 1-AG e da AEA, o que reduz a utilização destas células para os efeitos antiproliferativos da AEA.
Massi 2004	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- <i>in vitro</i> : células U87 e U373 de gliomas humanos - <i>in vivo</i> : ratos com gliomas marcados com células U87	- <i>in vitro</i> : CBD (25 μ M) por 4 dias - <i>in vivo</i> : administração peritumoral de CBD (0.5 mg por rato, 1x/dia, 5 dias/sem; 23 dias) vs controle em ratos marcados com células U87	- efeito antitumoral do CBD <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- apoptose - medição do receptor CB2 - estresse oxidativo - <i>in vivo</i> : diminuição significativa do tumor <i>in vivo</i> em relação ao controle

Blázquez 2004	<p>- Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></p> <p>- Estudo clínico fase I/II</p>	<p>- <i>in vitro</i>: cels C6</p> <p>- biópsias obtidas de ratos imunodeficientes com gliomas (C6) marcados</p> <p>- biópsias obtidas de 2 pacientes com glioblastoma multiforme recorrente</p>	<p>- <i>in vitro</i>: WIN-55,212-2 (100 nM), anandamida (2 µM) e JWH-133 (100 nM) em cels C6 do glioma, obtidas de biópsias de ratos marcados com estas células</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. intratumoral de JWH-133 (50 µg/dia) e/ou funonisina (60 µg/dia), por 8 dias, em tumores estabelecidos de ratos imunodeficientes marcados com cels C6 (sc.)</p> <p>- Pac. 1: 48 anos; delta-9-THC (total de 24.5 mg; 19 dias); biópsia ocorrida após 19 dias do final do tratamento</p> <p>- Pac. 2: 57 anos; delta-9-THC (total de 13.5 mg; 16 dias); biópsia ocorrida após 43 dias do final do tto.</p>	efeito dos canabinóides na inibição do mecanismo do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)	<p>- efeito inibitório do mecanismo VEGF (VEGF e VEGFR-2), mediado pela ceramida, <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> e em humanos</p> <p>- envolvimento dos receptores CB1e CB2 (WIN 55,212-2) e pelo CB2 (JWH-133)</p>
Contassot 2004a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<p>- células tumorais humanas: U87 e U251</p> <p>- leucócitos humanos primários (controle)</p>	- AEA (3-100 µM) por 5 dias	- efeitos antitumorais da AEA e envolvimento dos mecanismos receptores	<p>- apoptose</p> <p>- mediação dos receptores VR1 (e não dos CBRs)</p> <p>- seletividade da ação antitumoral</p>

Hinz 2004a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células H4 do glioma humano	- meAEA (0,1-10 μ M), AEA (10 μ M) e delta-9-THC (10 μ M) por 24-72 hs	- investigar a possível relação entre a indução da expressão de COX-2 pela meAEA e seus efeitos na viabilidade celular	- apoptose induzida pelos três canabinóides - a apoptose pela meAEA ocorreu por mecanismo receptor-independente e foi mediado pela ceramida e pela ativação da COX-2 - o produto da meAEA (PGE2), induzido pela ativação da COX-2, também induziu apoptose - a apoptose pela AEA também foi mediada pela ativação da COX-2, não ocorrendo o mesmo com o THC
Vaccani 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células U87	CBD (0.01-9 μ M) em células U87 por 6 hs	Efeito anti-migratório do CBD	- efeito antimigratório, sem efeito na viabilidade celular - não houve mediação dos receptores canabinóides, vanilóide ou acoplados à proteína G
Goncharov 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	-células C6 do glioma	- delta-9-THC (0.5 e 2 μ M) sob estresse oxidativo (uso de quelante quinona) por curto período (90 min) e por longo período (72 hs) - delta-9-THC (0.5 e 2 μ M) sob stress oxidativo e contexto de ausência de glicose.	- avaliar o dano das células C6 sob stress oxidativo	- dano celular aumentado pelo maior tempo de exposição e pela ausência de glicose. - estresse oxidativo - diminuição da captação de glicose - efeito no dano celular mediado pelo CB1

McAllister 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células do GBM: U251-MG, U87-MG, U373-MG, SF126, SF188 - células normais da glia humana (controle)	- delta-9-THC (2 µM) vs WIN 55,212-2 (1.25 µM) vs controle por 7 dias em todas as linhas de células; e por 3 dias nas células SF126	- avaliar os efeitos antiproliferativos e de morte celular	- efeito antiproliferativo (diminuição das taxas de divisão celulares) e morte celular; THC > WIN - mediação parcial dos receptores CB1 e CB2 (verificados para as células SF126) - seletividade
Ellert- Miklaszewsk 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células C6	- WIN 55,212-2 (15 µM) por 48 hs	- avaliar a influência nos mecanismos P13K/Akt e Raf1/MEK/Erk - avaliar a influência na fosforilação da Bad	- apoptose - sequestro do ciclo celular na fase sub-G1 - infra-regulação da Akt e da ERK 1/2 - diminuição da fosforilação da Bad - diminuição do potencial da membrana mitocondrial - ativação da cascata de caspases - seletividade

Bari 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels C6 do glioma	- AEA (10 μ M) nas cels C6 por 48 hs - AEA + MCD	- investigar o efeito do MCD nas proteínas do sistema endocanabinóide e suas implicações na apoptose induzida pela AEA	- apoptose - diminuição da MAPK e PI3K - liberação citocromo c - efeitos mediados pelo VR1 e pela membrana do colesterol (ef. antagonista aditivo) - obs: CB1 não mediou os efeitos apoptóticos da AEA tendo, ao contrário, efeito sinérgico à AEA
Eichele 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células H4 do glioma humano	- meAEA (10 μ M) por 24 hs	- examinar o envolvimento da apoptose mitocondrial pela meAEA e o papel da COX-2 neste processo	- meAEA induziu apoptose mitocondrial - apoptose mediada pela ativação das caspases 9, 3 e PARP - mediação pelo aumento da COX-2, que precedeu os eventos acima
Massi 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células U87 - células normais da glia (controle)	- CBD (25 μ M) vs CBD (10 μ M) nos mecanismos bioquímicos ativados pelos mesmos	- investigar o envolvimento da ativação das caspases e da geração de ROS	- CBD (10 μ M) não induziu apoptose nem ativou os mec. bioq. descritos abaixo. - CBD (25 μ M): apoptose 'mitocondrial' e 'morte receptor' - estresse oxidativo - seletividade

Duntsch 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cultura de células U87 (principal); outras: U373, C6 e F98 (para comparação) - células normais da glia (controle) - <i>in vivo</i>: ratos marcados com células U87 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i> (3 dias): KM-233 (1-5 μM) vs controle; KM-133 (5 μM) vs delta-8-THC (5 μM); KM-133 (5 μM) vs BCNU (100-300 μM) - <i>in vivo</i>: KM-233 (2 mg/kg; 2x/d; 15 d) via intratumoral vs ip. em ratos marcados com cels U87 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> - avaliação da segurança da administração <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - citotoxicidade (não poptose): todas as cels Células U87: <ul style="list-style-type: none"> - potência: KM-233 = delta-8-THC > BCNU (300 μM) - efeito do KM-233 mediado pelos receptores CB2 - efeito do delta-8-THC mediado pelo CB1 e CB2 - segurança <i>in vitro</i> (até 10 μM) e <i>in vivo</i> (indep. via administ.) - <i>in vivo</i>: diminuição significativa do volume tumoral em relação ao controle
-----------------	--	--	--	---	---

Carracedo 2006a	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels C6.9, C6.4, U87, Gos3</p> <p>- <i>in vivo</i>: tumores de ratos marcados (U87)</p> <p>- humanos: biópsias de pac. com GBM tratados com delta-9-THC</p>	<p>- <i>in vitro</i>: delta-9-THC (0-3 μM) por 18 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: THC (15 mg/kg/dia; 14 dias) em ratos com tumores marcados com células U87MG</p> <p>- <i>in vivo</i>: THC (15 mg/kg/dia; 8 dias) em ratos com aumento de p8 e com diminuição de p8</p>	<p>- avaliar os mecanismos de sinais que mediam a apoptose induzida pelo delta-9-THC em células tumorais</p>	<p>- apoptose (exceção: C6.4)</p> <p>- seletividade</p> <p>- sequência de eventos <i>in vitro</i>: THC ativou os receptores CB1 e CB2 e induziu aumento da ceramida; ativação da p8 com consequente supra-regulação da ATF4 e TRB3 (e tb. CHOP nas cels U87); diminuição do potencial da membrana mitocondrial e ativação da caspase-3; apoptose.</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa do cresci/o dos tumores (U87); aumento da p8 mRNA e da TRB3; aumento de cels apoptóticas; efeitos também verificados nas cels com aumento de p8 (mas não nas cels com diminuição de p8)</p> <p>- biópsias humanas: apoptose e imunorreatividade à p8</p> <p>- obs: associação de doses submáximas de taspigargina (indutor de stress do retículo endoplasmático) ou cisplatina ou doxorubicina + THC reduziram a viabilidade das células U87MG de forma sinérgica.</p>
--------------------	--	---	--	--	--

Guzmán 2006	Estudo clínico piloto fase I	- 9 pac. com GBM recorrente que não tiveram sucesso com terapia padrão; KPS = 81; volume médio dos tumores = 64 cm ³	- administração intracranial de delta-9-THC (escalonamento de doses: 20-40 µg no dia 1, até 80-180 µg/dia), com início de 3-6 dias após cirurgia (0.3 ml/min); duração média de 15 dias de tratamento.	- segurança da administração intratumoral (por cateter) do delta- 9-THC - ação do delta-9- THC em relação à sobrevivência e vários parâmetros celulares do tumor	- <i>in vivo</i> (mat. extr. biópsias): delta- 9-THC inibiu a proliferação celular e induziu apoptose; mediação CBRs - delta-9-THC, <i>in vivo</i> , reduziu a proliferação celular do tumor (Ki67) em 2 pac. (1 e 2) - delta-9-THC tendeu a diminuir a vascularização do tumor (CD31) em 2 pac. (1 e 2), mas o efeito não foi estatisticamente significativo. - a administração do canabinóide foi segura e sem efeitos colaterais excessivos; não houve significantes alterações físicas, neurológicas, bioquímicas e hematológicas em nenhum dos pacientes. - a média de sobrevivência dos pacientes foi de 24 semanas (95% CI: 15-33 semanas); dois dos pacientes (3 e 8) sobreviveram por aproximadamente um ano.
----------------	------------------------------------	--	---	---	--

Galanti 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - células U251-MG do GBM - células U87-MG do GBM 	<ul style="list-style-type: none"> - delta-9-THC (0-50 µg/ml) por 24 hs e 48 hs 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar o efeito na viabilidade e proliferação celular - avaliar os efeitos envolvidos no ciclo celular 	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose - sequestro do ciclo celular na fase G0/1 - seletividade - diminuição da expressão da proteína E2F1 pela mediação do proteassoma - diminuição da ciclina A - aumento da p16INK4A
Massi 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: células U87 - <i>in vivo</i>: tumores excisionados de ratos marcados com células U87 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: CBD (10, 13, 16 µmol/L) nas células U87 por 24 hs - <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de CBD (0.5 mg/rato; 1x/d; 5d/sem; 23 d) vs veículo, em tumores estabelecidos de ratos marcados com cels U87 	<ul style="list-style-type: none"> - investigar se a 5-LOX e COX-2, assim como o sistema endógeno canabinóide, poderia ser modulado pelo CBD, de modo a limitar o crescimento do tumor. 	<ul style="list-style-type: none"> - efeito antiproliferativo (<i>in vitro</i>) e antitumoral (<i>in vivo</i>) - efeito antiproliferativo mediado pelo aumento da FAAH - o CBD regula o tom endógeno da AEA pelo aumento da FAAH e pela diminuição da AEA - os efeitos antiproliferativos e antitumorais ocorrem, pelo menos em parte pela modulação (e não pela mediação) do sistema LOX

Widmer 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células U373 - células de astrócitos primários	- delta-9-THC (5 ng/ml – 10 µg/ml), HU-210 (10 nM – 50 µM) por 24 hs	- avaliação dos efeitos antiproliferativos e dos mecanismos moleculares subjacentes	- THC e HU induziram apoptose nas células U373, mas com dosagens altas - mediação do receptor CB1 - ativação das caspases 3/7 - ambos os canabinóides induziram fosforilação da ERK e JNK1/2, mas os inibidores desta não antagonizaram os efeitos dos canabinóides - ação não seletiva dos canab.
Blázquez 2008a	- estudo experimental <i>in vitro e in vivo</i> - estudo clínico fase I	- <i>in vitro</i> : células C6.9, C6.4, SW1088, T98 G, U87 MG e U118 MG, GBM) - <i>in vivo</i> : biópsias de ratos com tumores marcados (C6.9 e C6.4) - biópsias de 2 pac. com GBM	- <i>in vitro</i> (24 hs): THC (1.5 µM) nas células C6.9, C6.4, SW1088, T98 G, U87 MG e U118 MG; THC (7 µM) nas céls. GBM - <i>in vivo</i> : adm peritumoral de THC (500 µg/dia), JWH-133 (50 µg/dia) e/ou fumonisina B1 (60 µg/dia) em ratos imunodeficientes marcados (C6.9 e C6.4) por 8 dias. - adm. intratumoral de THC em 2 pac. com GBM (pac. 1: total 1.46 mg THC, 30 d; pac. 2: total 1.29 mg THC, 26 d).	- avaliar os efeitos antiproliferativos e antimetastáticos do delta-9-THC - avaliar o efeito do THC na expressão do TIMP-1	- <i>in vitro</i> : diminuição da expressão do TIMP-1 nas células SW1088, T98 G, U87 MG e U118 MG (THC 1.5 µM); e nas células GBM (THC 7 µM) - <i>in vitro</i> : THC (1.5 µM) não diminuiu a viabilidade cels C6.9 em 24 hs - <i>in vitro</i> : THC (1.5 µM) diminuiu a migração das células C6.9 e U87 - efeitos <i>in vitro</i> pela mediação da ceramida e da p8 - <i>in vivo</i> : diminuição significativa do cresci/o tumores e do TIMP-1(C6.9, mas não C6.4) pelo THC e pelo JWH pela mediação da ceramida - em biópsias de humanos: diminuição da TIMP-1

Blázquez 2008b	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: células C6.9, C6.4, SW1088, T98G, U87MG, U118MG, normais da glia, HUVECs</p> <p>- <i>in vivo</i>: tumores de ratos marcados com células C6.9 e C6.4</p> <p>- biópsias de 2 pac. com GBM recorrente tratados com THC</p>	<p>- <i>in vitro</i> (24 hs): delta-9-THC (1.5 μM), AEA (5, 10 μM)</p> <p>- <i>in vivo</i> (8 dias): adm. peritumoral de delta-9-THC (500 μg/dia) ou JWH-133 (50 μg/dia) com/sem fumonisina B1 (60 μg/dia) vs controle, em ratos imunodeficientes com tumores (estabelecidos) marcados com células C6.9 e C6.4</p> <p>- humanos: biópsias de 2 pac. com GBM tratados com delta-9-THC (pac. 1 – dose total 1.46 mg 30 d.; pac. 2 – dose total 1.29 mg 26 d)</p>	- avaliar os efeitos dos canabinóides na expressão da matriz metaloproteinases (MMP) e seus efeitos na invasão tumoral	<p>- THC (<i>in vitro</i>): inibiu a invasividade nas cels C6.9 e U87 (mas não nas cels C6.4); diminuiu os níveis MMP-2 mRNA nas cels C6.9, U87, SW1088, T98G, U87MG e U118MG; medição pelos CBRs e pela ceramida e p8</p> <p>- THC (<i>in vitro</i>): não afetou significativamente a MMP-2 nas HUVECs</p> <p>- AEA (<i>in vitro</i>): inibiu a expressão da MMP-2 nas cels por mecanismo receptor-independente</p> <p>- <i>in vivo</i>: THC e JWH inibiram significati/e o crescimento dos tumores C6.9 (mas não dos C6.4) bem como os níveis MMP-2; efeitos mediados pela ceramida</p> <p>- humanos: biópsia de pac. com GBM mostraram níveis reduzidos de MMP-2</p>
----------------	--	---	---	--	---

Salazar 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: células U87MG, T98G, U373MG e células normais (astrócitos)</p> <p>- <i>in vivo</i>: tumores de ratos marcados (U87)</p> <p>- humanos: biópsias de 2 pac. com GBM tratados com THC</p>	<p>- <i>in vitro</i>: delta-9-THC (5 µM) por até 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de THC (15 mg/kg/dia; 14 dias) em ratos marcados com cels U87MG; cels U87 com aumento e com diminuição de p8; cels U87 com aumento e com diminuição de ATG5</p> <p>- humanos: biópsias de 2 pac. com GBM tratados com THC (pac. 1 – dose total 1.46 mg por 30 dias; pac. 2 – dose total 1.29 mg por 26 dias).</p>	<p>- avaliar os mecanismos do delta-9-THC na indução de morte celular nos gliomas</p>	<p>- <i>in vitro</i>: autofagia e estresse do retículo endoplasmático mediaram a apoptose induzida pelo THC</p> <p>- seletividade</p> <p>- sequência de eventos <i>in vitro</i>: THC ativou o receptor CB1 e induziu estresse do retículo endoplasmático; houve aumento da ceramida; aumento da fosforilação do eIF2α; supra-regulação da p8, com conseqüente supra-regulação da ATF4, CHOP e TRB3; inibição do mecanismo AKT/mTORC1; autofagia; ativação da caspase-3 e da Bax/Bak; apoptose</p> <p>- <i>in vivo</i>: THC diminuiu significativamente o crescimento dos tumores (U87) pelo mecanismo autofágico</p> <p>- análise dos tumores (U87): aumento da TRB3; diminuição da fosforilação da S6; formação de células com morfologia de autofagia; caspase-3 ativada</p> <p>- os efeitos acima foram verificados em tumores com alta qte de p8 e ATG5</p> <p>- biópsias humanas: aumento da TRB3 e diminuição da fosforilação da S6; aumento de cels autofágicas; caspase-3 ativada.</p>
--------------	--	---	--	---	--

			NEUROBLASTOMAS		
End 1977	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células NB2A do neuroblastoma de ratos	delta-9-THC (1, 10, 100 μ M) por 5 dias	Efeitos antiproliferativos	- morte das células com a dosagem máxima
Sánchez 1998a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células N18TG2 de neuroblastoma	delta-9-THC (0.25-1 μ M) por 4-5 dias	Efeitos antiproliferativos	- apoptose, não mediada pelo receptor CB1 - hidrólise da esfingomielina (aumento da ceramida) - seletividade
Macarrone 2000	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células CHP100 do neuroblastoma humano	- AEA (0.1-1 μ M), 2-AG (1.4 \pm 0.2 μ M), LEA (1.4 \pm 0.2 μ M), OEA (1.3 \pm 0.2 μ M) e PEA (1.4 \pm 0.2 μ M) por 72 hs	- investigar os efeitos antiproliferativos dos endocanabinóides, bem como a influência da degradação da AEA neste processo	- apoptose 'mitocondrial' induzida pela AEA, mas não pelos outros endocanabinóides - medição pelo VR (mas não pelos CBRs) - diminuição do potencial da membrana mitocondrial - mediação pela cascata de caspases - mediação pelo mecanismo da 5-LOX e COX

Movsesyan 2004	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels SH-SY5Y	- AEA (25-50 μ M), meAEA (50 μ M) por 24 hs	- efeito antitumoral <i>in vitro</i>	- apoptose - aumento do cálcio intracelular - diminuição do potencial da membrana mitocondrial - liberação de citocromo c - ativação da caspase-3 - efeitos mediados pela ativação da calpaína, que por sua, foi ativada pelo aumento de cálcio intracelular induzido pela AEA -obs: efeito não mediado pelo mec. de caspases intrínscos ou extrínscos
Bari 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels CHP100 do neuroblastoma	- AEA (1 μ M) nas cels CHP100 por 48 hs - AEA + MCD	- investigar o efeito do MCD nas proteínas do sistema endocanab. e suas implicações na apoptose induzida pela AEA	Células CHP100: - apoptose - liberação citocromo c - efeito mediado pelo VR1, mas não pela memb. do colesterol e nem pela MAPK e PI3K
Pasquariello 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células tumorais do neuroblastoma: SH-SY5Y, SK-NBE, LAN-5	- AEA (0-12 μ M), 2-AG (12 μ M) por 24 hs	- avaliação funcional do sistema endocanabinóide nestas células	- apoptose e supra-regulação da proteína BiP (e conseqüentemente de seus marcadores apoptóticos p53 e PUMA) pela AEA (mas não pelo 2-AG) nas células SH-SY5Y e LAN-5 (mas não nas cels SK-NBE) - AEA induziu ativação das MAPKs p38 e p42/44 precocemente à supra-regulação da BiP - eventos mediados pelo CB1

			FEOCROMOCITOMAS		
Sarker 2000	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células PC-12	- AEA (0.01-10 μ M) por 24 hs	- avaliar os efeitos da AEA nas cels PC-12 (feocromocitoma) de ratos	- apoptose (AEA: 10 μ M) - ativação da caspase 3 - efeitos mediados pelo CB1 e pelo mecanismo de estresse oxidativo
Erlandsson 2002	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels PC-12	- CP55,940 (2 μ M) por 15 hs	- avaliar se o fator de transcrição NF-kB regula a morte das cels PC12	- apoptose - aumento da atividade NF-kB, mas que não mediu os efeitos apoptóticos

Sarker 2003a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células PC-12	- AEA (2.5-20 μ M) por 18 hs	- avaliar os mecanismos moleculares subjacentes à apoptose induzida pela AEA	<p>Sequência eventos mediadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ativação da ASK1 (quinase reguladora sinais apoptose 1) - ativação da p38 MAPK e da JNK - translocação da Bad do citosol para a mitocôndria - liberação de citocromo c - ativação da caspase 3 e PARP - apoptose <p>- obs: efeitos não mediados pelos CBRs ou VR</p>
Sarker 2003b	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células PC-12	- AEA (10, 20 μ M) por 24 hs	- avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na morte celular induzida pela AEA	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose pela AEA, não mediada pelo VR1 nem pelo CB1 (CB1 apresentou efeito sinérgico à AEA) - mec. de transporte lipídico mediou os efeitos da AEA na geração de superóxido, na ativação da ASK1, na indução da ativação da p38 MAPK e da JNK, na liberação de citocromo c e na ativação da caspase 3

			PRÓSTATA		
Ruiz 1999	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células PC-3	- delta-9-THC (0-10 μ M). WIN 55,212-2 (0.5 e 1 μ M) por até 6 dias	- avaliar o efeito dos canabinóides na diminuição da viabilidade celular	- diminuição da viabilidade celular pelo THC (mas não pelo WIN) - apoptose - efeito mediado pelo CB1
Melck 2000	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels tumorais da próstata DU-145 (prolactina-sensitiva)	<i>in vitro</i> (3 dias): - AEA (0-1 μ M) - 2-AG (0-1 μ M) - meAEA (0-1 μ M) - PEA (0-1 μ M) - HU-210 (0-1 μ M)	- avaliar atv de qual mec. a AEA e o 2-AG inibem a prolif. celular induzida pela prolactina nas cels DU-145 - avaliar o envolvimento dos recep. canab.	- inibição potente do efeito proliferativo induzido pela PRL: AEA, 2-AG, HU-210 (meAEA menos potente que a AEA) - infra-regulação da PRK α pela AEA - efeitos mediados pelo CB1

Mimeaut 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels LNCaP, PC-3, DU-145	- AEA (1-10 μ M) nas cels DU-145 e PC-3 por 5 dias - AEA (2-20 μ M) nas cels LNCaP por 5 dias	- especificar os mec. moleculares responsáveis pelos ef. antiprolif. e apoptóticos da AEA nestas cels, estimuladas pelo EGF - avaliar o envolvimento dos CBRs	- efeito antiprolif. em todas as cels (de forma menos potente nas cels LNCaP) - apoptose (e secundariamente necrose) pela mediação do recep. CB1 e da ceramida - sequestro do ciclo celular na fase G1 - ef. da AEA potencializado pelo AM404 - diminuição dos níveis EGFR mediados pelos recep. CB1 e acoplados à prot. Gi/G0, e pela diminuição da PKA
Nithipatikon 2004	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels androgênio-independentes (PC-3 e DU-145); - cels androgênio-dependentes (LNCaP)	- 2-AG (1 μ M), noladina éter (10 μ M), WIN 55,212-2 (1-100 nM), meAEA (10-1000 nM) e SR141716 (10-500 nM) - MAFP (1 μ M) e MAFP (1 μ M) + SR141716 (500 nM)	- investigar o papel do 2-AG endógeno e dos CBRs na regulação da invasividade destas cels - verificar a diferença de mecanismo do 2-AG em diferentes células hormônio-refratárias	- 2-AG endógeno (e não o exógeno) diminuiu a invasivi// apenas das cels PC-3 e DU-145 - ef. imitados pela noladina-éter, meAEA e WIN - o bloqueio do metabolismo do 2-AG, pela MAPF, aumentou os ef. do 2-AG - ef. do 2-AG e noladina-éter mediados pelo CB1 e pela diminuição da PKA - obs: SR141716 não inibiu, mas aumentou a invasivi//

Sarfraz 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels : LNCaP (principal neste estudo) - cels prostáticas normais: PrEC, PZ- HPV-7	- WIN 55,212-2 (1-10 µM) por 24, 48 e 72 hs	- efeito do WIN 55,212-2 na inibição do crescimento celular da linha de células LNCaP (androgênio – dependente) e seus mecanismos	- diminuição da viabili// celular - apoptose - mediação pelo CB1 e CB2 - diminuição significativa na expressão da proteína PSA; diminuição dos níveis secretados de PSA - diminuição significativa da expressão da proteína do receptor androgênio; inibição dos níveis de mRNA do receptor androgênio - diminuição significativa na expressão da proteína do PCNA - diminuição da expressão da proteína VEGF - segurança
-----------------	---	--	--	---	--

Sarfaraz 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - células LNCaP (androgênio-dependente) - células PC-3 (androgênio-independente) 	<ul style="list-style-type: none"> - WIN 55,212-2 (1-10 μM) nas células LNCaP por 24 hs vs controle - WIN 55,212-2 (5-30 μM) nas células PC-3 por 24 hs vs controle 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar os mec. envolvidos na diminuição do crescimento das células LNCaP tratadas com WIN 55,212-2 	<p>WIN 55,212-2 (nas cels LNCaP e PC-3):</p> <ul style="list-style-type: none"> - apoptose e sequestro do ciclo celular na fase G0/G1; mediados pelos CBRs e pela supra-regulação sustentada da ERK 1/2 e inibição da PI3k/Akt - supra-regulação das caspases 9 (iniciadoras) e 3, 6, 7 (efetoras) e concomitante clivagem da poli(ADP-ribose) polimerases - aumento na proporção Bax/Bcl-2 de modo a favorecer a apoptose - indução da p53 e p27/KIP1 - infra-regulação das ciclinas D1, D2, E - diminuição da expressão das cdk-2, cdk-4 e cdk-6 - diminuição da expressão da proteína pRb - infra-regulação da E2F (E2F1, E2F2, E2F3, E2F4) - diminuição da expressão da proteína da DP1 e DP2
------------------	---	---	---	---	--

Olea-Herrero 2009a	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: cels PC-3, DU-145 e LNCaP - <i>in vivo</i>: ratos com tumores estabelecidos marcados (PC-3) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: meAEA (0-25 μM), JWH-015 (0-25 μM) por 48 hs - <i>in vivo</i>: adm. sc. de JWH-015 (0.15 mg/kg/rato) vs JWH-015 (0.15 mg/kg/rato) + SR144528 (0.15 mg/kg/rato) vs controle, por 14 dias em ratos com tumores marcados (PC-3) 	<ul style="list-style-type: none"> - investigar o papel do receptor CB2 na ação antiproliferativa dos canabinóides e a transmissão de sinais pela ligação a este receptor 	<ul style="list-style-type: none"> - diminuição da viabilidade das três células testadas Células PC-3: <ul style="list-style-type: none"> - apoptose (e necrose, secundariamente) - sequestro do ciclo celular na fase sub-G1 - efeitos mediados pelo CB2 - ef. mediados pela acumulação da ceramida de novo - indução da fosfo-JNK e fosfo-p38 - infra-regulação Akt-mTOR - indução de aumento da eIF2α - apoptose 'mitocondrial': ativação da caspase 9 e liberação de citocromo c - <i>in vivo</i>: diminuição significativa do cresci/o tumoral bem como do peso e do volume do mesmo; ef. mediados pelo CB2.
Olea-Herrero 2009b	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células PC-3	- meAEA (0-20 μ M) por 48 hs	<ul style="list-style-type: none"> - investigar os efeitos da meAEA na secreção de IL-6 pelas cels PC-3 e explorar os mecanismos envolvidos 	<ul style="list-style-type: none"> - diminuição viabilidade das cels PC-3; mediada pelo receptor CB2 e acúmulo de ceramida de novo - indução de secreção de IL-6 pelas cels PC-3; mediada pelo CB2 e pela fosforilação da ceramida (papel da CERK)

			MAMA		
De Petrocellis 1998	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células MCF-7 - células EFM-19	<i>In vitro</i> (6 dias): - AEA (0-10 μ M) - AEA (0-10 μ M) + araquidonoiltrifluorometilquetona (5 μ M) - meAEA (0-5 μ M) - 2-AG (0-10 μ M) - PEA (0-10 μ M) - HU-210 (0-10 μ M) - AA (0-10 μ M)	- investigar a possível ação antimitogênica da AEA e de outros compostos canabimiméticos nas células MCF-7 e EFM-19	- efeito antiproliferativo da AEA, meAEA, 2-AG e HU-210 (PEA e AA menos efetivos) - araquidonoiltrifluorometilquetona (inibidor da enzima FAAH) potencializou efeitos da AEA - AEA: - sequestro do ciclo celular na fase S mediado pela prolactina mAb (não apoptose, não citotoxicidade) - efeito mediado pelo CB1 - efeito mediado pela inibição do receptor da prolactina - diminuição dos níveis da prot. brca1 (mediado pelo CB1)
Bisogno 1998	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células EFM-19 (carcinoma de mama humano)	- AEA (0.5-2 μ M); OEA (0.5-10 μ M); - AEA (0.5-2 μ M) + OEA (0.5 μ M); PEA (dados não mostrados)	- avaliar os efeitos antiproliferativos da AEA, Oleamida e PEA nas células EFM-19	- efeito citostático pela AEA e OEA mediados pelo CB1 (PEA sem ef. antiprolif.) - efeito da OEA mediado pela AEA - efeito potencializador da OEA nos ef. antiprolif. da AEA (OEA diminuiu a hidrólise da AEA)

Melck 1999	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células MCF-7 - células EFM-19	- AEA (0-25 μ M); HU-210 (2.5 μ M) por 48 hs	- investigar o envolvimento do mecanismo cAMP/PKA e Raf-1/MAPK na inibição da proliferação das células cancerígenas de mama humanas e os níveis de PRLr/trk pela AEA	- efeito citostático pela AEA e pelo HU-210 AEA: - inibiu a formação de cAMP (mediado pela inibição da forskolina) e aumentou a atividade MAPK e a translocação da Raf-1, com consequente infra-regulação dos níveis PRLr/trk e supressão da prolif. celular. - efeitos mediados pelo CB1 - efeitos potencializados pela OEA e pelos inibidores da hidrólise da AEA
Melck 2000	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células EFM-19, MCF-7, T-47D	- AEA (0-5 μ M) - 2-AG (0-5 μ M) - meAEA (0-5 μ M) - PEA (0-5 μ M) - HU-210 (0-5 μ M) (todos por 4 dias)	- avaliar através de qual mecanismo a AEA e o 2-AG inibem a proliferação celular induzida pelo NFG nas células tumorais de mama; - avaliar se os recep. canabinóides estão envolvidos nos ef. antiprolif. dos canab.	- inibição do ef. proliferativo induzido pelo NGF: AEA, 2-AG, meAEA, HU-210 (mas não o PEA) - suprimiu a expressão de trk nas cels tratadas com NGF: AEA, meAEA, HU-210 (mas não o PEA) - ef. do HU-210 mediados pelo CB1; ef. da AEA mediados pelo CB1 e VR1

Di Marzo 2001	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células tumorais de mama: MCF-7, EFM-19, T-47D	- PEA (1-10 μ M) - AEA (0.1-1 μ M) - HU-210 (0.5-10 μ M) por 48 hs	- investigar se a PEA aumenta o efeito antiproliferativo da AEA nas células MCF-7 e os mecanismos envolvidos	- efeitos antiproliferativos (citostáticos) pela AEA e pelo HU-210 (mas não pela PEA) - PEA potencializou (não mediado pelo CB2) os ef. antiprolif. da AEA nas células basais (MCF-7, EFM-19, T47D) e nas induzidas pelo NGF (MCF-7), em parte pela inibição da FAAH - PEA tb. apresenta efeito sinérgico (não mediado pelo CB2) com o HU-210 (mas de forma menos potente)
Caffarel 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células EVSA-T (principal), SKBr3, MDA-MB-468, MDA-MB-231, MCF-7, T-47D	- delta-9-THC (1-12 μ M) por 72 hs	- avaliar o efeito do delta-9-THC no ciclo celular e o mecanismo de ação canabinoide neste processo	- apoptose, principalmente das cels mais agressivas - segurança - células EVSA-T: - ativação da caspase 3 (apoptose) - sequestro do ciclo celular na fase G2-M - diminuição dos níveis totais de Cdc2 (p34, ciclina dependente de quinase 1) - proporção de Cdc2 inativa/ativa foi aumentada - aumento dos níveis da p21 - aumento dos níveis da proteína Wee1 e diminuição dos níveis da proteína Cdc25C - diminuição dos níveis de survivina - efeitos mediados pelo CB2

Ligresti 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels MDA-MB-231, MCF-7</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores (inoculação de células MDA-MB-231 ou KiMol)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com metástases de pulmão (inoculação de células MDA-MB-231)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: CBD (principalmente), canabigerol, canabicromo, ácido canabidiol, ácido THC; extratos da Cannabis sativa (enriquecido tanto com canabidiol ou THC) vs canabinóides puros</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. Intratumoral (2x/sem; 20 dias) de CBD (5 mg/kg) vs CBD + extratos Cannabis (6.5 mg/kg, que contém 5mg/kg de canabidiol) em dois modelos de ratos inoculados com células MDA-MB-231 ou KiMol.</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. Intratumoral (2x/sem; 20 dias) de THC (5 mg/kg) vs THC + extratos Cannabis (6.5 mg/kg, que contém 5mg/kg de THC) em dois modelos de ratos inoculados com células MDA-MB-231 ou KiMol.</p> <p>- <i>in vivo</i> (a cada 72 hs; 21 dias): CBD (5 mg/kg) vs CBD + extratos de Cannabis (6.5 mg/kg, que contém 5 mg/kg de CBD) vs veículo em metástases provenientes cels MDA-MB-231</p>	- investigar as atividades antitumorais dos canabinóides e dos extratos da Cannabis.	<p>- <i>in vitro</i>: CBD (IC50 6-10.6 μM) foi o composto mais potente de todos</p> <p>- <i>in vitro</i>: CBD – segurança</p> <p>- CBD não apresentou modelo único de ação:</p> <p>- nas cels MDA-MB-231: apoptose, mediada pela caspase 3, ativação direta ou indireta dos recept CB2 e VR1, elevação intracelular de cálcio atv. mec. receptor-independ. CB/VR e formação de ROS.</p> <p>- nas cels MCF-7: sequestro do ciclo celular na fase G1/S</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa do crescimento dos tumores marcados com cels MDA-MB-231 e KiMol) em relação ao controle (efeitos verificados apenas pelo tto. com CBD ou CBD + extratos cannabis</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição das metástases de pulmão (proveniente de tumor primário de mama)</p>
---------------	--	--	---	--	---

Sarnataro 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: - células MDA-MB-231 (principal), MCF-7, T47D</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com células MDA-MB-231</p>	<p>- <i>in vitro</i>: rimonabanto (0.1-1 μM) por 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. de rimonabanto (0.7 mg/kg/dose; a cada 72 hs; 20 dias) em ratos com tumores marcados com cels MDA-MB-231 vs controle</p>	<p>- avaliar os efeitos antiproliferativos do rimonabanto nas células MDA-MB-231 (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>) e seus mecanismos de ação.</p>	<p>- efeitos antiproliferativos (não apoptose nem necrose), principal/ nas cels mais agressivas</p> <p>- sequestro do ciclo celular na fase G1/S: diminuição da expressão das ciclinas D e E, e aumento dos níveis da p27KIP1</p> <p>- medição pelo receptor CB1 e pelo mec. de transporte lipídico</p> <p>- efeitos depend. das doses do rimonabanto, dos níveis de expressão do receptor CB1 e da integridade da membrana de transporte lipídico</p> <p>- segurança</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa do volume dos tumores</p>
Laezza 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels MDA-MB-231	- Met-F-AEA (10 μ M) por 24 hs.	- determinar os mecanismos subjacentes aos efeitos antiproliferativos da AEA nas células tumorais altamente invasivas da mama.	<p>- efeito antiproliferativo</p> <p>- sequestro ciclo celular na fase S</p> <p>- efeitos mediados pelo CB1</p> <p>- indução da fosforilação da Chk1, com consequente diminuição da Cdc25A (evento precoce)</p> <p>- aumento nos níveis das proteínas p27KIP1 e p21WAF</p> <p>- diminuição das ciclinas A e E (com consequente inibição da Cdk2)</p> <p>- hipofosforilação da pRB, inclusive no resíduo S780</p>

Grimaldi 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vivo</i>: cels humanas (MDA-MB-231, T47D) e cels de camundongo (TSA-E1)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com metástases pulmão (tumor primário: mama – TSA-E1)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: Met-F-AEA (2.5-20 μM) por 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. de met-F-AEA (0.5 mg/kg/dose; a cada 72 hs; 21 dias) em ratos com metástases de pulmão vs Met-F-AEA + SR141716 (0.7 mg/kg/dose) vs controle.</p>	<p>- investigar os efeitos da Met-F-AEA e os mecanismos envolvidos na invasividade e na capacidade de provocar metástases</p>	<p>- efeito antiproliferativo, de forma mais potente nas cels mais agressivas (MDA-MB-231, TSA-E1)</p> <p>- diminuição significativa da fosforilação da FAK e da Src nas células MDA-MB-231</p> <p>- diminuição signicante da adesão e da migração ao colágeno tipo IV nas cels TSA-E1 e MDA-MB-231</p> <p>- efeitos mediados pelo CB1</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa do número e dimensão dos nódulos de metástases; ef. mediado pelo CB1</p>
McAllister 2007	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<p>- cels MDA-MB-231 (fenótipo mais agressivo)</p> <p>- cels MDA-MB-436</p>	<p>- CBD, CBG, delta-9-THC, CBN WIN 55,212-2, CP55,940 por 3 dias</p>	<p>- avaliar os mecanismos que poderiam explicar a ação inibitória do CBD nas metástases de câncer de mama.</p>	<p>- CBD: ativi// antiproliferativa mais potente em ambas as linhas de cels</p> <p>- CBD, THC e WIN 55,212-2 diminuíram significativamente a invasão das cels tumorais mais agressivas, MDA-MB-231 (CBD mais potente)</p> <p>- infra-regulação da proteína Id-1 e do mRNA Id-1 (e 434 bp) em ambas as linhas de cels (evento precoce aos outros efeitos)</p>

Von Bueren 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels MCF-7 - cels MCF7-AR1 (cels MCF7 com transferência de recep. androgênio)	- delta-9-THC por 6 dias	- avaliar se o THC possui atividade estrogênica ou androgênica	- THC diminuiu a viabilidade das cels MCF-7 (sem induzir citotoxicidade) - THC diminuiu prolif., induzida pelo β -estradiol, das cels MCF-7 (IC50=0.26 μ M) e MCF7-AR1 (IC50= IC50 = 0.09 μ M) - efeito através de mecanismo independente dos receptores androgênicos ou estrogênicos
Laezza 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels MDA-MB-231	- Met-F-AEA (10 μ M), em meio de cultura livre de soro, por 24 hs.	- investigar os mec. moleculares do potencial antimetastático Met-F-AEA pelo estudo do efeito deste no agonista CB1, na atividade RHOA e organização da actina.	- efeito antimigratório pela infra-regulação do mecanismo RHOA-ROCK, mediado pelo receptor CB1: - diminuição dos níveis GTP-RHOA - acúmulo de RHOA no citosol - afetou a atividade RND1/2/3, - reorganização citoesqueleto da actina, diminuindo as fibras de stress da mesma
Caffarel 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels EVSA-T - cels epiteliais mamárias humanas (controle)	- delta-9-THC (3 e 5 μ M) por 8 e 24 hs	- avaliar os mecanismos dos efeitos antiproliferativos do delta-9-THC nas células tumorais da mama EVSA-T	- efeito antiprolif. (sequestro ciclo celular) mediado pela supra-regulação do gene JunD - aumento gene Tes relacionado ao aumento gene JunD - supra-regulação da p27 mRNA e da Cdkn1B - infra-regulação da Cdc2 - obs: supra-regulação da p8 independente do aumento JunD

Qamri 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels MDA-MB-231 e MDA-MB-468</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos imunodef. com tumores marcados com cels MDA-MB-231</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos imunodef. com metástases de pulmão (oriundas de tumor primário de mama - cels MDA-MB-231)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos PyMT</p>	<p>- <i>in vitro</i>: WIN 55,212-2 (10 μM) ou JWH-133 (10 μM/L) vs veículo, por 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de (JWH-133) ou (JWH-133 + SR144528) ou (WIN 55,212-2) ou (WIN 55,212-2 + AM251) ou (WIN 55,212-2 + SR144528) ou (WIN 55,212-2 + AM251 + SR144528) (canab = 5 mg/kg/dia) versus veículo, em tumores estabelecidos de ratos imunodef. (CB-17) marcados com cels MDA-MB-231 (inoc. sc.), durante 4 semanas (avaliação cresci/o tumoral)</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. ip. JWH-133 ou JWH + SR ou WIN ou WIN + AM ou WIN + SR ou WIN + AM + SR (canab. = 5 mg/kg/dia) versus veículo, iniciada 24 hs após inoc. de cels MDA-MB-231 em veia periférica de ratos imunodefici.(CB-17), durante 4 semanas (avaliação metástases de pulmão)</p>	<p>- analisar os efeitos dos canabinóides sintéticos não psicoativos no crescimento e nas metástases de câncer de mama</p>	<p><i>in vitro</i> (ambos os canab. e cels):</p> <ul style="list-style-type: none"> - apoptose e sequestro do ciclo celular na fase G0-G1 - efeito antimigratório, mediado pelo receptor CB2 - diminuição atividade Cdc42 - diminuição expressão c-Fos e c-Jun - infra-regulação dos níveis COX-2/PGE2 <p><i>in vivo</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - diminuição significativa do volume dos tumores em relação ao controle; apoptose; efeitos mediados pelos CB1 e CB2 (WIN) e pelo CB2 (JWH) - diminuição significativa do número de metástases e do tamanho dos nódulos metastáticos em relação ao controle <p><i>in vivo</i> (ratos PyMT):</p> <ul style="list-style-type: none"> -latência no cresci/o tumores - diminuição cresci/o tumores - efeito antiproliferativo (diminuição significativa Ki67) - efeito antiangiogênico (diminuição significativa CD31)
------------	--	---	---	--	---

			TUMORES CÉRVIX UTERINO		
Mon 1981	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels HeLa S3	- delta-9-THC (5, 10, 15, 20, 40 μ M), delta-8-THC (1, 5, 10 μ M), 11-OH-delta-9-THC (5, 10, 15 μ M) e canabinol (5, 10, 15 μ M) por 24 e 48 hs	- avaliar a influência os canabinóides na proliferação das células tumorais humanas HeLa S3.	- efeito antiproliferativo
Contassot 2004b	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels Caski; HeLa; C299.	- AEA (3-100 μ M) por 5 dias	- analisar os efeitos da AEA nas linhas de células do carcinoma cervical	- apoptose - ativação da caspase 7 - efeitos mediados pelo VR1 - obs: CBRs, não só não mediarão a apoptose, como tiveram ef. sinérgico com a AEA
Rudolph 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels SW756 (carcinoma cervical) - cels LAD2 (mastócitos)	- 2-AG (10-100 nM) - WIN 55,212-2 (1-30 μ M)	.- determinar se as cels maduras LAD-2 poderiam regular a malignidade afetando o potencial migratório das linhas de cels SW756 do carcinoma cervical	- 2-AG (+ de 100 μ M PMSF) e WIN 55,212-2 inibiram a taxa de migração das cels SW756; efeito mediado pelo CB1 - 2-AG (100 nM) e WIN (30 μ M) inibiram o ef. estimulatório na taxa de migração das cels SW756, induzido pelas cels LAD2; ef. receptor-indep.

Ramer 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels HeLa (cérnix) - cels C33A (cérnix) - cels A549 (pulmão) 	<ul style="list-style-type: none"> - meAEA (0.1-10 μM) e delta-9-THC (0.01-1 μM) por 72 hs 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar os efeitos dos canab. meAEA e THC na invasividade das cels HeLa. 	<ul style="list-style-type: none"> - diminuição da invasão das cels HeLa, C33A e A549 através da Matrigel - ef. mediados CB1, CB2, VR1 meAEA), e pelos CB1 e CB2 (THC) - ambos os canab aumentaram a TIMP-1; mediação pelos CB1, CB2 e VR1 (meAEA), e pelos CB1 e CB2 (THC) - a supressão da invasão e o aumento do TIMP-1 foram mediados pela fosforilação das MAPKs p38 e p42/44; efeitos mediados pelos CB1 e CB2 (meAEA e THC) Observações: - ambos os canab. diminuíram MMP-2 (mec. recep-independ.) - a redução da invasivi// não foi relacionada à diminuição da migração - sob as condições exp. do ensaio para invasividade (alta densi// celular) não houve diminuição da viabili// pelos canabinóides
Eichele 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels HeLa (cérnix) - cels C33A (cérnix) - cels A549 (pulmão) 	<ul style="list-style-type: none"> - meAEA (10 μM) por até 72 hs 	<ul style="list-style-type: none"> - investigar o papel da COX-2 na apoptose suscitada pelo endocanab. meAEA nas cels HeLa. 	<ul style="list-style-type: none"> Sequência de eventos: - aumento da ceramida - ativação da COX-2 - formação de L-PGDS (PGD2) - ativação do PPARγ - apoptose - obs: mec. receptor-independ.

			TUMORES DA TIREÓIDE		
Bifulco 2001	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels KiMol (cels FRTL-5 transformadas pelo oncogene K-<i>ras</i>); cels FRTL-5 (epiteliais da tireóide de ratos: controle)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com cels KiMol</p>	<p>- <i>in vitro</i>: Met-F-AEA (10 μM) por 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de Met-F-AEA (0.5 mg/kg/dose; a cada 72 hs; 20 dias) vs Met-F-AEA (0.5 mg/kg/dose) + SR141716 (0.7 mg/kg/dose) vs controle, iniciada 2 dias depois da inoculação sc. de cels KiMol em ratos</p>	<p>- avaliar a ação da Met-F-AEA no crescimento celular dependente da oncogene K-<i>ras</i> (células KiMol)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: efeito antiproliferativo nas cels tumorais (não toxicidade ou apoptose); segurança; sequestro do ciclo celular na fase G0/G1</p> <p>- <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>: inibição significativa da atividade p21<i>ras</i>; efeitos mediados pelo CB1; potente supra-regulação do CB1</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa do peso tumoral em relação ao controle</p>

Portella 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels KiMol, TK6, MPTK-6 (metastáticas), FRTL-5 (normais:controle)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com cels KiMol</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com metástases de pulmão (inoculação de células 3LL)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: Met-F-AEA (10 µM) nas cels KiMol, por 24 hs</p> <p>- <i>in vitro</i>: Met-F-AEA (10 µM) vs veículo, 1x/d, nas cels TK-6 e MPTK-6, por 4 dias</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de Met-F-AEA (0.5 mg/kg por dose) vs Met-F-AEA (0.5 mg/kg por dose) + SR141716 (0.7 mg/kg/dose) vs controle, a cada 72 hs, 27 dias, em ratos com tumores (KiMol) estabelecidos.</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. ip. de Met-F-AEA (0.5 mg/kg/dose) vs Met-F-AEA (0.5 mg/kg/dose) + SR141716 (0.7 mg/kg/dose) vs controle; a cada 72 hs; 21 dias; iniciada após a inoculação de células 3LL</p>	<p>- avaliar o efeito da Met-F-AEA no crescimento tumoral, <i>in vivo</i>, no contexto em que o tumor já está estabelecido e crescendo</p> <p>- avaliar o efeito da Met-F-AEA nos processos angiogênicos e metastáticos</p>	<p>- <i>in vitro</i>: ef. antiproliferativo nas cels TK-6 e MPTK-6, de forma mais eficaz nestas últimas (mais agressivas)</p> <p>- supra-regulação CB1 e infra-regulação VEGFR, de forma mais eficaz nas cels MPTK-6</p> <p>- <i>in vivo</i> (KiMol): diminuição signif. dos tumores</p> <p>- <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (KiMol): diminuição VEGF e VEGFR1; aumento da p27KIP1; efeitos mediados pelo CB1</p> <p>- <i>in vivo</i> (3LL): diminuição signif. do volume e do número de nódulos metastáticos; efeito mediado pelo CB1</p>
---------------	--	--	--	---	--

Bifulco 2004	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cultura de cels KiMol</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com cels KiMol</p>	<p>- <i>in vitro</i>: Met-F-AEA, 2-AG, VDM11, AA-5-HT, arvanil por 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. sc. de veículo vs veículo + Met-F-AEA (0.5mg/kg/dose) ou 2-AG (5 mg/kg/dose) ou VDM-11 (5 mg/kg/dose) ou AA-5-HT (5 mg/kg/dose) ou arvanil (1 mg/kg por dose) vs veículo + SR141716 (0.7 mg/kg), 2x/sem por 5 sem, iniciada junto com a inoc. sc. de cels KiMol em ratos</p> <p>- <i>in vivo</i>: avaliação dos níveis de AEA e 2-AG em tumores de ratos retirados dos ratos tratados e não tratados.</p>	<p>- investigar os ef. dos inibidores da degradação dos canabinóides no crescimento de tumores de tireóide de ratos (KiMol), no intuito de investigar o possível ef. tônico dos endocanab. na proliferação celular <i>in vivo</i>.</p>	<p><i>in vitro</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - efeito antiproliferativo (não apoptótico) pelos compostos pesquisados - ef. Met-F-AEA e VDM-11 mediados pelo CB1; outros: não medição pelos CBRs <p><i>in vivo</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - todos os compostos induziram diminuição signifi/e do cresci/o tumoral; o tamanho dos tumores no final do experimento tb. foram menores que os dos controles (obs: Met-F-AEA foi mais eficaz que o 2-AG) - AA-5-HT induziu aumento signif. de AEA e 2-AG (tb. PEA e FAAH - menor extensão) - VDM-11 aumentou apenas os níveis do 2-AG - 2-AG endógeno mais eficaz que o exógeno (VDM-11 foi mais eficaz que o 2-AG exóg. em diminuir o cresci/o tumoral)
--------------	--	--	--	--	---

Pisanti 2007	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels tumorais KiMol; PAE (cels endoteliais de aorta de porco), HUVECs (cels endot. da veia umbilical humana)</p> <p>- modelos angiogênicos em segunda e terceira dimensões <i>in vitro</i></p> <p>- ensaio de membrana chick corioalantóicas (CAM) <i>in vivo</i>.</p>	<p>- Met-F-AEA (5-20 μM) nas PAE e HUVECs, com proliferação induzida pelo bFGF <i>in vitro</i>, por 24 hs</p> <p>- Met-F-AEA (10 μM) nas PAE, com formação de redes de capilares induzidas pelo bFGF, por 6 hs (modelo bidimensional <i>in vitro</i>)</p> <p>- Met-F-AEA (10 μM) nas HUVECs para verificação de atividade MMP</p> <p>- Met-F-AEA (10 μM) nas cels KiMol, por 24 hs (ensaios bi e tridimensionais <i>in vitro</i>)</p> <p>- Met-F-AEA (10 μM) <i>in vivo</i> (CAM)</p>	<p>- avaliar a atividade anti-angiogênica da Met-F-AEA e seus mecanismos moleculares</p>	<p>- apoptose das células endoteliais (PAE e HUVECs); efeito mediado pelo receptor CB1 e pela ativação da p38 MAPK</p> <p>- diminuição significativa da formação de redes de capilares nas PAE (redução significativa do número de intersecções de estruturas tubulares)</p> <p>- diminuição da atividade MMP-2 nas HUVECs; efeito mediado pelo receptor CB1</p> <p>- cels KiMol: inibição do processo de renovação da angiogênese, induzindo uma forte redução do número de novos vasos e também no tamanho médio dos mesmos.</p> <p>- <i>in vivo</i>: efeito antiangiogênico</p>
--------------	--	--	--	--	--

Shi 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels ARO (carcinoma anaplástico); cels ARO/IL-2; cels ARO/CB2</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com cels ARO ou ARO/CB2</p>	<p>- <i>in vitro</i> (24 hs):</p> <ul style="list-style-type: none"> - JWH-133 (2, 20 μM) - WIN 55,212-2 (1, 5 μM) - paclitaxel (quimioterápico, 15 μM) <p>- <i>in vivo</i>: adm. intratumoral diária de JWH-133 (50 μg/ml; 14 d) vs controle, em ratos com tumores estabelecidos marcados com cels ARO ou ARO/CB2 (sc.); tumores mensurados após 60 dias.</p>	<p>- investigar o efeito da expressão de CB2 na apoptose induzida pelo agonista canabinóide e a sensibilidade das cels ARO ao quimioterápico paclitaxel</p>	<p>- apoptose (procoada por ambos os canabinóides) em todas as cels (de forma significativamente maior nas cels ARO/IL-12 e ARO/CB2 que nas cels ARO)</p> <p>- as cels ARO/CB2 e ARO/IL-12 foram mais susceptíveis à apoptose induzida pelos canabinóides e pelo paclitaxel, comparada com as cels ARO</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa dos tumores ARO/CB2 em relação ao controle e aos tumores ARO.</p>
----------	--	---	---	---	--

			PULMÃO		
Munson 1975	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- <i>in vitro</i> : cels do adenomacarcinoma Lewis de pulmão - <i>in vivo</i> : ratos marcados com cels do adenocarcinoma Lewis de pulmão	- <i>in vitro</i> : delta-9-THC, delta-8-THC, CBN, CBD - <i>in vivo</i> : adm. oral de canabinóides (delta-9-THC: 25-100 mg/kg; delta-8-THC: 50-400 mg/kg; CBN: 100 mg/kg; CBD: 50-200 mg/kg) por 10 dias, com início 24 hs após a inoc. im. de cels Lewis de pulmão em ratos	- avaliar o efeito dos canabinóides nas cels tumorais e quais os possíveis sítios bioquímicos de ação	- evidência indireta de diminuição da síntese de RNA pelos canabinóides delta-9-THC, delta-8-THC e CBN <i>in vivo</i> : - inibição do cresci/o dos tumores pelos delta-9-THC, delta-8-THC e CBN (o CBD aumentou o cresc/o dos tumores) - aumento da sobrevida dos ratos foi verificada no tto. com delta-8-THC e com doses máximas de delta-9-THC - efeito de tolerância
Sarafian 2002a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels A549	- delta-9-THC (0-15 µg/ml) por 24 hs	- avaliar os efeitos de delta-9-THC no mecanismo mitocondrial das células tumorais A549 do pulmão	- diminuição da viabilidade celular - diminuição da reserva energética (ATP A549) e diminuição do potencial da membrana mitocondrial
Sarafian 2002b	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels A549	- THC (0-20 µM) por 24 hs - BHA (antioxidante): 10-200 µM + THC	- det. se o stress oxidat. contribui p/ a citotocixi// do THC	- THC: morte necrótica (IC50=16-18µM/ml) (mediado diminuição reserva energética); efeito aumentado pelo BHA (mec. não mediado estresse oxidativo)

Athanasίου 2007	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels H460	- AEA, delta-9-THC, HU-210 (todos com 100 µM) por 2 hs	- invest. ef. canab. cels H460 e se há relação c/ a modulação função mitocondrial	-apoptose (todos) - diminuição potencial da memb. mitocondrial e do consumo de O ₂ - mudanças bifásicas na atividade do complexo mitocondrial I e II/III
Preet 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	- <i>in vitro</i> : cels A549 e SW1573, - <i>in vivo</i> : ratos com tumores marcados com cels A549	- <i>in vitro</i> : delta-9-THC (1-20 µM) por 72 hs - <i>in vivo</i> : adm. peritumoral de delta-9-THC (5 mg/kg/dia; 21 dias) em ratos com tumores estabelecidos marcados (injeção sc.) com cels A549. - <i>in vivo</i> : adm. de delta-9-THC (5 mg/kg/dia; 28 dias), com início após 24 hs de injeção iv. de células A549 em ratos imunodeficientes – para verificação do crescimento de colônias tumorais pulmonares.	- caracterizar os efeitos do delta-9-THC no crescimento e metástase, induzidos pelo EGF, em câncer humano de pulmão que não são de pequenas células	<i>in vitro</i> : - inibição da prolif. e indução de apoptose em 72 hs (mas não com 24 hs) - inibição da migração e da invasão celular, estimulada pelo EGF - aumento da fosfo-FAK (sítio tirosina 397), induz. pelo EGF - inibição da fosfo-Akt - inibição da fosfo-ERK1/2 e JNK1/2, induzidas pelo EGF - diminuição VEGF <i>in vivo</i> (21 dias): - inibição signifi/e do cresci/o dos tumores já estabelecidos; segurança - diminuição da fosforilação da FAK, da ERK1/2 e da AKT. <i>in vivo</i> (28 dias): - diminuição significativa dos nódulos de metástases, bem como do peso (~50%) e do número de lesões (~60%) dos ratos

			LEUCEMIAS E LINFOMAS		
Rowley 1990	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels leucêmicas humanas: ML2 (LMA), HL60 (leucemia promielocítica) e K562 (LMC)	- delta-9-THC (0,001-10 μ M) por 6 dias	- avaliar o efeito do delta-9-THC na inibição do crescimento das células tumorais K562 e HL60.	- efeito antiproliferativo - THC ($\geq 1 \mu$ M): diminuição do conteúdo do cAMP nas cels ML2 em exp. de 10 min. - THC (0.1-10 μ M) diminuiu a atividade da adenil ciclase nas ces ML2 em exp. de 20 min.
Macarrone 2000	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels do linfoma humano: DAUDI e U937	- AEA (0.1-1 μ M), 2-AG ($1.4 \pm 0.2 \mu$ M), LEA ($1.4 \pm 0.2 \mu$ M), OEA ($1.3 \pm 0.2 \mu$ M) e PEA ($1.4 \pm 0.2 \mu$ M) por 72 hs	- investigar os efeitos antiproliferativos dos endocanabinóides, bem como a influência da degradação da AEA neste processo	- apoptose 'mitocondrial' induzida pela AEA, mas não pelos outros endocanabinóides - mediação pelo VR (mas não pelos CBRs) - diminuição do potencial da membrana mitocondrial - mediação pela cascata de caspases - mediação pelo mecanismo da 5-LOX e COX - obs: o antag. CB2R ou o AM404 não só não inibiram o efeito da AEA, como tiveram efeito sinérgico com a mesma

<p>McKallip 2002</p>	<p>Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></p>	<p><i>in vitro</i>: - células leucêmicas de camundongo murino (EL-4, LSA, P815) - células leucêmicas e de linfomas humanos (Jurkat, Mot-4, Sup-T1) <i>in vivo</i>: - ratos com tumores marcados com cels EL-4</p>	<p>- delta-9-THC (3 µM), HU-210 (3 µM), AEA (5 e 10 µM), WIN 55,212-2 (3 µM) nas cels EL-4 por 4 hs - delta-9-THC (2.5-10 µM), HU-210 (2.5-10 µM), AEA (5-40 µM) em cels Jurkat, Mot-4, Sup-T1 por 4 hs - JWH-015 (1-20 µM) nas cels Jurkat e Molt-4 por 24 hs - delta-9-THC (1, 5, 10 µM) em cels primárias da LLA (obtidas de 2 pacientes) por 2-24 hs - <i>in vivo</i>: adm. de delta-9-THC (1, 3 ou 5 mg/kg) nas cels EL-4 provenientes de fluido da cavidade peritoneal, um dia após a morte (10º dia) de ratos (EL-4) vs controle - <i>in vivo</i>: adm. intratumoral de delta-9-THC (5 mg/kg; 14 dias), iniciada um dia após a marcação tumoral, para avaliação de sobrevivência e cura dos ratos com tumores marcados com cels EL-4 vs controle; ratos com tumores que sobreviveram mais de 60 dias foram 'remarcados' e testados em relação às suas habilidades de rejeitarem o tumor.</p>	<p>- avaliar se os agonistas CB2 induzem apoptose em células imunológicas transformadas (tumoriais)</p>	<p>- diminuição da viabilidade celular e apoptose induzida por todos os canab. (à exceção do WIN) - efeitos mediados pelo CB2 - <i>in vivo</i>: diminuição da viabilidade tumoral e, a partir de 3 µM, apoptose - <i>in vivo</i>: aumento significante da sobrevivência dos ratos; 25% deles foram curados e apresentaram resistência à nova inoculação de células do mesmo tipo de tumor</p>
--------------------------	---	--	---	---	---

Gallily 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - células HL-60 - monócitos humanos normais 	<p>Todos experimentos - 24 hs:</p> <ul style="list-style-type: none"> - CBD (8 µg/ml) - CBD-DMH (15 µg/ml) - irradiação gama (500, 1000, 2000 cGy) - irradiação gama (800 cgy) + CBD (8 µg/ml) - irradiação gama (800 cgy) + CBD-DMH (15 µg/ml) 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar o efeito combinado da irradiação gama com CBD na apoptose das células HL-60 	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose (causada pelo CBD, CBD-DMH, irradiação gama); CBD > CBD-DMH - efeito sinérgico da irradiação gama com CBD ou CBD-DMH na apoptose - seletividade - ativação da caspase-3
Sancho 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels Jurkat - cels Jurkat “FADD dominante negativa” - cels T primárias (controle) 	<ul style="list-style-type: none"> - arvanil (análogo AEA): 1-25 µM por 6 hs 	<ul style="list-style-type: none"> - estudar os ef. apoptóticos do arvanil nas cels Jurkat e nas cels T primárias 	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose - mediação principal pela ativação da caspase 8 e pela FAAD - mediação secundária pelo mec. de estresse oxidativo - seletividade
Flygare 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels primárias do MCL (são cels B do linfoma não-Hodgkin: L144 e L102, obtidas de biópsias; - cels Rec-1 (tumoraes linfoma); - SK-MM2-2 (cels leucêmicas do plasma – controle) 	<ul style="list-style-type: none"> - AEA (5-10 µM), WIN 55,212-2 (5-10 µM) e SR141716 (0.1-10 µM), nas cels MCL por 24 hs - AEA (5 µM) + SR141716 (0.5 e 5 µM), nas células Rec-1, por 24 hs. - WIN 55,212-2 (1 e 10 µM) e SR141716 (0.1-10 µM), nas células Rec-1 por 8 dias 	<ul style="list-style-type: none"> - investigação dos efeitos do tratamento com agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides na viabilidade e crescimento das células MCL. 	<ul style="list-style-type: none"> - diminuição da viabilidade celular induzida pela AEA, pelo WIN e pelo SR141716 (≥ 1 µM) principal/e em meio de cultura com pouco soro; apoptose pela AEA e WIN na dosagem max. - AEA + SR (0.5 µM) = leve ef. antagoniz. da viabili// celular; AEA + SR (5 µM) = ef. aditivo na diminuição da viab. celular e apoptose nas cels Rec-1 - WIN apresentou ef. antiprolif. com 8 dias nas cels Rec-1; ef. imitado pelo SR141716 (mas com 10 µM) - apoptose nas cels Rec-1 pela AEA e pelo WIN mediada pelo CB1

Herrera 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células leucêmicas Jurkat	- delta-9-THC (1.5 µM) por 2 hs - JWH-133 (10 µM) por 2 hs	- investigar o possível envolvimento das MAPKs na apoptose das cels leucêmicas humanas induzidas pelo recep. CB2	- diminuição da viabilidade celular pelo THC e JWH - apoptose pelo THC Sequência de eventos (THC): - ativação do receptor CB2 - ativação da ERK JNK e p38 MAPK, mas somente esta última teve efeito mediador - diminuição do potencial da membrana mitocondrial - ativação das caspases 3 e 8 - liberação de citocromo c - apoptose
Powles 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células leucêmicas CEM (LMA) - células leucêmicas HEL-92 (leucemia eritroblástica) - células leucêmicas HL60 (leucemia promielocítica aguda) - células leucêmicas Molt-4 (LMA)	- delta-9-THC (0-100 µM), PEA (1-100 µM) por 48 hs versus controle (cels sanguíneas mononucleares periféricas)	- investigar o papel dos receptores canabinóides como mediadores da apoptose em linhas de células leucêmicas	- THC induziu apoptose e sequestro do ciclo celular na fase G1 (PEA s/ efeito), sem seletividade - mecanismo receptor-independente - THC induziu a fosforilação da ERK - THC induziu mudança no perfil dos genes compatível com diminuição do mecanismo MAPK - THC induziu infra-regulação das isoformas codificadas histona H1. - obs: THC não teve efeito sinérgico com a cisplatina

Lombard 2005	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels Jurkat normais - cels Jurkat deficientes em alguns mecanismos: defic. em FADD, defic. caspase-8, cels dominante-negativo caspase-9, cels com superexpressão de Bcl-2 	- delta-9-THC (10 µM) nas células testadas por 3 hs.	- analisar o mec. apoptótico induzido pelo delta-9-THC nas cels leucêmicas mutantes (com defeitos nos mecanismos intrínscos e extrínscos)	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose induzida pelo THC nas cels Jurkat 'normais' - apoptose nas cels FAAD-defic. e caspase-8-defic, embora em nível menor que as cels 'normais'; - as cels caspase 9-defic. foram as mais resistentes aos ef. apoptóticos do THC - as cels com superexp. Bcl-2 foram as mais resist. por 3 hs, mas mostrou um progressivo aumento após este período. - todas as cels sofreram perda do potencial da memb. mitoc. (evento precoce à ativ. das caspases) - células Jukat 'normais': - apoptose mitocondrial precoce - apoptose (mec. "morte-receptor" tardia, pela clivagem da Bid)
-----------------	---	--	--	---	--

Jia 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels Jurkat (principal linha de cels estudadas), Molt4, Sup1, Hut78	- delta-9-THC (10 μ M), por 12-24 hs, nas células Jurkat versus controle	- investigação dos mec. moleculares subjacentes à apoptose induzida pelo THC, com especificidade para o papel do mec. da MAPK.	<p>- apoptose</p> <p>- mediação dos recep. CB1, CB2 e acoplados à prot. G, aumento da proteína Bad, diminuição da fosforilação da Bad, infra-regulação da ERK</p> <p>Eventos induzidos pelo THC:</p> <p>- infra-regulação do eixo Raf-1, MEK 1/2, ERK 1/2 e RSK (Thr359/Ser363) com consequente translocação da Bad para a mitocôndria.</p> <p>- diminuição da fosforilação da Bad no sítio Ser112, mas não no sítio Ser136</p> <p>- diminuição da fosforilação da Akt; efeito sem relação com a diminuição da fosfo-Bad</p> <p>- ativação das pró-caspases 8, 9, 3, e de outros marcadores da apoptose (processamento do Bid, degradação da PARP, fragmentação do DNA) nas células Jurkat.</p> <p>- também houve marcante redução dos níveis da fosforilação da ERK 1/2 nas cels Molt4, Hut78 e SupT1</p>
----------	-------------------------------------	---	--	--	--

McKallip 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: cels EL-4 (camundongo) e cels Jurkat e Molt-4 (humanas) - <i>in vivo</i>: ratos marcados com células EL-4 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: CBD (1.25, 2.5, 5, 10 μM) nas cels EL-4 por 24 hs - <i>in vitro</i>: CBD (2.5 e 5 μM) nas cels Molt-4 e Jurkat por 24 hs - <i>in vivo</i>: fluido da cavidade peritoneal de ratos (EL-4) tratados com CBD (12.5 ou 25 mg/kg ip.) por 10 dias 	- avaliar o uso potencial do canabidiol na doença linfoblástica	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: diminuição da viabilidade celular e apoptose em todas as linhas de cels - efeitos mediados pelo CB2 - envolvi/o direto da mitoc.: perda do potencial mitocondrial e liberação do citocromo c - stress oxidativo: aumento da formação de ROS (efeito mediador) - aumento significativo nos níveis das NAD(P)H oxidases Nox4 e p22$phox$ (ef. mediador) - diminuição dos níveis da fosfo-p38 MAPK (mediado pelo ROS) - ativação da cascata de caspases: morte 'mitocondrial' e 'morte receptor' - <i>in vivo</i>: diminuição da viabili// e aumento significativo da apoptose
Bari 2006a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels do linfoma humano: DAUDI e U937	- AEA (10 μ M) por 48 hs	- investigar se os receptores CB2 são modulados pela metil- β -ciclodextrina (MCD)	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose - mediação pelo VR1 - mediação pelo transporte lipídico: MCD antagonizou os efeitos apoptóticos da AEA - obs: o antag. CB2R ou o inib. MAPK (PD98059) não só não inibiram o efeito da AEA, como tiveram efeito sinérgico com a mesma

Herrera 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels Jurkat	- delta-9-THC (1.5 µM) por 2 hs	- investigar o papel da síntese da ceramida <i>de novo</i> no mecanismo de apoptose induzida pelo receptor CB2	Sequência de eventos: - ativação do receptor CB2 - aumento ceramida <i>de novo</i> - diminuição do potencial da memb. mitocondrial e liberação do citocromo c - ativação das caspases 3/7 e 8, e clivagem da PARP - obs: mec. 'morte mitocondrial' é anterior ao mec. 'morte receptor' - apoptose
Gustafsson 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células primárias do MCL: L718, L1547, L1676 (obtidas de biópsias de pacientes) - cels do linfoma: Rec-1, Jeko, JVM-2 - cels B normais e cels tumorais U937 (cels controle)	- meAEA (10 µM), WIN 55,212-2 (10 µM), nas cels MCL por 4 hs	- esclarecer o papel de cada receptor canabinóide e delinear os mecanismos que levam à apoptose nas células MCL	Sequência de eventos MCL: - ativação dos receptores CB1 e CB2 - acumulação da ceramida <i>de novo</i> - ativação da p38 MAPK - perda do potencial da memb. mitocondrial - ativação da cascata de caspases - apoptose (e secundária/e necrose); sem afetar as cels controle - segurança (seletividade)

Gustafsson 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: painel de cels do linf. não-Hodgkin tipo B: Rec-1 do MCL, MEC1 e MEC2 do CLL, Raji e Namalwa do BL, SK-MM-2 (plasma), JEKO-1 do MCL</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados (cels JEKO-1 MCL)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: meAEA (10 μM) por 24 hs</p> <p>- <i>in vivo</i> (33 dias): adm. sc. meAEA (5 mg/kg; 12/12 hs) versus controle em ratos marcados (JEKO-1), iniciada 3 dias após a inoculação sc. das cels tumorais</p>	- efeitos antiproliferativos	<p>- meAEA induziu apoptose nas linhas cels MCL e CLL, mas não nas cels BL (que expressam baixos níveis de CB2) e cels SL-MM-2 (que expressam baixos níveis de CB1)</p> <p>- ativação da caspase 3</p> <p>- ef. mediados pelos CB1/CB2</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa dos tumores em relação ao grupo controle; os tumores apresentaram 25% de redução índice mitótico, mas sem diferença na apoptose.</p>
Liu 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels leucêmicas: CEM, HL60, MOLT4	<p>- delta-9-THC (0.3-30 μM) por 24 hs</p> <p>- quimioterápicos (QT): citarabina, doxorubicina, vincristina</p>	<p>- investigar a possível interação entre o delta-9-THC e agentes quimioterápicos estabelecidos</p> <p>- testar o conceito de que a redução do mecanismo MAPK pelo THC pode deixar as células tumorais mais susceptíveis à quimioterapia.</p>	<p>- apoptose induzida pelo THC</p> <p>- diminuição da fosfo-ERK</p> <p>- THC (1 μM), que não teve ef. na diminuição da viabilidade das cels CEM, mas que reduziu os níveis da fosfo-ERK, aumentou significativa/e os efeitos dos QT na diminuição da viabilidade celular (verificada pelas diminuições de seus valores de IC50).</p> <p>- importância da diminuição da ERK para a sensibilização, mediada pelo THC, dos ef. dos QT, foi confirmada em exp. com cels CEM mutantes.</p>

Gustafsson 2009a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels Rec-1 do MCL	- meAEA (10 µM), WIN 55,212-2 (10 µM) por 12-24 hs	- investigar o mecanismo da acumulação da ceramida nas células Rec-1 do MCL	- morte celular das cels Rec-1 - supra-regulação da CerS3 e da CerS6 em 2-2.6 vezes; ef. mediados pelo CB1 (ambas) e CB2 (CerS3) com conseqüente acumulação da ceramida de novo - aumento (2-3.5 vezes) de subespécies da ceramida; ef. mediados pelo CB1 (C16, C18 e C24 e pelo CB2 (C16 e C18) - ef. sobre o aumento de ceramida e sobre a morte celular foram potencializados pela supressão das enzimas (KS-1, GCS) que metabolizam a ceramida
---------------------	---	---------------------	--	--	--

			PELE		
Casanova 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels tumorais PDV.C57 e HaCa4; cels não tumorais MCA3D e HaCat (controle)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com cels PDV.C57</p>	<p>- <i>in vitro</i>: WIN 55,212-2, JWH-133 e HU-210 (todos com 25 nM), por 4 dias</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. de WIN 55,212-2 (1,580 µg) vs JWH-133 (1,580 µg) vs controle, em ratos com tumores estabelecidos marcados (PDV.C57), via bomba de fluxo, 0.52 µl/h, 11 dias, inserida em local próximo à inoculação das cels</p>	<p>- avaliar a utilidade dos canab. como terapia antitumoral em câncer de pele</p>	<p>- diminuição da viabilidade celular e apoptose (todos os CBs)</p> <p>- medição pelos CBRs</p> <p>- diminuição do EGF-R</p> <p>- seletividade</p> <p><i>in vivo</i> (ambos os canab.):</p> <p>- bloqueio signifi/o do cresci/o dos tumores e inibição da angiogênese</p> <p>- aumento nº cels apoptóticas</p> <p>- diminuição VEGF, PIGF e Ang2</p> <p>- perfil de vasos estreitos</p> <p>- infra-regulação EGF-R</p> <p>- efeitos mediados pelos CBRs</p>

Blázquez 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: cels melanoma: B16 (ratos), A375 e MelJuso (humanas); cels não tumorais: Melan-c (ratos) e Hermes 2b (human.) (controle) - <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados (B16) - <i>in vivo</i>: ratos com nódulos metastáticos de pumão e fígado (tumor primário pele – B16) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: - delta-9-THC (1-3 μM) e WIN 55,212-2 (100 nM), por 72 hs - <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de WIN (50 μg/dia) vs JWH-133 (50 μg/dia) vs veículo (controle), 8 dias, em ratos imunossuficientes e imunodeficientes (pesquisado somente com o WIN 55,212-2) marcados com cels B16 (sc.) após o tumores terem atingido média de 300 mm². - <i>in vivo</i>: adm. ip. WIN (50 μg/dia) vs veículo, a cada 3 dias, 21 dias (em ratos C57BL/6) ou durante 12 dias (ratos nús) em ratos com metástases de fígado e pulmão 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar a eficácia dos agonistas dos receptores canabinóides no câncer de pele (melanoma) 	<ul style="list-style-type: none"> <i>in vitro</i>: - diminuição da viabilidade celular e apoptose (todas) - sequestro do ciclo celular na transição G1-S (B16 e A375) - infra-regulação da fosfo-pRb (B16) - inibição da Akt (B16) - ativação da caspase 3 - seletividade <i>in vivo</i>: - diminuição marcante do cresci/o tumoral - diminuição da fosfo-pRb - aumento nº cels apoptóticas - diminuição da vascularização tumoral (densi// celular) - diminuição dos nódulos metastáticos de fígado e pulmão em ambos os modelos de ratos
Van Dross 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels JWF2 (CA escamoso) - cels HaCat 	<ul style="list-style-type: none"> - AEA (0.15-30 μM) e PEA (0.15-30 μM) por 24 hs 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar se produtos metabólicos da COX-2 contribui para a morte celular tumoral induzida pelo endocanab. 	<ul style="list-style-type: none"> - AEA (15-30 μM): apoptose das cels JWF2 (clivagem caspase-3 e PARP), mas não das cels HaCat (seletividade) - ef. mediados pelo catabolismo da atividade da COX-2 (PGs série D e J) - obs: PEA (30 μM): morte celular não apoptótica (JWF2), mas não nas cels HaCat

			TUMORES DO PÂNCREAS		
Fogli 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels MIA PaCa-2	<i>in vitro</i> (24-72 hs): - WIN 55,212-2 (0,01-100 µM) - ACEA (0,01-100 µM) - JWH-015 (0,01-100 µM) - AM251 (10 µM) - SR141716 (10 µM) - AM630 (10 µM) - 5-FU (droga quimioterápica usada como referência)	- investigar as atividades antitumorais dos canabinóides e o papel potencial de seus receptores nestas cels	- os compostos testados, à exceção do WIN e do SR1, induziram ef. antiprolif., principal/e em meio de cultura com pouco ou nenhum soro - O AM251 foi o canabinóide mais potente em comparação aos outros, funcionando com agonista inverso CB1. - AM251 (1 µM) + 5-FU (0.5-5 µM) demonstrou sinergismo na inibição da proliferação AM251 (10 µM): - apoptose mediada pela ativação das caspases 3/7 - modulação dos genes JAK-STAT e MAPK

Carracedo 2006b	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels MiaPaCa2; Panc1, Capan2, BxPc3</p> <p>- biópsias tumores pancreat. humanos</p> <p>- tecido normal do pâncreas</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos imunodeficientes com tumores marcados (MIA PaCa-2 via sc e via intra-pancreática)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: delta-9-THC (0-4 μM) por 66 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de THC (15 mg/kg/dose) vs JWH-133 (1.5 mg/kg/dose) vs veículo, por 15 dias, em tumores (já estabelecidos) de ratos imunodeficientes marcados com cels MiaPaCa-2 (sc.)</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. ip. 1x/d de WIN, 14 dias (1.5 mg/kg nos dias 1- 2; 2.25 mg/kg nos dias 3-4; 3 mg/kg nos dias 5-14) vs veículo, em ratos imunodefic. marcados com cels MiaPaCa-2 (via intra-pancreática)</p>	<p>- investigar as ações dos canabinóides no câncer de pâncreas (adenocarcinoma) e os seus mecanismos moleculares.</p>	<p>- diminuição da viabi// celular em todas as linhas de cels</p> <p>Sequência eventos (MiaPaCa2 e Panc1):</p> <ul style="list-style-type: none"> - ativação do receptor CB2 - acumulação de ceramida - aumento da p8 mRNA - aumento ATF-4 e TRB3 - ativação caspases 3/7 - apoptose <p>- <i>in vivo</i>: THC ou JWH-133 reduziram, de forma marcante, o crescimento de tumores pancreáticos já estabelecidos</p> <p>- <i>in vivo</i>: WIN 55,212-2 reduziu marcada/e o cresci/o dos tumores intra-pancreáticos bem como diminuiu significante/e a extensão de cels tumorais nos órgãos próximos e distantes; aumentou o n° de cels apoptóticas; aumentou a TRB3; selevidade (segurança)</p>
--------------------	--	---	---	--	--

			TUMORES DE ORIGEM HEPÁTICA		
Lee 2003a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels do hepatoma: HepG2	- AM251 (10 µM) por 5 dias	- investigar os ef. do AM251 (antagonista CB1) na viabilidade das cels HepG2	Sequencia de eventos: - ativação da AMPK - aumento fosfo-JNK (Thr172) - aumento da fosfo-ATF3 - diminuição viabilidade celular
Biswas 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels do hepatoma: HepG2 - hepatócitos 'normais'	- AEA (1-15 µM) por 24 hs	- avaliar os mecanismos do canabinóide AEA nas células HepG2 do hepatoma	- apoptose - sequestro do ciclo celular na fase G0/G1 - fosforilação de ambas p38 MAPK e JNK - infra-regulação da AKt/PKB - mec. receptor-independentes - ef. apoptótico mediado pela membrana do colesterol e, por consequência, pelo estresse oxidativo obs: AM404 não alterou a apoptose induzida pela AEA

DeMorrow 2007	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels Mz-ChA-1 (vesícula biliar), HuH-28 (ducto biliar intra-hepático), HuCC-T1 (duto biliar intra-hepático), SG231 (ducto biliar intra-hepático) - cels H69 (não tumorais – controle) 	- AEA (1 nM – 10 µM), 2-AG (1 nM – 10 µM) por 24, 48 e 72 hs	- avaliar os efeitos e os mecanismos de ação da AEA e do 2-AG no crescimento das células do colangiocarcinoma.	<ul style="list-style-type: none"> - AEA (10 µM) induziu ef. anti-prolif. nestas cels; já o 2-AG apresentou ef. estimulatório do crescimento celular - ef. receptor-independentes AEA (nas cels Mz-ChA-1): - apoptose - sequestro do ciclo celular - mediação pelo mec. de transporte lipídico e pelo aumento da ceramida - recrutamento da Fas e FasL para as frações do transp. lipídico da memb. plasmática - formação complexo 'morte-receptor'
DeMorrow 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: cels Mz-ChA-1 - <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com cels Mz-ChA-1 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: AEA (10 µM) por 24 hs - <i>in vivo</i>: adm. ip. de AEA (10 mg/kg/dia), 3 x/sem. vs veículo (controle) em ratos com tumores (estabelecidos) marcados (sc.) com cels Mz-ChA-1; estudo por 72 dias 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar os efeitos antiprolif. da AEA no colangiocarcinoma <i>in vivo</i> - determinar os ef. da AEA no mec. Wnt e avaliar o papel deste mecanismo no cresci/o celular do colangiocarcinoma. 	<ul style="list-style-type: none"> <i>in vitro</i>: efeitos antiprolif. (sequestro do ciclo celular) mediados pelo aumento da Wnt 5a e pela ativação do recep. órfão Ror2, com consequente aumento da fosfo-JNK <i>in vivo</i> (tto. prolongado): - diminuição signifi/e do cresci/o dos tumores a partir do 41° dia; - diminuição da área de necrose tumoral e aumento de fibrose; segurança - diminuição VEGF-C, VEGF-R2, VEGF-R3 - aumento da Wnt 5a mRNA e de sua imunorreatividade

Giuliano 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels do hepatoma: HepG2	- WIN 55,212-2 (1-10 μ M) por até 72 hs	- investigar se o canab. WIN induz apoptose nas cels HepG2 e avaliar se este efeito é dependente da modulação do PPAR γ	<ul style="list-style-type: none"> - apoptose - sequestro do ciclo celular na fase subG0/G1 <p>Sequência de eventos molec.:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ativação do CB2 - mec. de transp. lipídico - ativação do PPARγ - infra-regulação dos níveis de survivina, Hsp72 e fosfo-Akt, com consequente diminuição da fosfo-Bad (Ser136) - diminuição da Bcl-2 e Bcl-XL e aumento da Bax e Bcl-XS; - perda do potencial da memb. mitocondrial - mec. de 'morte mitocondrial' - clivagem da Bid para a sua forma ativa t-Bid e ativação pró-caspase 8 (mec. 'morte receptor') <p>- obs: houve aumento signifi/e da fosfo-p38 MAPK e fosfo-JNK, mas este evento não foi mediador</p>
------------------	---	------------------------------	--	--	--

			TUMORES COLO-RETAIS		
Ligresti 2003	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> - cels CaCo-2 e DLD-1 (obtidas de biópsias pac. com CA colo-retal - cels de biópsias de pólipos adenomatosos - cels de biópsias de mucosas saudáveis 	- AEA (0.1-10 μ M), 2-AG (0.1-10 μ M), HU-210 (0,001-0.1 μ M), por 5 dias	- avaliar os efeitos dos endocanab. e da inibição seletiva da inativação dos mesmos na proliferação das cels CaCo-2 e DLD-1	<ul style="list-style-type: none"> - efeitos antiproliferativos (não toxicidade, não apoptose), de forma mais potente nas cels CaCo-2 (mais invasivas) - HU-210 foi mais potente que os endocanab. - ef. dos endocanab. mediados pelo CB1 e pelo mecanismo da COX-2 - ef. do HU-210 mediados pelos CB1 e CB2 <p>Observações:</p> <ul style="list-style-type: none"> - todos os tecidos expressaram AEA, 2-AG, CBRs e FAAH - VDM11, VDM13 e AA-5-HT (todos: 10 μM) aumentaram os níveis dos endocanab. nas cels CaCo-2 e inibiram a prolif. das mesmas; mediação pelo CB1

Kogan 2004	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels Raji (linfoma), Jurkat (leucemia), SNB-19 (glioblastoma), MCF-7 (mama), DU-145 (próstata), NCI-H-226 (pulmão) e HT29 (cólón)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados (HT29)</p>	<p>- <i>in vitro</i> (3 dias) : HU-311 (CBD-quinona), CBN-quinona, delta-8-THC-quinona (todos: 0-25 µM)</p> <p>- <i>in vivo</i> (1): adm. ip. (3x/sem) de HU-311 (5 mg/kg) vs controle, iniciada a partir do 2º dia da inoc. sc. em ratos</p> <p>- <i>in vivo</i> (2): adm. sc. (3x/sem) de HU-331 (5 mg/kg) vs controle, iniciada a partir do 2º dia da inoc. sc. em ratos</p> <p>- <i>in vivo</i> (3): adm. intratumoral (3x/sem) de HU-331 (5 mg/kg) versus controle, iniciada a partir do 14º dia da inoc. sc. em ratos</p> <p>- <i>in vivo</i> (4): adm. ip. (3x/sem) de HU-331 (2.5 mg/kg) versus controle, iniciada a partir do 2º dia da inoc. sc. em ratos</p>	<p>- avaliar a atividade antineoplásica dos canabinóides-quinona <i>in vitro</i> e do CBD-quinona (HU-331) <i>in vivo</i></p>	<p>- HU-331 (CBD-quinona), CBN-quinona e delta-8-THC-quinona exibiram ef. inibitório das cels tumorais testados, sendo que o HU-331 foi o mais potente.</p> <p>- <i>in vivo</i>: diminuição significativa do cresci/o dos tumores, independente da via de administração</p>
------------	--	--	---	---	---

Joseph 2004	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- células SW 480	- AEA (40 nM) e HU-210 (10 nM) por 14 hs, para avaliação da migração de cels induzidas pela norepinefrina (10 µM)	- investigar o papel da AEA na migração de células tumorais (induzidas pela norepinefrina)	- AEA, por si só, não teve ef. na migração das cels SW480 - AEA e HU inibiram totalmente a migração das cels, induzidas pela norepinefrina - efeito mediado pelo CB1
Patsos 2005a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	cels CA colo-retal: - HT29 (exp. níveis moderados COX-2) - HCA7/C29 (exp. altos níveis COX-2) - SW480 (expressa baixos níveis COX-2)	- AEA (10 µM) por 72 hs - AEA (1, 10, 25 µM) versus AEA (1, 10, 25 µM) + NS398 (inib. selet. COX-2) por 6 dias	- avaliar se a AEA e as PG-EAs induzem morte em células do carcinoma colo-retal - avaliar se poderia ser utilizado altos níveis de COX-2 nestas cels para seus específicos alvos na morte celular pela AEA	- ef. antiproliferativo (não apoptótico) signifi/e nas cels HT29 e HCA7/C29 (mas não nas cels SW480) - efeito mediado pelo metab. da COX-2 - ef. potencializado pelo MAPF (inib. FAAH) - ef. caspase-independente - AEA: aumento signifi/e da produção total PGE2/PGE2-EA - PGE2-EA (1, 10 µM) e PGD2-EA (1, 10 µM) (mas não a PGF2α-EA), por 72 hs, inibiram A prolif. das cels HT29 e HCA7/C29 (mec. apoptótico)

Kogan 2006	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: BAECs e HUVECs</p> <p>- <i>ex vivo</i>: anél aórtico de ratos embebidos de colágeno na presença de VEGF ou FGF</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com tumores marcados com células HT29</p>	<p>- <i>in vitro</i>: BAECs (por 48 hs) e HUVECs (por 24 hs): HU-331, CBD, HU-336, delta-8-THC, HU-210, HU-335 (todos: 0.6-300 μM)</p> <p>- <i>ex vivo</i>: HU-331 (300 nM) por 5-7 dias</p> <p>- <i>in vivo</i>: adm. ip., iniciada 2 dias após a inoc. sc. em ratos, de veículo versus HU-331 (5 mg/kg; 3x/sem) versus doxorubicina (0.83 mg/kg; 3x/sem) por 35 dias.</p>	<p>- investigar a ação antiangiogênica dos derivados canabinóides quinonóides</p>	<p>- diminuição do crescimento das BAECs (todos, sendo o HU-331 o mais potente)</p> <p>- HU-311 (4.8 μM): apoptose das BAECs e HUVECs</p> <p>- HU-331 (HUVECs): aumentou os níveis mRNA da osteoprotegerina, MMP-1 e COX-2, e diminuiu os níveis mRNA chemotático monócito proteína-1, Von Willebrand factor (VWF) e fosfolipase A2.</p> <p>- HU-331 (300 nM): efeito antiangiogênico <i>ex vivo</i> – ação direta nas cels endoteliais</p> <p>- <i>in vivo</i>: HU-331 induziu a uma diminuição da densidade vascular (CD31), sendo este efeito não imitado pela doxorubicina</p>
Greenhough 2007	Estudo experimental <i>in vitro</i>	<p>- cels do CA coloretal: SW480, HCT-15, HT29, CaCo-2, HCT116, LS174T, SW620 (as três primeiras foram as + pesquisadas)</p>	<p>- delta-9-THC (2.5-12.5 μM) por 72 hs</p>	<p>- avaliar o efeito do delta-9-THC nas células do carcinoma coloretal humano e seus mecanismos de ação.</p>	<p>Sequência de eventos:</p> <p>- ativação do receptor CB1</p> <p>- infra-regulação dos eixos RAS-MAPK (diminuição da fosfo-ERK) e PI3K-Akt</p> <p>- desfosforilação da Bad em ambos resíduos serina 112 e serina 136</p> <p>- aumento da caspase-3</p> <p>- apoptose</p>

Kogan 2007a	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels HT29 (c6lon), Raji (linfoma) e Jurkat (leucemia)	- HU-311 (100 nM – 10 µM) por at6 48 hs	- investigar o mecanismo atrav6s do qual o HU-311 induz morte celular tumoral	- morte celular necr6tica (todas as cels) - efeito mediado pela inibi66o catal6tica da topoisomerase II - obs: ef. n6o mediados pelos CBRs, cascata de caspases, stress oxidativo, modula66o dos fatores de sobreviv6ncia celular e nem topoisomerase I
Kogan 2007b	Estudo experimental <i>in vivo</i>	- ratos marcados com cels HT29 (c6lon) - ratos marcados com cels Raji (linfoma B)	- adm. Iniciadas 15 dias ap6s a inoc. sc. cels HT29 e Raji: - adm. ip. de HU-331 (5 mg/kg, 3x/sem) versus doxorubicina (0.83 mg/kg, 3x/sem) vs ve6culo em ratos (HT29) por 2 meses - adm. ip. de HU-331 (15 mg/kg, 1x/sem) versus doxorubicina (4.5 mg/kg, 1x/sem) vs ve6culo em ratos (Raji) por 3 sem.	- comparar os efeitos antitumorais do canabin6ide quinona HU-331 com o quimioter6pico doxorubicina.	- HU-331 e doxorubicina: diminui66o significativa dos tumores em rela66o ao controle - HU-311: diminui66o significativa dos tumores em rela66o 6 doxorubicina - ratos tratados com HU-331 ganharam peso e n6o tiveram cardiotoxicidade nem mielotoxicidade - ratos tratados com doxorubicina perderam peso e tiveram cardiotoxicidade e mielotoxicidade

Cianchi 2008	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels HT29, DLD-1, LoVo, HCT8, SW480, HCA7, HCT15</p> <p>- tec. adenoCA col-retal</p> <p>- mucosa normal (adjacente tumor)</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos imunodeficientes com tumores marcados com cels DLD-1</p>	<p>- <i>in vitro</i>: ACEA (ag. CB1, 100 nM), CB13 (agon. CB2, 100 nM) por 48 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: administ. peritumoral de CB13 (2.5 mg/kg/dia; 12 d) em tumores (já estabelecidos) de ratos imunodefic. marcados com cels DLD-1 vs controle</p>	<p>- investigar os mec. moleculares subjacentes à atividade apoptótica induzida pela ativações dos CBRs</p>	<p>- ACEA: apoptose das cels DLD-1 e HT29; efeito mediado pelo CB1</p> <p>- CB13: apoptose das cels DLD-1 e HT29 e diminuição da viabili// de todas as cels pesq.; efeito mediado pelo CB2</p> <p>Sequência de eventos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - estim. dos respectivos CBRs - aumento da síntese de TNFα - acumulação de ceramida <i>de novo</i> - ativação da caspase 3 - apoptose <p>- <i>in vivo</i>: diminuição signifi/e dos tumores em relação ao controle; níveis aumentados de TNFα</p>
--------------	--	---	--	---	---

<p>Gustafsson 2009b</p>	<p>Estudo experimental <i>in vitro</i></p>	<p>- cels CaCo-2, HT29, HCT116</p>	<p>- exp. por 3 dias: - HU-210 (0.03-3 μM) - AEA (0.3-30 μM) - NAGly (análogo AEA, 0.3-30 μM) - AA (1-100 μM) - ácido eicosapentaenóico (1-100 μM) - 5-FU (1-100 μM)</p>	<p>- investigar os efeitos dos canabinóides sintéticos e dos endocanab. (e seus ácidos graxos relacionados) na viabilidade das cels CaCo-2 - determinar se os efeitos dos canabinóides são sinérgicos com o 5-FU.</p>	<p>- AEA, HU, AA, 5-FU induziram toxicidade nas cels CaCo-2, mas ambos os canab. (princ. o HU-210) foram mais potentes que o 5-FU - ef. mediados pelo mecanismo de transporte lipídico (HU e AEA) - ef. dos canab. independentes dos CBRs, VR, recept. acoplados à prot. G, ceramida, mec. MAPK, FAAH, LOX, COX - os outros compostos induziram apoptose</p> <p>Efeito sinérgico: - HU-210 (3 μM) teve efeito citotóxico sinérgico ao 5-FU (3, 10, 30 μM) nas cels CaCo-2, mas não nas células HT29 e HTC116; ef. mediado pelo mecanismo de transp. lipídico - não houve efeito sinérgico entre a AEA e o 5-FU.</p>
-----------------------------	--	--	--	---	---

Santoro 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p>- <i>in vitro</i>: cels DLD-1, CaCo-2 e SW620</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com lesões pré-tumorais geradas pelo AOM (genotóxico)</p>	<p>- <i>in vitro</i>: Rimonabanto (0.1-20 µM) por 24 e 48 hs</p> <p>- <i>in vivo</i>: ratos com lesões pré-cancerosas tratados com veículo vs AOM + veículo vs AOM (16 mg/kg no total, ip., 2x/sem, 1°, 3° e 5° sem. tto) + rimonabanto (3 mg/kg ip., todos os dias, com exceção dos dias em que o AOM é administrado)</p>	<p>- investigar os ef. do rimonabanto na prolif. das cels DLD-1, CaCo-2 e SW620 e os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos deste nas cels DLD-1</p>	<p>- ef. antiprolif. e morte (não apoptótica, não necrótica) das cels pesq.</p> <p>- sequestro do ciclo celular na fase G2-M</p> <p>Células DLD-1:</p> <ul style="list-style-type: none"> - morte celular por catástrofe mitótica - aumento da Ciclina B1 - diminuição dos níveis de expressão da Aurora B - inibição da expressão total de PARP-1 - inibição da fosforilação da p38 MAPK - diminuição da fosforilação da Chk1 <p>- <i>in vivo</i>: redução signifi/e da porcentagem, assim como do número de ratos com formação de criptas aberrantes (contendo 4 ou mais criptas), sem reduzir o total de form. de criptas aberrantes/rato.</p>
--------------	--	---	--	--	---

			CARCINOMA EPITELIAL ORAL		
Baek 1998	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels tumorais CB - cels não tumorais (fibroblastos: NIH3T3 – controle)	In vitro (48 hs) - CBs: canabigerol, canabidiol - geraniol - olivetol - 5-FU (todos: 0-100 µM)	- determinar se os canabinóides e agentes anticâncer possuem atividade inibitória contra as células do carcinoma epitelial oral	- ef. antiproliferativo (citotóxicos): todos os compostos) - ordem de potência: CBG (IC50=31.3 µM) > Olivetol (IC50=105.1 µM) > CBD (IC50=273 µM) > Geraniol (IC50=482.74 µM) - não houve seletividade: citotoxicidade nas cels normais
			OSTEOSSARCOMA		
Hsu 2007	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels MG63	- AEA (0-200 µM) por 24 hs	- examinar se a AEA causa morte celular, apoptose e expressão de MAPKs nas células humanas do osteossarcoma	Sequência de eventos: - aumento de cálcio intracelular pela AEA - aumento da fosfo-p38 MAPK - ativação da caspase 3 - apoptose - obs: também houve aumento da fosfo-ERK e fosfo-JNK (não foram mediadores)

			TIMOMA		
Lee 2008b	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels EL-4 - timócitos normais (controle)	- CBD (1-16 μ M) por 24 hs	- investigar e comparar a influência do CBD na apoptose entre as células EL-4 do timoma e as cels do timo normais de camundongo	- apoptose em ambos os tipos de cels - aumento produção de ROS - stress oxidativo (mediador) - não seletividade
			SARCOMA DE KAPOSI		
Luca 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels KS-IMM (cels sarcoma derivadas de cel. endotelial) - HUVECs (controle positivo para presença de CBRs)	- WIN 55,212-2 (25 nM – 5 μ M) - ACEA (1-5 μ M) - JWH-133 (1-5 μ M) (todos: 24-96 hs)	- avaliar os efeitos e os mecanismos moleculares dos canabinóides no sarcoma de Kaposi humano.	- apoptose pelo WIN (mas não pelos outros dois compostos) - WIN: mais efetivo nas HUVECs que nas cels KS-IMM - efeito mediado pelo CB2 - aumento da fosfo-ERK1/2 - ativação das caspases 3 e 6 - aumento nos níveis da fosfo-p38 e fosfo-JNK

			RABDOMIOS-SARCOMA		
Oesch 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	<p><i>in vitro</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - cels tumorais Rh4 e Rh28 - cels controle: MRC-5 (fibroblastos), que não expressam CB1 <p>- <i>in vivo</i>: ratos imunodeficientes com tumores (estabelecidos) marcados com células Rh4</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>in vitro</i>: HU-210 (0.25-1 μM) por 72 hs; delta-9-THC (0-5 μM) por 24 hs; Met-F-AEA (0-15 μM) por 48 hs - <i>in vivo</i>: adm. peritumoral de HU-210 (0.2 mg/kg; 13 dias) vs veículo em ratos imunodefic. marcados com cels Rh4 (inj. sc.) 	<ul style="list-style-type: none"> - avaliar os efeitos dos canabinóides nas cels tumorais do rabdomiossarcoma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - diminuição da viabilidade das cels Rh4 (todos os canab.); e das cels Rh28 (só o HU-210) - seletividade <p>CÉLULAS Rh4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - apoptose - ef. mediado pelo CB1 - clivagem PARP e caspase-3 - infra-regulação fosfo-AKT (Ser473) (mediador) e da GSK3β - supra-regulação da p8 (mediador) <p>- <i>in vivo</i>: redução significativa dos tumores; apoptose</p>

			CA GÁSTRICO		
Miyato 2009	Estudo experimental <i>in vitro</i>	- cels MKN-28, MKN-45, MKN-74, HGC-27	- AEA (0.01-1 μ M ou 10 μ M) por 2 dias - AEA (0.01-1 μ M ou 10 μ M) + paclitaxel (10 μ M) por 2 dias	- avaliar se a AEA muda os efeitos do quimioterápico paclitaxel nas linhas de células cancerígenas gástricas	AEA (10 μ M): - ef. antiprolif. cels MKN-28, MKN-74, HGC-27 - apoptose (HGC-27) mediada pelo receptor CB1 - ef. sinérgico ao paclitaxel na indução de apoptose AEA (0.01-1 μ M): - ef. estimulante da proliferação nas cels HGC-27 - não alterou ef. citotóxico do paclitaxel - obs: cels MKN-45 insensível à AEA em qualquer concentração

CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA

CANABINÓIDES E GLIOMAS

Esta revisão contemplou trinta estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores cerebrais. Apenas um estudo foi realizado em humanos (Guzmán et al., 2006), no qual foi pesquisado em ensaio clínico fase I/II o efeito do delta-9-THC em pacientes com glioblastoma multiforme recorrente. Os demais estudos foram experimentais. Treze deles pesquisaram os efeitos antitumorais dos canabinóides *in vivo* (Galve-Roperh et al., 2000; Recht et al., 2001; Sánchez et al., 2001a; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004; Massi et al., 2004; Duntsch et al., 2006; Guzmán et al., 2006; Carracedo et al., 2006a; Massi et al., 2008; Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b; Salazar et al., 2009). Diferentes dosagens dos canabinóides, bem como diferentes células tumorais cerebrais foram utilizadas nestes estudos. Adicionalmente, alguns estudos utilizaram ratos imunodeficientes para avaliação da influência da imunidade sob os efeitos dos canabinóides (Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001a; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004).

Quanto aos fitocannabinóides, o delta-9-THC foi o mais estudado (End et al., 1977; Sánchez et al., 1998a; Galve-Roperh et al., 2000; Gómez Del Pulgar et al., 2002; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004; Hinz et al., 2004a; Goncharov et al., 2005; McAllister et al., 2005; Guzmán et al., 2006; Carracedo et al., 2006a; Galanti et al., 2008; Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b; Widmer et al., 2008; Salazar et al., 2009), seguido pelo canabidiol com quatro artigos (Massi et al., 2004; Vaccani et al., 2005; Massi et al., 2006; Massi et al., 2008) e o delta-8-THC com dois estudos (Recht et al., 2001; Duntsch et al., 2006).

Considerando os endocannabinóides, a anandamida (AEA) foi utilizada em seis estudos (Jacobsson et al., 2001; Fowler et al., 2003; Contassot et al., 2004a; Hinz et al., 2004a; Bari et al., 2005; Blázquez et al., 2008b), e seu análogo estável metanandamida (meAEA) em quatro artigos (Jacobsson et al., 2001; Fowler et al.,

2003; Hinz et al., 2004a; Eichele et al., 2006). O 2-AG (Jacobsson et al., 2001), o 1-AG (Fowler et al., 2003) e o SEA (Macarrone et al., 2002b) foram utilizados em apenas um estudo.

Já em relação aos canabinóides sintéticos, o mais pesquisado foi o WIN 55,212-2 em 8 trabalhos (Galve-Roperh et al., 2000; Jacobsson et al., 2001; Sánchez et al., 2001a; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004; McAllister et al., 2005; Ellert-Miklaszewska et al., 2005; Widmer et al., 2008). O JWH-133 foi estudado em 4 artigos (Sánchez et al., 2001a; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004; Blázquez et al., 2008b). O CP 55,940 (Jacobsson et al., 2001; Widmer et al., 2008) e o HU-210 (Blázquez et al., 2003; Widmer et al., 2008) foram utilizados em dois estudos. O ácido ajulêmico (AJA) (Recht et al., 2001), KM-233 (Duntsch et al., 2006) e o JWH015 (Jacobsson et al., 2001) foram pesquisados em apenas um estudo.

Quanto as células tumorais utilizadas, as mais estudadas foram as células U87 MG em 13 estudos (Recht et al., 2001; Contassot et al., 2004a; Massi et al., 2004; Vaccani et al., 2005; McAllister et al., 2005; Duntsch et al., 2006; Carracedo et al., 2006a; Massi et al., 2006; Massi et al., 2008; Galanti et al., 2008; Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b; Salazar et al., 2009). As células U373MG foram pesquisadas em cinco estudos (Sánchez et al., 1998a; Massi et al., 2004; McAllister et al., 2005; Widmer et al., 2008; Salazar et al., 2009). As células U251 (Contassot et al., 2004a; McAllister et al., 2005; Galanti et al., 2008) e as células T98G (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b; Salazar et al., 2009) foram estudadas em três artigos. As células U118 (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b), SW1088 (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b) e as células H4 (Hinz et al., 2004a; Eichele et al., 2006) foram analisadas em dois estudos. Por fim, as células SF126 (McAllister et al., 2005), SF188 (McAllister et al., 2005) e as células Gos3 (Carracedo et al., 2006a) foram pesquisadas em apenas um estudo.

Esta revisão também contemplou estudos que utilizaram biópsias de dois pacientes com glioblastoma multiforme (GBM) recorrente, que foram tratados com delta-9-THC (Blázquez et al., 2004; Carracedo et al., 2006a; Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b; Salazar et al., 2009) para avaliação dos efeitos

celulares e moleculares deste canabinóide. Dois estudos (Sánchez et al., 2001a; Blázquez et al., 2003) também utilizaram células do GBM para serem inoculadas em ratos para avaliação dos efeitos dos canabinóides nos tumores destes animais marcados com estas células.

As células C6 foram as linhas de células mais pesquisadas dos gliomas de ratos, totalizando 11 estudos (End et al., 1977; Recht et al., 2001; Sánchez et al., 2001a; Jacobsson et al., 2001; Macarrone et al., 2002b; Fowler et al., 2003; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004; Goncharov et al., 2005; Ellert-Miklaszewska et al., 2005; Bari et al., 2005). Alguns estudos utilizaram subclones destas células (C6.9 e C6.4) para a avaliação dos efeitos diferenciais dos canabinóides nas mesmas. Cinco estudos analisaram ambos os subclones das células C6 (Galve-Roperh et al., 2000; Gómez Del Pulgar et al., 2002; Carracedo et al., 2006a; Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b), enquanto um artigo pesquisou apenas as células C6.9 (Sánchez et al., 1998a).

Os estudos desta revisão pesquisaram os efeitos de morte celular tumoral pelos canabinóides, mostrando diversos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nestes efeitos. Também foram analisados os efeitos antiangiogênicos e antimetásticos dos mesmos nas diferentes linhas de células pesquisadas.

CANABINÓIDES E NEUROBLASTOMAS

Esta revisão sistemática contemplou cinco estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos neuroblastomas. Todos os estudos foram experimentais e *in vitro*.

A AEA foi pesquisada em três estudos (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2005; Pasquariello et al., 2009), o 2-AG em dois (Macarrone et al., 2000; Pasquariello et al., 2009). Já o delta-9-THC (End et al., 1977), assim como os análogos endocanabinóides (LEA, OEA e PEA) (Macarrone et al., 2000) foram pesquisados em apenas um estudo.

Dentre as células do neuroblastoma pesquisadas, apenas as células NB2A eram de ratos (End et al., 1977). As outras células do neuroblastoma eram humanas e incluíram as CHP100, pesquisadas em dois estudos (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2005), as N18TG2 pesquisadas em um estudo (Sánchez et al., 1998); SH-SY5Y, LAN-5 e as SK-NBE estudadas em um artigo (Pasquariello et al., 2009).

CANABINÓIDES E FEOCROMOCITOMAS

Esta revisão sistemática contemplou quatro estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides no feocromocitoma. Todos os estudos foram experimentais e *in vitro*.

O canabinóide AEA foi pesquisado em três estudos (Sarker et al., 2000; 2003a; 2003b), enquanto o CP55,940 foi pesquisado em apenas um estudo (Erlandsson et al., 2002). As células PC12 foram pesquisadas em todos os estudos. Os efeitos apoptóticos da AEA nestas células, assim como os mecanismos moleculares subjacentes a estes efeitos foram descritos.

CANABINÓIDES E TUMORES DE PRÓSTATA

Esta revisão sistemática incluiu oito estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos cânceres de próstata, sendo todos experimentais e *in vitro*, à exceção de um no qual foi tanto *in vivo* como *in vitro* (Olea-Herrera et al., 2009a).

O WIN 55,212-2 (Ruiz et al., 1999; Nithipatikom et al., 2004; Sarfaraz et al., 2005; Sarfaraz et al., 2006) e a metanandamida (análogo AEA) (Melck et al., 2000; Nithipatikom et al., 2004; Olea-Herrero et al., 2009a; Olea-Herrero et al., 2009b) foram os canabinóides mais utilizados nos estudos, totalizando 4 estudos para cada um deles. A AEA (Melck et al., 2000; Mimeault et al., 2003) e o 2-AG (Melck

et al., 2000; Nithipatikom et al., 2004) foram pesquisados em dois estudos, enquanto que a noladina éter (análogo 2-AG) (Nithipatikom et al., 2004), o delta-9-THC (Ruiz et al., 1999), o HU-210 (Melck et al., 2000) e o JWH-015 (Olea-Herrero et al., 2009a) foram pesquisados em apenas um estudo.

Três linhas de células tumorais de próstata foram majoritariamente pesquisadas (*in vitro*) para avaliação dos efeitos antiproliferativos dos canabinóides: as células PC-3 (androgênio-independentes) foram pesquisadas em seis estudos (Ruiz et al., 1999; Mimeault et al., 2003; Nithipatikom et al., 2004; Sarfaraz et al., 2005; Sarfaraz et al., 2006; Olea-Herrero et al., 2009a, Olea-Herrero et al., 2009b), as células DU-145 (androgênio-independentes e prolactina-responsivas) foram pesquisadas em cinco estudos (Melck et al., 2000; Mimeault et al., 2003; Nithipatikom et al., 2004; Sarfaraz et al., 2005; Olea-Herrero et al., 2009a), assim como as células LNCaP (androgênio-dependentes) (Mimeault et al., 2003; Nithipatikom et al., 2004; Sarfaraz et al., 2005; Sarfaraz et al., 2006; Olea-Herrero et al., 2009a).

CANABINÓIDES E TUMORES DE MAMA

Esta revisão sistemática incluiu 15 estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos cânceres de mama. Todos os estudos incluídos nesta revisão foram experimentais, sendo que quatro deles (Ligresti et al., 2006; Sarnataro et al., 2006; Grimaldi et al., 2006; Qamri et al., 2009) utilizaram experimentos *in vivo* além dos experimentos *in vitro*.

A AEA (De Petrocellis et al., 1998; Bisogno et al., 1998; Melck et al., 1999; Melck et al., 2000; Di Marzo et al., 2001) e o delta-9-THC (Ligresti et al., 2006; Caffarel et al., 2006; McAllister et al., 2007; Von Bueren et al., 2008; Caffarel et al., 2008) foram os canabinóides mais estudados, totalizando 5 estudos cada. O HU-210 foi pesquisado em quatro estudos (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999; Melck et al., 2000; Di Marzo et al., 2001), a PEA (Bisogno et al., 1998; Melck et al., 2000; Di Marzo et al., 2001) e a Met-F-AEA (Grimaldi et al., 2006; Laezza et

al., 2006; Laezza et al., 2008) em três, o 2-AG (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 2000), a metanandamida (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 2000), o CBD (Ligresti et al., 2006; McAllister et al., 2007) e o WIN 55,212-2 (McAllister et al., 2007; Qamri et al., 2009) em dois estudos e a oleamida (Bisogno et al., 1998), os extratos da planta Cannabis (Ligresti et al., 2006), o CP 55,940 (McAllister et al., 2007) e o JWH-133 (Qamri et al., 2009) foram utilizados em apenas um estudo.

Várias linhas de células tumorais de mama foram pesquisadas *in vitro* para avaliação dos efeitos antiproliferativos dos canabinóides: as células tumorais humanas MCF-7 (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999; Melck et al., 2000; Di Marzo et al., 2001; Ligresti et al., 2006; Caffarel et al., 2006; Sarnataro et al., 2006; Von Bueren et al., 2009) e as células MDA-MB-231 (Ligresti et al., 2006; Caffarel et al., 2006; Laezza et al., 2006; Sarnataro et al., 2006; Grimaldi et al., 2006; McAllister et al., 2007; Laezza et al., 2008; Qamri et al., 2009) foram pesquisadas em oito trabalhos cada. As células tumorais humanas EFM-19 foram pesquisadas em cinco estudos (De Petrocellis et al., 1998; Bisogno et al., 1998; Melck et al., 1999; Melck et al., 2000; Di Marzo et al., 2001) bem como as células tumorais humanas T47D (Melck et al., 2000; Di Marzo et al., 2001; Caffarel et al., 2006; Sarnataro et al., 2006; Grimaldi et al., 2006). As linhas de células tumorais de mama EVSA-T (Caffarel et al., 2006; Caffarel et al., 2008) e as células MDA-MB-468 (Caffarel et al., 2006; Qamri et al., 2009) foram pesquisadas em dois estudos e finalmente as células MDA-MB-436 (McAllister et al., 2007), SKBr3 (Caffarel et al., 2006) e as linhas de células tumorais de camundongo TSA-E1 (Grimaldi et al., 2006) foram pesquisadas em apenas um estudo.

Efeitos antimetásticos *in vitro* foram pesquisados nas células MDA-MB-231 (McAllister et al., 2007; Laezza et al., 2008; Qamri et al., 2009), MDA-MB-468 (Qamri et al., 2009) e MDA-MB-436 (McAllister et al., 2007). As linhas de células tumorais MDA-MB-231 foram as únicas linhas de células humanas pesquisadas *in vivo*, tanto para os efeitos na diminuição de tumores de ratos inoculados com estas células (Ligresti et al., 2006; Sarnataro et al., 2006; Qamri et al., 2009) quanto para os efeitos antimetastáticos de câncer de pulmão, derivados de tumor

primário de mama, em ratos inoculados com estas células (Ligresti et al., 2006; Qamri et al., 2009).

Efeitos antimetastáticos também foram pesquisados *in vivo* em linhas de células tumorais de camundongo TSA-E1 (Grimaldi et al., 2006), que quando inoculados com estas células, desenvolveram metástase de pulmão derivada de tumor primário de mama.

CANABINÓIDES E TUMORES DO CÉRVIX UTERINO

Esta revisão contemplou cinco estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores do cérvix uterino humano. Todos os estudos foram experimentais e *in vitro*.

O canabinóide metanandamida (meAEA) (Ramer and Hinz, 2008; Eichele et al., 2009) e o delta-9-THC (Mon et al., 1981; Ramer and Hinz, 2008) foram pesquisados em dois estudos. Já a AEA (Contassot et al., 2004b), o 2-AG (Rudolph et al., 2008), o WIN 55,212-2 (Rudolph et al., 2008), o delta-8-THC (Mon et al., 1981), o 11-OH-delta-9-THC (Mon et al., 1981) e o canabinol (Mon et al., 1981) foram pesquisados em um estudo cada.

As células tumorais HeLa foram as mais estudadas em relação aos seus efeitos antiproliferativos (Mon et al., 1981; Contassot et al., 2004b; Eichele et al., 2009) e antimetastáticos (Ramer and Hinz, 2008). Nestes estudos (Ramer and Hinz, 2008; Eichele et al., 2009), as células do adenocarcinoma cervical (C33A) e as células do adenocarcinoma de pulmão (A549) também foram pesquisadas com o intuito de se verificar um possível efeito mais global dos canabinóides. As células Caski e C299 também tiveram seus efeitos antiproliferativos estudados (Contassot et al., 2004b). As células HPV-18 positivas, SW756, por sua vez, foram estudadas em relação aos seus efeitos antimigratórios (Rudolph et al., 2008).

CANABINÓIDES E CÂNCER DE TIREÓIDE

Todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática sobre os efeitos antitumorais dos canabinóide no câncer de tireóide foram experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bifulco et al., 2001; Portella et al., 2003; Bifulco et al., 2004; Pisanti et al., 2007; Shi et al., 2008).

O canabinóide sintético Met-F-AEA, análogo estável da anandamida, foi pesquisado em quatro estudos (Bifulco et al., 2001; Portella et al., 2003; Bifulco et al., 2004; Pisanti et al., 2007), sendo que em três deles (Bifulco et al., 2001; Portella et al., 2003; Bifulco et al., 2004), foram estudados o efeito antiproliferativo *in vitro* e o efeito na diminuição do volume tumoral *in vivo*. Um estudo (Portella et al., 2003) avaliou os efeitos antimetásticos da Met-F-AEA enquanto outro (Pisanti et al., 2007) os seus efeitos antiangiogênicos. O canabinóide 2-AG foi pesquisado, *in vitro* e *in vivo*, em apenas um estudo (Bifulco et al., 2004). Os canabinóides WIN55,212-2 (*in vitro*) e JWH-133 (*in vitro* e *in vivo*) também foram estudados em um estudo.

As linhas de células KiMol, transformadas pelo oncogene k-ras, foram pesquisadas em quatro estudos (Bifulco et al., 2001; Portella et al., 2003; Bifulco et al., 2004; Pisanti et al., 2007). Já as linhas de células TK-6, também transformadas pelo oncogene K-ras, e as células células metastáticas de pulmão, MPTK-6 (derivadas de tumor primário da tireóide – células TK-6), foram pesquisadas em apenas um estudo (Portella et al., 2003). As células ARO, ARO/IL-12 e ARO/CB2 também foram pesquisadas em um estudo (Shi et al., 2008).

CANABINÓIDES E CÂNCER DE PULMÃO

Esta revisão sistemática contemplou cinco estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos cânceres de pulmão. Todos os estudos foram

experimentais, sendo que dois deles (Munson et al., 1975; Preet et al., 2008) foram também *in vivo*, além de *in vitro*.

O canabinóide delta-9-THC foi pesquisado em todos os estudos (Munson et al., 1975; Sarafian et al., 2002a; Sarafian et al., 2002b; Athanasiou et al., 2007; Preet, 2008). Já o delta-8-THC, o canabinol e o canabidiol foram pesquisados em apenas um estudo (Munson et al., 1975). A AEA e o HU-210 também foram pesquisados em um estudo apenas (Athanasiou et al., 2007).

As células tumorais pesquisadas foram as células do adenocarcinoma Lewis de pulmão (Munson et al., 1975), as células do adenocarcinoma de pulmão que não são de pequenas células, H460 (Athanasiou et al., 2007), A549 (Sarafian et al., 2002a; Sarafian et al., 2002b; Preet et al., 2008) e SW-1543 (Preet et al., 2008). Os efeitos antimetastáticos do delta-9-THC, bem como seus mecanismos subjacentes, foram descritos para estas duas últimas linhas de células.

CANABINÓIDES E LEUCEMIAS E LINFOMAS

Todos os estudos incluídos nesta revisão sistemática foram experimentais, sendo que quatro deles (McKallip et al., 2002; McKallip et al., 2006; Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2008) utilizaram experimentos *in vivo* além dos experimentos *in vitro*.

O delta-9-THC foi o canabinóide mais utilizado, sendo estudado em 8 estudos (Rowley and Rowley, 1990; McKallip et al., 2002; Herrera et al., 2005; Powles et al., 2005; Lombard et al., 2005; Jia et al., 2006; Herrera et al., 2006; Liu et al., 2008). A AEA (Macarrone et al., 2000; McKallip et al., 2002; Flygare et al., 2005; Bari et al., 2006a) e o WIN 55,212-2 (McKallip et al., 2002; Flygare et al., 2005; Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2009a) foram pesquisados em quatro estudos, enquanto que a metanandamida (Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2008; Gustafsson et al., 2009a) foi pesquisada em três estudos. O canabinóide PEA (Macarrone et al., 2000; Powles et al., 2005) e o CBD (Gallily et al., 2003; McKallip et al., 2006) foram pesquisados em dois estudos. Os outros

canabinóides foram pesquisados em apenas um estudo cada, incluindo o HU-210 (McKallip et al., 2002), JWH-015 (McKallip et al., 2002), JWH-133 (Herrera et al., 2005), 2-AG (Macarrone et al., 2000), Arvanil (Sancho et al., 2003), LEA (Macarrone et al., 2000), OEA (Macarrone et al., 2000), SR141716 (Flygare et al., 2005).

As linhas de células de linfomas estudadas foram as provenientes do linfoma não Hodgkin de células B (MCL, CLL, BL) (Flygare et al., 2005; Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2008; Gustafsson et al., 2009a), as células tumorais U937 (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2006a) e as células DAUDI humanas (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2006a).

As linhas de células leucêmicas mais estudadas foram as linhas de células humanas Jurkat (McKallip et al., 2002; Sancho et al., 2003; Herrera et al., 2005; Lombard et al., 2005; Jia et al., 2006; McKallip et al., 2006; Herrera et al., 2006) e as linhas de células de camundongo murino EL-4, sendo estas últimas estudadas *in vivo* (McKallip et al., 2002; McKallip et al., 2006). As células HL60 foram pesquisadas em três estudos (Rowley and Rowley, 1990; Gallily et al., 2003; Powles et al., 2005), enquanto as células CEM (Powles et al., 2005), HEL (Powles et al., 2005) e K562 (Rowley and Rowley, 1990) foram estudadas em um estudo cada.

CANABINÓIDES E CÂNCER DE PELE

Os três estudos incluídos nesta revisão sistemática, sobre os efeitos dos canabinóides nos tumores de pele, foram experimentais, *in vitro* (Casanova et al., 2003; Blázquez et al., 2006; Van Dross, 2009) e *in vivo* (Casanova et al., 2003; Blázquez et al., 2006).

O canabinóide WIN 55,212-2 e o JWH-133 foram pesquisados, *in vitro* e *in vivo*, em dois estudos (Casanova et al., 2003; Blázquez et al., 2006). Os canabinóides delta-9-THC (Blázquez et al., 2006), HU-210 (Casanova et al., 2003), AEA (Van Dross, 2009) e PEA (Van Dross, 2009) foram pesquisados

apenas *in vitro* e em um estudo cada. Os estudos *in vitro* avaliaram os efeitos dos canabinóides na viabilidade das células tumorais, enquanto que os *in vivo* focaram na redução do crescimento tumoral, bem como seus efeitos antiangiogênicos e antimetastáticos.

Dois estudos pesquisaram linhas de células de câncer de pele (não melanoma). Um deles (Casanova et al., 2003) pesquisou as linhas de células tumorais epidermais PDV.C57 e HaCa4 *in vitro*, sendo que as primeiras também foram pesquisadas *in vivo*. Outro (Van Dross, 2009) pesquisou as células JWF2 e HaCat apenas *in vitro*. Um terceiro estudo *in vitro* (Blázquez et al., 2006) pesquisou as linhas de células tumorais do melanoma B16, A375 e MelJuso, sendo que as primeiras também foram pesquisadas *in vivo*.

CANABINÓIDES E TUMORES DO PÂNCREAS

Esta revisão sistemática contemplou dois estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores pancreáticos. Ambos foram experimentais, sendo que um deles (Carracedo et al., 2006b) pesquisou os efeitos dos canabinóides não somente *in vitro*, mas também *in vivo*.

O canabinóide WIN 55,212-2 foi pesquisado nos dois estudos, *in vitro* (Fogli et al., 2006) e *in vivo* (Carracedo et al., 2006b). O JWH-015 (Fogli et al., 2006) e o JWH-133 (Carracedo et al., 2006b) foram pesquisados *in vitro* em um estudo cada. Os derivados canabinóides AM251 e AM630 (antagonistas CB1 e CB2, respectivamente) foram pesquisados em um estudo (Fogli et al., 2006). Por fim, o delta-9-THC foi pesquisado *in vitro* e *in vivo* em um estudo (Carracedo et al., 2006b).

A linha de células pancreáticas mais estudadas foi a MiaPaCa2, *in vitro* (Fogli et al., 2006; Carracedo et al., 2006b) e *in vivo* (Carracedo et al., 2006b). As linhas de células Panc1, Capan2 e BxPc3 foram pesquisadas *in vitro* em apenas um estudo (Carracedo et al., 2006b).

Os estudos *in vitro* avaliaram os efeitos dos canabinóides na viabilidade das células tumorais, enquanto que os *in vivo* focaram a redução do crescimento tumoral.

CANABINÓIDES E TUMORES DE ORIGEM HEPÁTICA

Esta revisão sistemática contemplou cinco estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores de origem hepática. Todos eles foram experimentais, sendo que um deles (De Morrow et al., 2008) pesquisou os efeitos dos canabinóides não somente *in vitro*, mas também *in vivo*.

Nas células tumorais do colangiocarcinoma, houve a pesquisa dos canabinóides AEA (De Morrow et al., 2007; De Morrow et al., 2008) e 2-AG (De Morrow et al., 2007). As linhas de células do colangiocarcinoma estudadas foram as Mz-ChA-1 (De Morrow et al., 2007; De Morrow et al., 2008), HuH-28, HuCC-T1 e SG231 (De Morrow et al., 2007). As células HepG2 foram as únicas células do hepatoma estudadas, sendo pesquisados os efeitos antitumorais dos derivados canabinóides AM251 (Lee et al., 2008a), AEA (Biswas et al., 2003) e WIN 55,212-2 (Giuliano et al., 2009).

Os estudos *in vitro* avaliaram os efeitos dos canabinóides na viabilidade das células tumorais enquanto que os *in vivo* focaram na redução do crescimento tumoral.

CANABINOIDES E TUMORES COLO-RETAIS

Esta revisão sistemática incluiu onze estudos sobre os efeitos antitumorais dos canabinóides nos tumores colo-retais. Todos os estudos incluídos foram experimentais, sendo que três deles (Kogan et al., 2004; Kogan et al., 2006; Kogan et al., 2007b) foram *in vivo*, além de *in vitro*.

A anandamida (AEA) foi o canabinóide mais utilizado nos estudos (Ligresti et al., 2003; Joseph et al., 2004; Patsos et al., 2005; Gustafsson et al., 2009b), para a avaliação de seus efeitos antiproliferativos (Ligresti et al., 2003; Patsos et al., 2005a) e efeitos antimigratórios (Joseph et al., 2004). O HU-331 (canabidiol-quinona) também foi avaliado em quatro estudos (Kogan et al., 2004; Kogan et al., 2006; Kogan et al., 2007a; Kogan et al., 2007b) O canabinóide HU-210 foi usado para comparação com a AEA em três estudos (Ligresti et al., 2003; Joseph et al., 2004; Gustafsson et al., 2009b). O delta-9-THC (Greenhough et al., 2007), o rimonabanto (Santoro et al., 2009), o ACEA (Cianchi et al., 2008) e o CB13 (Cianchi et al., 2008) foram pesquisados em um estudo cada, para a avaliação dos seus efeitos antiproliferativos.

As linhas de células tumorais colo-retais estudadas foram todas de origem humana, incluindo: CaCo-2 (Ligresti et al., 2003; Greenhough et al., 2007; Gustafsson et al., 2009b; Santoro et al., 2009), SW480 (Joseph et al., 2004; Patsos et al., 2005a; Greenhough et al., 2007; Cianchi et al., 2008), HT29 (Patsos et al., 2005a; Greenhough et al., 2007; Cianchi et al., 2008; Gustafsson et al., 2009b), HCA7/C29 (Patsos et al., 2005a), DLD-1 (Ligresti et al., 2003; Cianchi et al., 2008; Santoro et al., 2009), SW620 (Greenhough et al., 2007; Santoro et al., 2009), HCT116 (Greenhough et al., 2007; Gustafsson et al., 2009b), HCT-15 e LS174T (Greenhough et al., 2007), LoVo, HCT8 e HCA7 (Cianchi et al., 2008).

CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS EXCLUÍDOS

Oitenta de dois artigos capturados pela estratégia de busca foram excluídos por não serem objetos da presente revisão: treze estudos apresentaram efeitos pró-tumorais pela ação canabinóide (Hashibe et al., 2002; Galve-Roperh et al., 2002; Jordà et al., 2002; Sánchez et al., 2003b; Gardner et al., 2003; Jordà et al., 2004; Oka et al., 2004; Hart et al., 2004; Gokoh et al., 2005; Spiegel and Milstien, 2005; Mckallip et al., 2005; Endsley et al., 2007; Zhang et al., 2007); trinta e oito artigos abordaram alguns mecanismos de ação dos canabinóides, mas não pesquisaram os seus efeitos antitumorais (Tucker and Friedman, 1977; Blevins and Smith, 1980; Howlett, 1985; Mackie and Hille, 1992; Maurelli et al., 1995; Bisogno et al., 1997; McIntosh et al., 1998; Macarrone et al., 1998; Bisogno et al., 2001b; Espósito et al., 2001; Velasco et al., 2001; Granberg et al., 2001; Curran et al., 2001; Ramer et al., 2001; Espósito et al., 2002; De Petrocellis et al., 2002; Ramer et al., 2003; Macarrone et al., 2003; Keren and Sarne, 2003; Islam et al., 2003; Winnicka et al., 2003; Sánchez et al., 2003a; Hinz et al., 2004b; Sarnataro et al., 2005; Aguado et al., 2006; De Lago et al., 2006; Mormina et al., 2006; Graham et al., 2006; Xu et al., 2006; Dickason-Chesterfield et al., 2006; Russo and Guy, 2006b; Svensson et al., 2006; Rao and Kaminski, 2006; Matas et al., 2007; Lam et al., 2007; Del Giudice et al., 2007; Bosier et al., 2008; Michalski et al., 2008); dois artigos mostraram intervenções apenas com inibidores de endocanabinóides, mas não com os próprios canabinóides, e foram apenas discutidos (Jonsson et al., 2003; Nithipatikom et al., 2005); dois artigos mostraram efeitos não significativos da ação antitumoral dos canabinóides (Jacobsson et al., 2000; Giuliano et al., 2006); um artigo mostrou efeito anulatório da apoptose induzida por quimioterápico (Jeong et al., 2007); um artigo mostrou ação canabinóide em células pré-tumorais, e não tumorais (Izzo et al., 2008); vinte e cinco artigos foram revisões (Piomelli et al., 2000; Di Marzo et al., 2000; Maher et al., 2001; Guzmán et al., 2002; Parolaro et al., 2002; Velasco et al., 2004; Kraft and Kress, 2004; Robson, 2005; Kogan, 2005; Patsos et al., 2005b; Fonseca et al., 2005; Vidinský et al., 2006; Fernández-Ruiz et al., 2006; Sing and Budhiraja, 2006; Bari et al.,

2006b; Bifulco et al., 2006; Engels et al., 2007; Velasco et al., 2007; Cudaback and Stella, 2007; Peters and Kogan, 2007; Costa, 2007; Bifulco et al., 2007; Parolaro and Massi, 2008; Izzo and Camilleri, 2009; Pisanti et al., 2009).

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

UMA VISÃO GERAL DOS MECANISMOS MODULADOS PELOS CANABINÓIDES

Há evidências de que os canabinóides possuem ação antitumoral ao anular a resistência dos tumores, por si só, e que podem causar a morte das células tumorais através de diferentes mecanismos dependendo do composto canabinóide utilizado e das células tumorais investigadas (Massi et al., 2006). A seguir serão descritos importantes mecanismos envolvidos na ação antitumoral dos canabinóides.

A apoptose, também chamada de morte celular programada, é um programa de suicídio celular com características bioquímicas e morfológicas específicos. Todos os mecanismos apoptóticos convergem numa família de cisteína aspartases, as caspases, cuja atividade direciona os eventos bioquímicos para o rompimento e morte celular (Massi et al., 2006). As caspases são constitutivamente formadas nas células e estão normalmente presentes como proenzimas inativas (Salazar et al., 2006), sendo ativadas durante a apoptose numa cascata auto-amplificada (Saraste and Pulkki, 2000). Os mecanismos pró-apoptóticos ativadores das caspases precoces ou iniciadoras, como as caspases 8, 9 e 10, provocam uma ativação proteolítica das caspases tardias ou efetoras 3, 6 e 7 (Sarfaraz et al., 2006). Dois mecanismos principais promovem a ativação das caspases iniciais: os mecanismos de morte celular 'mitocondrial', que envolve a caspase-9, e o mecanismo 'morte-receptor', que envolve a caspase-8. Em diferentes modelos experimentais, estes mecanismos bioquímicos convergem na ativação da mais importante caspase executora, a caspase-3. Esta, por sua vez, cliva vários substratos de proteínas, incluindo poli(ADP ribose)polimerase (PARP), resultando na auto-destruição das células (Massi et al., 2006).

Análises moleculares de tumores humanos revelaram que os reguladores do ciclo celular sofrem frequentes mutações na maioria das malignidades comuns (Kastan et al., 1995; Molinari, 2000). Atualmente, a inibição do ciclo celular tem

sido um importante alvo no manejo do câncer (McDonald and El-Deiry, 2000; Own et al., 2000). Existem evidências que a indução de apoptose é dependente do ciclo celular (Hartwell and Kastan, 1994; Morgan and Kastan, 1997; King and Cidlowski, 1998; Sandhu and Shinglerland, 2000; Vermeulen et al., 2003).

O ciclo celular nos eucariotes é regulado por membranas de complexos de proteína cinase. Cada complexo é composto minimamente por ciclinas (subunidades regulatórias) que se ligam aos cdk's (quinases dependentes de ciclinas) (subunidades catalíticas) para formar complexos ativos, ciclina-cdk. Estes complexos são ativados em diferentes pontos de checagem depois de certos intervalos durante o ciclo celular e podem também ser regulados por vários fatores exógenos (Kastan et al., 1995). A atividade da cdk é adicionalmente regulada por pequenas proteínas conhecidas com ckis, que incluem os membros das proteínas p21/WAF1 e p27/KIP1 (Sarfraz et al., 2006). Foi descrito que as ckis inibem a atividade cinase associada com os complexos cdk-ciclina, modulando desta forma os eventos de fosforilação que são cruciais na progressão do ciclo celular (Macleod et al., 1995; Sherr, 1996; Jacks and Weinberg, 1996; Sherr and Roberts, 1999; Sanchez and Dynlacht, 2005).

Estudos recentes têm mostrado que assim como as ciclinas e cdk's, a progressão do ciclo celular através da fase G0-G1 e a apoptose também são regulados pela p27/KIP1 (Macri and Loda, 1998; Pavletich, 1999; Atallah et al., 2004). As proteínas cdk4 e cdk6 e a ciclina D1 são recrutadas precocemente na fase G1, enquanto que a cdk2/ciclina regula a transição da fase G1 para a fase S (Sanchez and Dynlacht, 2005; Sherr, 1994). Alguns estudos mostraram que a infra-regulação das cdk4/6 cursa com uma diminuição na expressão da proteína supressora de tumor retinoblastoma (pRb), proteína chave para a transição da fase G1 para a fase S no ciclo celular (Nevins et al., 1997; Deshpande et al., 2005). A pRb, encontrado em grande quantidade na forma hipofosforilada na fase precoce G1, controla o ciclo celular por ligar-se à família E2F e desta forma promove uma inibição dos fatores de transcrição desta família, que são essenciais para a fase S (Deshpande et al., 2005; Weinberg, 1995; Kaelin, 1999; Harbour and Dean, 2000; Masciullo et al., 2000). A progressão da fase S no ciclo celular é

acompanhada por uma ativação transcripcional dos genes-alvo da E2F através da fosforilação de várias proteínas pelas cdk's (Sanchez and Dynlacht, 2005; Kasten and Giordano, 1998; Morris et al., 2000). Alguns trabalhos mostraram que membros da família do retinoblastoma são capazes de exercer supressão da atividade do crescimento devido às suas interações com os heterodímeros E2F/DP, cuja função é ativar a transcrição dos genes requeridos para a progressão do ciclo celular (Kasten and Giordano, 1998; Taya, 1997).

A proteína p53 é uma das maiores reguladoras da apoptose, e a expressão deste supressor tumoral sensibiliza as células para ocorrer apoptose em resposta ao stress (Sarfaraz et al., 2006). A supra-regulação da p53 resulta na sobreposição de mecanismos subjacentes que suprimem os mecanismos mitogênicos e os de sobrevivência celular com os que promovem o mecanismo de apoptose (Sarfaraz et al., 2006). Membros da família de proteínas Bcl-2 são reguladores críticos do mecanismo apoptótico (Strasser et al., 2000; Oltersdorf et al., 2005) e eles podem ser ativados pela supra-regulação da proteína p53 (Sarfaraz et al., 2006). A Bcl-2 é identificada como um potente supressor da apoptose (Hockenbery et al., 1993), sendo superexpresso em mais da metade dos tumores humanos. O mecanismo envolvido na supressão da apoptose se dá pela inibição do fator pró-apoptótico Bax, já que a Bcl-2 se liga ao Bax, formando um heterodímero inativado. Sendo assim, alterações nos níveis de Bax e Bcl-2 e conseqüentemente na proporção Bax/Bcl-2, são cruciais para determinar se as células vão sofrer apoptose sob condições experimentais que promovem morte celular (Sarfaraz et al., 2006).

Os estudos desta revisão descreveram vários mecanismos envolvidos nos efeitos antitumorais dos canabinóides *in vitro* e *in vivo*. Embora várias dessas ações tenha envolvido a ativação de receptores (ex: canabinóides, vanilóide) (Jacobsson et al., 2001; Blázquez et al., 2004; Bari et al., 2005), muitos estudos mostraram que estes efeitos ocorreram através de mecanismo receptor-independentes (Sarker et al., 2003; Kogan et al., 2007a). A importância de transportadores lipídicos de membrana nas ações antitumorais dos canabinóides também foi verificada em muitos estudos (Sarnataro et al., 2006; De Morrow et al.,

2007). Em relação aos mecanismos de sinalização intracelular, temos que muitos deles podem ser modulados pela ação dos canabinóides. São eles: MAPK, cálcio, ceramida, COX-2, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático, entre outros (Pushkarev et al., 2008). A relação dos canabinóides com estes mecanismos moleculares, bem como a relação dos mesmos com os mecanismos celulares serão aprofundados nas discussões específicas de cada tipo de câncer.

Destaca-se que o ciclo da esfingomielina tem mostrado uma importância central na regulação da função celular, sendo associado à morte celular programada (apoptose) em células tumorais no sistema nervoso central (Sánchez et al., 1998; Galve-Roperh et al., 2000; Salazar et al., 2009), bem como em células tumorais periféricas (Herrera et al., 2006; Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2009a, Olea-Herrero et al., 2009a). Vários trabalhos têm mostrado que os canabinóides podem modular o mecanismo de metabolização dos esfingolipídios através do aumento dos níveis intracelulares de ceramida (Guzmán et al., 2001b), um lipídio segundo mensageiro que controla o destino celular em diferentes sistemas (Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick, 2002).

Em relação aos mecanismos de sobrevivência celular, sabe-se que a sinalização celular mediada pela cascata PI3K/AKT ao estimular fatores de crescimento é essencial para a sobrevivência celular. Já o ERK 1/2 tem um comportamento dual e está envolvido tanto na proliferação celular como no sequestro do ciclo celular (Sarfaraz et al., 2006). A ativação da ERK 1/2 na morte celular/proliferação é complexa e depende de vários fatores, entre eles a duração do estímulo (Sarfaraz et al., 2006).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS GLIOMAS

A constituição do cérebro saudável inclui neurônios e glia, sendo a glia classificada em astrócitos, oligodendrócitos ou microglia (Cudaback and Stella, 2007). Os gliomas são classificados como tumores primários de origem na glia, sendo os astrocitomas os maiores representantes deste grupo (aproximadamente metade dos tumores cerebrais) (CBTRUS, 2005). Estes últimos são considerados altamente agressivos, geralmente com massa tumoral com alto grau de heterogeneidade e com proliferação microvascular significativa.

A OMS classifica os astrocitomas em baixo grau (I ou II) ou alto grau (III e IV) de malignidade, dependendo da sua localização e da taxa de crescimento. Astrocitomas anaplásticos (grau III) e glioblastoma multiforme (GBM – grau IV) representam os mais agressivos tumores primários do sistema nervoso central, sendo responsáveis por um terço dos diagnósticos de tumores cerebrais (Kleihues et al., 2002).

Esta revisão contemplou diversos mecanismos na indução dos efeitos antiproliferativos e antitumorais dos canabinóides nos gliomas, mediados ou não pelos respectivos receptores CB1 e CB2. Mecanismos apoptóticos e de sequestro do ciclo celular bem como mecanismos antiangiogênicos e antimetastáticos foram descritos *in vitro* e *in vivo* em diversos modelos tumorais. Os mecanismos moleculares bem como as vias de sinalização intracelular subjacentes aos efeitos celulares dos canabinóides foram exaustivamente pesquisados em muitos estudos.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

O primeiro estudo a descrever o efeito dos canabinóides nas células tumorais cerebrais foi o de End (1977). Neste estudo o autor descreveu que o delta-9-THC (100 μ M) reduziu o número de células tumorais C6 de ratos a

aproximadamente 13% das células de controle e que as mesmas voltaram a crescer após a remoção do delta-9-THC no dia 3, recuperando crescimento comparável às células de controle (End et al., 1977).

Vários anos se passaram até que no final da década de 1990 houve novamente o interesse de vários pesquisadores por esta temática. Galve-Roperh (2000) descreveu dois subclones das células C6 do glioma, C6.4 e C6.9, com características diferentes em relação à sensibilidade aos canabinóides. Ambos os subclones demonstraram mecanismos similares apenas com a administração do delta-9-THC por curto período de tempo. No entanto, as células C6.9 foram sensíveis e as células C6.4 foram resistentes ao tratamento quando o delta-9-THC foi exposto de forma mais prolongada (Galve-Roperh et al., 2000). Foi constatada morte celular apoptótica das células C6.9, a qual foi revertida apenas com a adição simultânea (mas não isolada) dos antagonistas dos receptores canabinóides CB1 (SR141716) e CB2 (SR144528).

Outros estudos mostraram o efeito apoptótico do delta-9-THC nas células C6 (Sánchez et al., 1998a; Gómez del Pulgar et al., 2002a; Goncharov et al., 2005; Blázquez et al., 2008a). Nas concentrações de (0.25-1 μ M) o delta-9-THC induziu apoptose em células C6.9 do glioma de forma concentração- e tempo-dependentes após 4-5 dias, sem a mediação do receptor CB1 (Sánchez et al., 1998a). Goncharov (2005) descreveu que a exposição por curto período de delta-9-THC (0.5, 2 μ M) provocou dano celular de células C6, sob estresse oxidativo, de forma concentração-dependente. Além disso, o aumento do tempo de exposição ao delta-9-THC provocou um efeito ainda mais evidente, levando à quase completa morte celular (com concentração de 2 μ M de THC). No entanto, diferente de Sanchez, 1998a, os efeitos foram mediados pelo receptor CB1 (Goncharov et al., 2005). Neste sentido, o delta-9-THC induz apoptose tanto por mecanismos dependentes como independentes da sinalização mediada pelos receptores CB1. Gómez Del Pulgar (2002a) mostrou que o delta-9-THC aumenta a síntese da ceramida *de novo* via indução da serina palmitoiltransferase, uma enzima regulatória da biossíntese do esfingolípido.

Outros canabinóides, além do delta-9-THC promovem apoptose das células C6. Jacobsson (2001) descreveu que a AEA e o 2-AG inibiram a proliferação destas células de forma tempo- e concentração- dependentes. Efeitos pró-apoptóticos da AEA também foram encontrados em suspensões de outras linhas de células, incluindo as células C6 (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2005). Vale ressaltar que os efeitos descritos por Jacobsson (2001) foram mediados pelos receptores canabinóides e vanilóide. De fato, a administração concomitante de SR141716 e SR144528, aboliu os efeitos antiproliferativos destes endocanabinóides. No entanto, a administração isolada destes compostos inibiu de forma discreta o efeito do 2-AG, mas não o da AEA. Curiosamente, em uma segunda etapa do estudo foi verificado que o AM251 (um antagonista dos receptores CB1) reverteu o efeito antiproliferativo da AEA enquanto que o AM630 (um antagonista dos receptores CB2) não teve nenhuma ação detectável. Quanto aos canabinóides sintéticos, o CP 55,940 (IC₅₀ 5.6 µM) e o JWH-015 (IC₅₀ 3.2 µM) tiveram efeitos antiproliferativos similares aos dos endocanabinóides. No entanto, neste caso, não houve mediação dos receptores canabinóides e vanilóide (Jacobsson et al., 2001).

Os efeitos dos antagonistas dos receptores canabinóides (tanto SR141716 + SR144528 ou AM251) verificados no estudo de Jacobsson (2001) divergem dos reportados por Macarrone (2000). No estudo de Macarrone, o número de corpos apoptóticos de células C6 incubadas com AEA (10 µM) por 48 h aumentou em 77% na presença de SR141716 e em 11% na presença de SR144528 (ambos 1 µM) (Macarrone et al., 2000). O efeito sinérgico do SR141716 e da AEA sobre a apoptose das células C6 foi confirmado por Bari (2005). As divergências entre o estudo de Jacobsson (2001) com os de Macarrone (2000) e Bari (2005) podem ser em decorrência de possíveis diferenças das propriedades das células C6 utilizadas nestes estudos, já que as células C6 apresentam subclones com diferentes sensibilidades aos efeitos dos canabinóides (Galve-Roperh et al., 2000).

Outros canabinóides foram avaliados no estudo de Jacobsson (2001) em células C6, entre eles o olvanil e a metanandamida (meAEA). Considerando que estes compostos, assim como a AEA, são agonistas dos receptores canabinóides

e vanilóide (Di Marzo et al., 1998b) seria esperado efeitos similares àqueles obtidos com a AEA. Curiosamente, a meAEA produziu efeitos mais discretos quando comparados aos da AEA (Jacobsson et al., 2001). Além disso, o Olvanil, embora tenha evidenciado efeito antiproliferativo, o mesmo não foi revertido por antagonistas dos receptores canabinóides e vanilóide (quando administrados tanto em combinação quanto de forma isolada), sugerindo que este composto independe da sinalização mediada por estes receptores. Embora não haja uma explicação clara para estes resultados divergentes, é possível que um determinado balanço entre a ativação dos diferentes receptores canabinóides seja necessário para a ocorrência dos efeitos antiproliferativos. No caso da AEA, concentrações requeridas para a ativação do receptor TRPV1 são aproximadamente 10 vezes maiores do que às necessárias para a ativação do receptor CB1 (Zygmunt et al., 1999; Smart et al., 2000). Já o Olvanil apresenta uma maior afinidade para o receptor TRPV1 (Di Marzo et al., 1998b; De Petrocellis et al., 2000).

Corroborando os achados de Jacobsson (2001), Fowler (2003) descreveu que a AEA e o 2-AG apresentaram efeitos antiproliferativos, que foram antagonizados pela administração de antagonistas dos receptores CB1 e TRPV1. Já o efeito antiproliferativo da meAEA não foram mediados por estes receptores. No entanto, o achado mais interessante é que o 1-AG ($IC_{50}=5.73\pm 0.06$) teve uma ação similar a do 2-AG ($IC_{50}=5.51\pm 0.04$), tanto em termos de eficácia quanto na sensibilidade ao antagonismo pela capsazepina e antagonistas dos receptores canabinóides. Este resultado poderia ser explicado pelo fato do 2-AG, em condições fisiológicas, ser rapidamente metabolizado em 1-AG (Savinainen et al., 2001; Rouzer et al., 2002), considerando as IC_{50} similares entre os compostos (Fowler et al., 2003). Curiosamente, tanto a capsazepina quanto o SB366791 (ambos antagonistas do receptor vanilóide), revertem o efeito do 1-AG. No entanto, a capsazepina foi significativamente mais efetiva. Portanto, neste modelo, o efeito da capsazepina pode ser tanto dependente quanto independente da sinalização mediada pelos receptores TRPV1. De fato, sabe-se que a capsazepina apresenta uma importante ação antioxidante (Garle et al., 2000).

Além disso, os efeitos antiproliferativos do 2-AG e da AEA foram prevenidos pelo alfa-tocoferol (Jacobsson et al., 2001).

Outras linhagens celulares, além da C6 sofrem apoptose após a exposição aos canabinóides. Carracedo (2006a) mostrou que o delta-9-THC (0-3 μ M) diminuiu a viabilidade celular e induziu apoptose das células C6.9 do glioma de ratos (mas não das células C6.4) e também das células U87MG do astrocitoma humano e das células Gos3 do oligodendroglioma humano. Adicionalmente, foi mostrado que os efeitos antiproliferativos deste canabinóide foram mediados pelos receptores CB1 e CB2 nas células U87MG (Carracedo et al., 2006a).

Em relação às células U87 e U251 do glioma humano, que expressam tanto o receptor TRPV1 quanto os receptores canabinóides (Contassot et al., 2004a), a AEA (3-100 μ M) diminuiu a viabilidade celular *in vitro* de forma concentração-dependente (Contassot et al., 2004a). Resultados similares foram verificados em células *ex vivo*, derivadas da biópsia de tumor (Ge227 e Ge228) (Contassot et al., 2004a). No entanto, a apoptose induzida pela AEA, não foi mediada pelos receptores canabinóides que, ao contrário, exibiram um efeito protetivo (Contassot et al., 2004a). Já o receptor vanilóide, mediou a apoptose induzida pela AEA (Contassot et al., 2004a). Todavia, o efeito da capsazepina nunca foi 100% ao final do período estudado, sugerindo um possível envolvimento de receptores adicionais. Ainda assim, é evidente a importância do receptor TRPV1 no efeito antiproliferativo da AEA. É possível que a supra-regulação deste receptor seja um mecanismo natural de prevenção da proliferação destas células. Contassot (2004a) relatou um aumento na expressão de RNAm de TRPV1 em gliomas de baixo grau de malignidade. Vale ressaltar que nas células dos gliomas, a expressão do receptor TRPV1 está restrita às células tumorais, estando ausente nas células vizinhas saudáveis (Contassot et al., 2004a), o que abre uma atrativa janela terapêutica. Evidências sugerem que a AEA, além de ativar os receptores CB1, CB2 e TRPV1, pode atuar como agonista de outros receptores ainda não identificados (Jarai et al., 1999; Wagner et al., 1999). Outro estudo sugere que a morte celular induzida pela AEA envolve a ativação de um receptor independente localizado na membrana do transportador lipídico (Contassot et al., 2004a). Vale

ressaltar que este último mecanismo foi descrito por Bari (2005) como possível mediador da apoptose das células C6 do glioma induzida pela AEA (seção abaixo).

Outro estudo com várias linhas de células do glioblastoma multiforme (GBM) (U87, U251, U373, SF126 e SF188), mostrou que o delta-9-THC (2 μ M) e o WIN 55,212-2 (1.25 μ M) reduziram significativamente o crescimento de todas as células analisadas num tratamento realizado por 7 dias (McAllister et al., 2005). A linhagem de células SF126 foi a mais sensível ao tratamento com os dois canabinóides (McAllister et al., 2005). Neste estudo, os efeitos do delta-9-THC (1 μ M) foram mais evidentes quando comparados aos do WIN 55,212-2 (1.25 μ M). Curiosamente, sabe-se que o WIN 55,512-2 tem tanto afinidade como eficácia significativamente maior para ambos os receptores CB1 e CB2 quando comparada ao delta-9-THC (Felder and Mitchell, 1995; Showalter et al., 1996; Pertwee, 1997). Neste sentido, as diferenças entre o efeito antiproliferativo do delta-9-THC e do WIN 55,512-2 não foram devidas aos receptores canabinóides. A atividade dos canabinóides através do mecanismo da ceramida pode explicar a aparente discrepância verificada nas potências entre o delta-9-THC e o WIN 55,212-2 no estudo de McAllister (2005), pois foram avaliados os efeitos de longa exposição aos canabinóides. Outra explicação pode ser a possível ativação de receptores adicionais além dos CB1 e CB2 (Massi et al., 2004; Breivogel et al., 2001), já que os efeitos antiproliferativos tanto do delta-9-THC quanto do WIN 55,212-2 foram apenas parcialmente revertidos quando os antagonistas CB1 ou CB2 foram administrados isoladamente ou de forma combinada (McAllister et al., 2005). Finalmente, em outro estudo em que o delta-9-THC e o WIN 55,212-2 foram administrados por via intratumoral, foi constatado que este último teve uma maior eficácia que o primeiro (mesmo na concentração de 10% daquela utilizada pelo delta-9-THC) na diminuição dos tumores de ratos inoculados com células C6.9 do glioma (Galve-Roperh et al., 2000). Vale ressaltar que naquele estudo estes canabinóides aumentaram a sobrevivência dos ratos e houve casos de erradicação total dos tumores (Galve-Roperh et al., 2000).

Ainda em relação às células de gliomas humanos, Massi (2004) descreveu que o fitocanabinóide canabidiol (CBD) inibiu o crescimento de células tumorais *in vitro* (U87 e U373) e *in vivo* (U87). No entanto, não ficou totalmente esclarecido o mecanismo através do qual o CBD produziu a apoptose e os efeitos antiproliferativos. O CBD afetou a viabilidade das células U373 e U87 de forma concentração- (a partir de 15 μM) e tempo- (a partir de 24 hs) dependentes, sendo este efeito mediado parcialmente pelo receptor canabinóide CB2 (Massi et al., 2004). A ação inibitória do CBD reportada por Massi (2004) contrasta com o efeito modesto deste canabinóide descrito por Jacobsson (2000) nas células C6 do glioma sob as mesmas condições deste estudo (ausência de soro). No que se refere aos experimentos *in vivo*, no 18º dia de tratamento o canabidiol (0,5 mg/kg) diminuiu em 70% o tamanho do tumor, enquanto que no 23º dia de tratamento a diminuição foi de 50% (Massi et al., 2004). Neste sentido, é possível que possa haver tolerância quanto aos efeitos do canabidiol. Finalmente, os efeitos *in vitro* não foram mediados por receptores canabinóides CB1, TRPV1 e outros receptores acoplados à proteína Gi/G0 (Massi et al., 2004). Sendo assim, a despeito da presença de receptores canabinóides nas células dos gliomas, os mesmos apresentam pouco envolvimento sobre a ação do CBD (Showalter et al., 1996; Bisogno et al., 2001a). Este estudo diverge de evidência pregressa que sugere que o CBD pode se ligar aos receptores vanilóides (Bisogno et al., 2001a).

As células U87 do glioma humano bem como as células C6 do glioma de ratos, também foram utilizadas como amostra para a avaliação dos efeitos antitumorais dos canabinóides AJA e delta-8-THC (Recht et al., 2001). Em estudo *in vitro* com células C6 do glioma, o AJA (0-100 μM) (agonista dos receptores CB2), e o delta-8-THC (0-100 μM) (agonista dos receptores CB1 e CB2) inibiram similarmente a proliferação celular de forma concentração-dependente em estudo realizado por 48 hs (Recht et al., 2001). Vale ressaltar que nas linhas de células C6 e U87 *in vitro*, a efetividade do AJA, além de superior a do delta-8-THC, foi mantida em estudo com longa duração (5 dias) (Recht et al., 2001). A maior efetividade do AJA em relação ao delta-8-THC foi corroborada em experimento *in vivo* em ratos marcados com células U87MG tratados por 22 dias. No entanto, no

final do tratamento, a diminuição deixou de ser significativa, embora suas médias de diâmetro continuassem a ser menores que nos do grupo controle (Recht et al., 2001).

Em outro estudo comparativo da eficácia entre agonista de receptor CB2 (KM-233) e agonista de receptores CB1 e CB2 (delta-8-THC), constatou-se que o KM-233 foi tão eficaz quanto o delta-8-THC (ambos em concentração de 5 μ M) em diminuir a viabilidade celular das células U87 (Duntsch et al., 2006). Vale ressaltar que este efeito foi superior ao quimioterápico anti-glioma comumente usado, BCNU (300 μ M) (Duntsch et al., 2006). Resultados similares foram obtidos em estudo com células U373 do glioma humano e em células C6 e F98 de gliomas de ratos (dados não mostrados), indicando que os efeitos tóxicos do KM-233 ocorrem a despeito da linha de célula ou da espécie testada (Duntsch et al., 2006). Já o experimento *in vivo*, mostrou que o KM-233 (2 mg/kg) tanto por via intratumoral quanto sistêmica diminuiu significativamente o volume dos tumores de ratos marcados com células U87 (Duntsch et al., 2006). O fato do KM-233 ativar os receptores canabinóides e somente em seguida promover alquilação do DNA (enquanto o BCNU age exclusivamente sobre o último mecanismo) sugere a possibilidade de um efeito sinérgico destes compostos (Duntsch et al., 2006).

A apoptose foi o mecanismo de morte celular mais descrito nos estudos avaliados. No entanto, outros mecanismos de inibição do crescimento e da proliferação celular do glioma foram identificados nesta revisão sistemática. Recht (2001) descreveu que o efeito antiproliferativo do AJA nas células C6 do glioma envolveu mecanismos citostáticos (não apoptose e não necrose), com influência mínima na progressão do ciclo celular, ficando as células remanescentes com uma alta taxa (95%) de viabilidade. Já Ellert-Miklaszewska (2005) descreveu que o WIN 55,212-2 reduziu a viabilidade celular das células C6, induziu apoptose e apresentou efeito antiproliferativo através do bloqueio da progressão do ciclo celular, além de aumentar a porcentagem de células na população apoptótica sub-G1. Galanti (2008), por sua vez, mostrou em experimento *in vitro* que o delta-9-THC promoveu morte das células do glioblastoma multiforme (U251 e U87) por

mecanismos não apoptóticos e que os efeitos antiproliferativos foram decorrentes de mecanismo de sequestro do ciclo celular.

Finalmente, esta revisão sistemática identificou um estudo em humanos (Guzmán et al., 2006). Neste estudo, os efeitos do delta-9-THC foram pesquisados em pacientes com glioblastoma multiforme recorrente. Na amostra, foram incluídos nove pacientes que não tiveram sucesso com as terapias-padrão (cirurgia e radioterapia) e que apresentavam claras evidências de progressão tumoral. Os mesmos também apresentavam alterações moderadas na performance física (média KPS = 81) (Guzmán et al., 2006). Guzmán mostrou que a administração intratumoral do canabinóide, através de catéter intracraniano inserido durante o segundo procedimento de ressecção tumoral cirúrgica dos pacientes, foi segura e sem efeitos colaterais excessivos, não tendo havido significantes alterações físicas, neurológicas, bioquímicas e hematológicas em nenhum dos pacientes (Guzmán et al., 2006). Em relação aos efeitos do delta-9-THC na sobrevivência dos pacientes, este estudo mostrou-se inconclusivo. Por outro lado, foi relatado que o delta-9-THC não induziu crescimento tumoral nem diminuiu a sobrevivência dos pacientes (Guzmán et al., 2006). Em relação aos parâmetros celulares do tumor, foi mostrado que o delta-9-THC, *in vivo*, reduziu a proliferação celular tumoral (imunoensaio Ki67) em dois pacientes (Guzmán et al., 2006). Estes mesmos pacientes também apresentaram uma discreta diminuição da vascularização de seus tumores (imunoensaio CD31) *in vivo*, (Guzmán et al., 2006). Por outro lado, os experimentos *in vitro*, realizados com material de biópsia dos tumores destes pacientes, mostraram que o delta-9-THC diminuiu a viabilidade das células do glioblastoma multiforme. Este efeito ocorreu, pelo menos em parte, por morte celular apoptótica e foi mediado pelos receptores CB1 e CB2. Adicionalmente, foi verificado um pequeno declínio na expressão do receptor CB1 e nenhuma mudança na expressão do receptor CB2, provavelmente pela ligação predominante do delta-9-THC ao CB1 ou à alta susceptibilidade deste receptor à dessensibilização. A limitação deste estudo baseia-se no fato que a infusão da droga por cateter provavelmente não atinge todo o tumor em casos de tumores maiores. Portanto, é necessária a realização de novos estudos utilizando

soluções de THC com melhor perfil de distribuição, buscando atingir o tumor em sua integridade. Adicionalmente, se faz necessária a busca de vias de administração não invasivas e menos traumáticas para o paciente.

Tendo em vista a importância de mecanismos precoces ao desencadeamento da morte celular tumoral, Salazar (2009) mostrou que o delta-9-THC (5 μ M) induziu um mecanismo celular autofágico que precedeu a morte celular apoptótica, tanto nas células tumorais dos gliomas humanos (U87MG, T98G, U373MG) como nas células tumorais pancreáticas, da mama e do hepatoma (dados não mostrados). Este mecanismo celular autofágico foi seletivo nas células cancerígenas e envolveu a sinalização mediada pelos receptores CB1. Adicionalmente, este mecanismo foi verificado também *in vivo* em tumores de ratos marcados com células tumorais humanas U87MG (Salazar et al., 2009). A autofagia tem sido proposta como protetora da apoptose, como um mecanismo alternativo desta e também como tendo ação conjunta com a apoptose em um mecanismo combinado para a morte celular (Maiuri et al., 2007; Yousefi et al., 2006). No caso do estudo de Salazar (2009), houve a descrição de uma interconexão desses dois processos celulares no controle do crescimento tumoral em resposta ao canabinóide delta-9-THC.

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Galve-Roperh (2000) descreveu os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos apoptóticos do delta-9-THC em cultura de células C6.9 dos gliomas. Neste estudo, foi destacada a importância da ativação sustentada da Raf1 e da acumulação de ceramida sobre a apoptose induzida pelo delta-9-THC. A Raf1 é extremamente importante para o controle do destino celular e envolve a ativação da cascata bioquímica mediada pela cinase ERK (cinase regulada por sinal extracelular). Já a acumulação de ceramida promove uma inibição sustentada da Akt (Gómez del Pulgar et al., 2002b), bem como de outras proteínas cinases, como a c-Jun N-terminal cinase (JNK) e p38 MAPK (cinase ativada por mitógeno)

(Galve-Roperh et al., 2000). A ação apoptótica do delta-9-THC foi condicionada ao pico prolongado da ativação ERK, pois o inibidor seletivo da cascata ERK (PD098059) inibiu a morte celular das células C6 do glioma induzidas pelo delta-9-THC. Portanto, a ativação sustentada da ERK foi mediadora da ação apoptótica induzida pelo delta-9-THC. Adicionalmente, Gómez Del Pulgar (2002) constatou em células C6 uma relação direta entre o acúmulo de ceramida e a ativação da ERK em decorrência da exposição ao delta-9-THC. A mediação da apoptose pelo aumento da atividade da ERK, induzida pelos canabinóides, também foi descrita em células vasculares endoteliais (Blázquez et al., 2003). Vale ressaltar que a ativação da cascata ERK guarda uma relação diretamente proporcional à proliferação celular (Derkinderen et al., 1999). No entanto, em algumas situações a mesma media o sequestro celular (Pumiglia et al., 1997), antiproliferação (York et al., 1998), assim como morte celular por apoptose (Mohr et al., 1998), ou não-apoptose (Murray et al., 1998), incluindo de células neurais (Galve-Roperh et al., 2000). Portanto, a relação entre a ativação da ERK e o destino celular é extremamente complexa. Sabe-se que a mesma depende de vários fatores (Velasco et al., 2004), entre eles o estímulo que ativa a ERK (Marshall, 1998).

Além do aumento de ceramida e ativação da ERK, existem outros mecanismos moleculares associados a apoptose. Massi (2004) descreveu que o efeito apoptótico do CBD em células de glioma humano (U87 e U373) não foi mediado pela acumulação de ceramida, mas sim, ao menos em parte, por estresse oxidativo. De fato, o alfa-tocoferol inibiu parcialmente os efeitos antiproliferativos do CBD (Massi et al., 2004). Estes achados foram posteriormente confirmados em outro estudo de Massi (Massi et al., 2006), no qual o CBD (25 μ M) induziu apoptose via estresse oxidativo, aumentando a expressão de substâncias oxidativas reativas ao estresse e diminuindo a ação intracelular de glutatona (GSH). Outro mecanismo adicional incluiu a ativação das caspases (mecanismo 'mitocondrial' e 'morte-receptor') (Massi et al., 2006). Vale lembrar que o mecanismo de morte 'mitocondrial' envolve a liberação de citocromo c da membrana mitocondrial (Massi et al., 2006), e está presente nos efeitos do delta-9-THC e AEA (Macarrone et al., 2000; Sarafian et al., 2003). Outro mecanismo

potencial do CBD envolve a ativação da fosfolipase A2 e o consequente aumento intracelular de ácido araquidônico (Chan et al., 1998).

Em um outro estudo, Goncharov (2005) demonstrou que células C6 do glioma sob exposição prolongada ao delta-9-THC, sob estresse oxidativo (utilizando quelante quinona Fe(III) que permeia as células), sofreram danos celulares mais intensos quando comparados aos efeitos da exposição ao canabinoide por um curto período de tempo. Adicionalmente, a utilização de quinona e delta-9-THC, no contexto de ausência de glicose, provocaram danos celulares maiores que aqueles observados com a longa exposição ao delta-9-THC (Goncharov et al., 2005). Importante ressaltar que outros estudos mostram uma relação entre o delta-9-THC com o destino da glicose. Sánchez (1997a, 1998b) mostrou que o delta-9-THC aumenta o metabolismo de glicose, enquanto que Goncharov (2005) relatou que o delta-9-THC diminuiu a captação de glicose. Possivelmente estes dois eventos ocorrem concomitantemente, provocando uma diminuição expressiva da reserva de energia celular, tornando-as mais sensíveis ao estresse oxidativo (Goncharov et al., 2005). Nestas mesmas células (C6), Jacobsson (2000) descreveu que os efeitos antiproliferativos da AEA e do 2-AG são revertidos pela administração de alfa-tocoferol. Sarker (2000) descreveu efeitos similares da AEA em células PC-12, sendo constatado um aumento intracelular de superóxido, que foi revertido pela N-acetil cisteína, um agente antioxidante.

Além da indução de estresse oxidativo, outros mecanismos foram descritos para os efeitos apoptóticos da AEA nas células C6. Bari (2005) mostrou que a apoptose foi mediada por mecanismo de transporte lipídico, pois o depletor da membrana do colesterol (MCD) reverteu a apoptose induzida pela AEA. Adicionalmente, a AEA diminuiu a ativação da MAPK e da PI3K e aumentou a liberação de citocromo c pela mitocôndria, sendo que todos estes efeitos foram mediados pela membrana de transporte lipídico (Bari et al., 2005).

Mecanismos adicionais envolvidos na ação dos canabinóides incluem a modulação da lipooxigenase (LOX). Massi (2008) descreveu que o CBD inibiu o crescimento tumoral das células do glioma humano (U87), pelo menos em parte,

através da infra-regulação da 5-LOX. Adicionalmente, o inibidor da 5-LOX, MK-866, potencializou o efeito antiproliferativo do CBD. Vale ressaltar que a superexpressão e/ou ativação da 5-LOX está relacionada com desenvolvimento de tumores (Manev et al., 2000; Montine & Morrow, 2005). Adicionalmente, sabe-se que o CBD modula a homeostase intracelular de cálcio (Drysdale et al., 2006; Ligresti et al., 2006), assim como a produção de ROS (Massi et al., 2006; Mckallip et al., 2006) e que estes dois elementos tem uma relação direta com a LOX (Massi et al., 2008). Portanto, estes resultados sugerem que a 5-lipooxigenase tem um papel crucial no controle da proliferação celular do glioma (Massi et al., 2008).

Outro mecanismo importante dos canabinóides envolve a atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2), Hinz (2004a) descreveu que a meAEA é capaz de ativar a COX-2, e conseqüentemente, aumentar a produção de prostaglandina E2 (PGE2) em células tumorais H4 do glioma humano. Estes efeitos (bem como sua ação apoptótica) foram antagonizados pelo inibidor da COX-2, celecoxibe (Hinz et al., 2004a). Vale ressaltar que a administração de PGE2 também diminuiu a viabilidade celular e promoveu apoptose nas células H4 (Hinz et al., 2004a). Já o delta-9-THC, diferente da meAEA, apresentou efeitos antiproliferativos por mecanismos não relacionados à COX-2 (Hinz et al., 2004a). Finalmente, os efeitos observados com a meAEA não foram mediados pelos receptores canabinóides, mas sim, pelo menos em parte, pelo acúmulo de ceramida (Hinz et al., 2004a). Em um outro estudo utilizando-se da mesma linhagem de células, Eichele (2006) descreveu que a meAEA induziu morte apoptótica mitocondrial, envolvendo portanto a liberação de citocromo c e a ativação das caspase 9, 3 e PARP. Estes efeitos foram mediados pela COX-2 e pelo mecanismo de caspases, já que os inibidores da COX-2 e da caspase 3 antagonizaram os efeitos da meAEA.

Em relação aos efeitos antitumorais dos canabinóides e os mecanismos de sobrevivência, Ellert-Miklaszewska (2005) mostrou que o WIN 55,212-2 infra-regulou a Akt e a ERK1/2 antes do aparecimento de qualquer sinal de apoptose nas células C6. Adicionalmente, o WIN 55,212-2 ativou a caspase 9 no início do tratamento (Ellert-Miklaszewska et al., 2005), indicando envolvimento da mitocôndria (Ellert-Miklaszewska et al., 2005; Massi et al., 2006), bem como ativou

as caspases 3 e 7 (Ellert-Miklaszewska et al., 2005), que são executoras da apoptose. Além disso, o WIN 55,212-2 diminuiu a fosforilação da proteína Bad. Esta proteína pró-apoptótica pode ter uma importante ligação entre a infra-regulação dos mecanismos de sobrevivência e a ativação das caspases evocadas pelo tratamento com canabinóide, resultando na morte celular do glioma (Ellert-Miklaszewska et al., 2005). Evidências prévias sugerem que a inibição de cinases que tem como alvo a Bad, incluindo a Akt (Datta et al., 1997; Zha et al., 1996) e a ERK1/2 (Scheid and Duronio, 1998), pode iniciar o processo de apoptose. Isso se deve à formação de heterodímeros entre a Bad não fosforilada e os supressores da morte celular da família Bcl-2, levando a um rompimento da integridade da membrana mitocondrial e à liberação de proteínas mitocondriais (Yang et al., 1995).

Quanto aos mecanismos envolvidos no sequestro do ciclo celular, características intrínsecas ocorrem nas células dependendo da fase do ciclo em que ocorre este bloqueio. Em estudo com células tumorais do astrocitoma humano (U251MG e U87MG), Galanti (2008) descreveu que o delta-9-THC alterou o conteúdo das proteínas que regulam a progressão do ciclo celular. O conteúdo celular de E2F1 e Ciclina A, duas proteínas que promovem a progressão do ciclo celular, foi diminuído tanto nas células U251MG quanto nas células U87 MG. O declínio dos níveis de E2F1 foi decorrente da degradação mediada pelo proteasoma, já que foi revertido pelos inibidores de proteasoma (MG132). Adicionalmente, houve um aumento nos níveis de p16INK4A, um inibidor do ciclo celular (Galanti et al., 2008). A proteína E2F1 é um mediador essencial para a proliferação e a sobrevivência das células (Dyson, 1998). A importância da diminuição da E2F1 pelo delta-9-THC pode ser devida ao achado de que a timidilato sintase (TS), cuja expressão é controlada pela E2F, foi infra-regulada pelo tratamento das células com delta-9-THC (Galanti et al., 2008). Este achado tem grande relevância clínica, pois estudos clínicos mostraram níveis elevados de RNAm e proteína da TS em vários cânceres humanos com potente invasividade tumoral e metástases (Nomura et al., 2002; Mizutani, et al. 2003; Shintani et al., 2003).

A Ciclina A é uma proteína regulatória do ciclo celular que funciona nas fases S e G2 e pode se ligar e ativar a cinase 2 dependente de ciclina (cdk2) e a cinase 1 dependente de ciclina (cdk1) (Pagano et al., 1992). Galanti (2008) mostrou que o delta-9-THC supra-regulou a p16INK4A, uma proteína inibidora da cinase dependente de ciclina (Galanti et al., 2008). Nos gliomas, a p16INK4A é inativada em mais de 50% dos casos (Schmidt et al., 1994; Kyritsis et al., 1996; Costello et al., 1996). A supressão da progressão do ciclo celular através da E2F1 parece ser multifatorial: a p16INK4A suprime a progressão do ciclo celular pela fosforilação da RB (retinoblastoma) mantendo, dessa forma, a E2F1 num complexo transcricional inativo com a RB, em adição à degradação das proteínas mediada pelo proteasoma assim como pela diminuição de mRNA em resposta ao delta-9-THC (Galanti et al., 2008). O mecanismo de sequestro do ciclo celular também foi verificado em células de epiteloma da tireóide, onde o canabinóide ativou a p27 Kip1 (um inibidor de cinase dependente de ciclina) (Portella et al., 2003). Considerando que os canabinóides diminuem a atividade da Akt em células de gliomas (Gómez del Pulgar et al., 2002b), e que a Akt inibe a ação da p27 kip1 (Viglietto et al., 2002), é possível que o mecanismo Akt / p27 kip1 esteja envolvida na ação dos canabinóides nos gliomas (Velasco et al., 2004).

Sabe-se que mecanismos precoces que antecedem a desregulação dos mecanismos de sobrevivência celular, bem como outros mecanismos que levam à morte celular tumoral, como a ativação da cascata de caspases são alvos importantes da ação dos canabinóides. Salazar (2009) mostrou que o delta-9-THC promove estresse do retículo endoplasmático durante a indução de autofagia e posterior apoptose das células tumorais (U87MG, T98G e U373MG) do glioma humano (Salazar et al., 2009). Evidências prévias mostraram que a ceramida induz estresse do retículo endoplasmático (Swanton et al., 2007; Kolesnick et al., 2007) e autofagia (Lavieu et al., 2007). Adicionalmente, a fosforilação do eIF2 α (marcador da resposta de estresse do retículo endoplasmático) está presente em processos de autofagia em resposta a diferentes situações (Talloczy et al., 2002; Kouroku et al., 2007; Hoyer-Hansen and Jaattela, 2007). O estudo de Salazar (2009) demonstrou que a supra-regulação do mecanismo p8-TRB3, que foi

previamente implicada na evocação da morte celular pelo canabinóide (Carracedo et al., 2006a), constitui o mecanismo pelo qual a ceramida sintetizada *de novo* e a fosforilação do eIF2 α promovem autofagia. Portanto, este mecanismo representa uma nova conexão entre o estresse do retículo endoplasmático e a autofagia (Salazar et al., 2009). Os dados deste estudo também demonstram que o mecanismo regulado pela ativação da p8 é baseado em sua habilidade de inibir o eixo Akt/mTORC1 (Salazar et al., 2009). A supra-regulação da TRB3 induzida pelo delta-9-THC aumenta a sua interação com a Akt, diminuindo a fosforilação dessa cinase e de seus substratos diretos, TSC2 e PRAS40, os quais provocam a inibição da mTORC1 (Salazar et al., 2009). Adicionalmente, outros estudos mostraram a TRB3 como inibidora da Akt (Du et al., 2003; Matsushima et al., 2006). Além da indução de autofagia, o mecanismo p8-TRB3 mostrou ser essencial para a ação antitumoral do delta-9-THC (Salazar et al., 2009; Carracedo et al., 2006a).

Os vários experimentos realizados no estudo de Salazar (2009) possibilitaram a avaliação dos eventos sequenciais envolvidos na morte celular tumoral induzida pelo delta-9-THC. A ativação do receptor CB1 promoveu o acúmulo de ceramida, que por sua vez ativou a resposta precoce do estresse do retículo endoplasmático (Carracedo et al., 2006a; Salazar et al., 2009). Esta resposta precoce mediou a fosforilação da EIF2 α (Salazar et al., 2009) bem como a supra-regulação da p8, com consequente supra-regulação da ATF3 (Carracedo et al., 2006a; Salazar et al., 2009). Adicionalmente, o aumento da p8 e da ATF3 induziram autofagia das células tumorais pela inibição do eixo Akt/mTORC1 (Salazar et al., 2009). Finalmente, houve ativação da cascata de caspases e morte celular apoptótica (Salazar et al., 2009).

Análise de tumores de ratos marcados com células tumorais U87MG também revelou aumento da expressão da p8 (Carracedo et al., 2006a) e TRB3 (Carracedo et al., 2006a; Salazar et al., 2009). Adicionalmente, foi verificada uma diminuição da fosforilação da S6 (que provoca inibição do sistema AKT/mTORC1), formação aumentada de células no estágio LC3-II (sinal de autofagia) e observação de ativação da caspase-3 (sinal de apoptose) (Salazar et al., 2009).

Estes efeitos também foram observados nos tumores em que houve transferência de p8 para os mesmos (alta quantidade de p8), bem como nos tumores em que houve transferência de proteína essencial para a autofagia, ATG5 (alta quantidade de ATG5), o que demonstra que o mecanismo de morte celular pela ativação da autofagia é indispensável para a ação antitumoral canabinóide (Salazar et al., 2009).

A análise de biópsias de 2 pacientes com glioblastoma multiforme tratados com delta-9-THC, por sua vez, também revelou um aumento da expressão da p8 (Carracedo et al., 2006a) e da TRB3 (Salazar et al., 2009). Adicionalmente, foi verificada uma diminuição da fosforilação da S6, bem como um aumento no número de células com fenótipo autofágico e caspase-3 ativada (Salazar et al., 2009). Estes dados sugerem que a administração de canabinóide poderia ativar a morte celular, mediada pela autofagia, também em tumores humanos (Salazar et al., 2009).

Por fim, deve ser considerado de relevância clínica o fato de que as concentrações de delta-9-THC usadas no estudo de Salazar (2009) foram semelhantes às administradas intracranialmente em pacientes que apresentaram morte celular mediada pela autofagia (Guzmán, 2003). Além disso, os efeitos antitumorais (autofagia e apoptose) em ratos com tumores marcados com células U87MG foram decorrentes de administração de delta-9-THC via intraperitoneal (Salazar et al., 2009).

INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE TUMORAL

Os gliomas adquirem o seu suprimento sanguíneo principalmente por vasos cerebrais normais já existentes, formando uma massa tumoral bem vascularizada sem a necessidade de iniciar a angiogênese (Holash et al., 1999; Zagzag et al., 2000; Vajkoczy et al., 2002). Assim que a vasculatura conjunta com os vasos normais regridem e as células malignas passam a proliferar rapidamente, há a progressão dos gliomas e os mesmos se tornam hipóxicos (Blázquez et al., 2004).

Esta condição de hipóxia, por sua vez, induz um robusto processo angiogênico através do sistema VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e Ang2 (angiopoetina-2). Este brotar de novos vasos distingue o astrocitoma grau IV (GBM) dos baixos graus de astrocitomas (Holash et al., 1999; Zagzag et al., 2000; Vajkoczy et al., 2002).

Para crescerem, os tumores precisam gerar uma nova vasculatura de suporte (angiogênese) para nutrição da célula tumoral, troca de gases e eliminação de resíduos. Portanto, bloquear o processo de angiogênese constitui-se em uma das mais promissoras estratégias antitumorais disponíveis (Kerbel & Folkman, 2002; Huang et al., 2003; Willett et al., 2004).

Análise histoquímica e funcional em modelos de gliomas em ratos (Blásquez et al., 2003) mostraram que a administração de canabinóide transforma a hiperplasia característica dos tumores em crescimento ativo em um padrão no qual os vasos sanguíneos tornam-se pequenos, diferenciados e com capilares impermeáveis (Velasco et al., 2004). A inibição da angiogênese tumoral pelos canabinóides envolve pelo menos dois mecanismos: i. inibição direta da migração celular e da sobrevivência das células da vasculatura endotelial; ii. supressão de fatores pró-angiogênicos (Casanova et al., 2003; Blázquez et al., 2003; Portella, et al. 2003) e da expressão da matriz metaloproteinase (MMP) nos tumores (Blázquez et al., 2003). A observação de que os canabinóides agem diretamente nas células vasculares endoteliais é sustentada por evidências recentes, as quais mostram que as células vasculares endoteliais expressam receptores CB1 (Wagner et al., 1997; Bátkai et al., 2001; Ros et al., 2002) e CB2 funcionais (Blázquez et al., 2003). Vale ressaltar que os receptores canabinóides modulam funções essenciais da célula endotelial, como migração e proliferação (Blázquez et al., 2003). Por outro lado, não deve ser descartada a existência de receptores endoteliais não-CB1 e não-CB2 em alguns vasos sanguíneos (Járai et al., 1999).

Os fatores proangiogênicos VEGF e Ang2 são essenciais na vascularização dos gliomas e de outros tipos de tumor (Casanova et al., 2002; Holash et al., 1999; Maher et al., 2001), sendo que a VEGF é a mais importante citocina

proangiogênica, tanto em condições fisiológicas como patológicas (Blázquez et al., 2003). A Ang2, por sua vez, não é expressa no cérebro humano sadio, mas é induzida significativamente nos gliomas humanos, contribuindo para um aumento expressivo da angiogênese e do crescimento tumoral, pelo menos na presença de VEGF (Holash et al., 1999; Maher et al., 2001; Zagzag et al., 2000). A administração de canabinóides diminui a expressão dos maiores fatores proangiogênicos (Blázquez et al., 2003). A maioria dos tumores sólidos apresenta alta expressão de Ang2, associada a aumento da atividade MMP-2 (matriz metaloproteinase-2) e aumento da permeabilidade celular, características estas antagônicas aos tumores tratados com canabinóides (Blázquez et al., 2003).

Em estudo com biópsias obtidas de tumores de ratos marcados com células C6 do glioma (Blázquez et al., 2004), foi mostrado que o tratamento com canabinóide (JWH-133, 100 nM; WIN 55,212-2, 100 nM e AEA, 2 μ M) inibe a expressão do VEGF e subsequente ativação de seu receptor, VEGFR-2. Resultados similares foram verificados em biópsias obtidas de 2 pacientes com GBM após tratamento com delta-9-THC (Blázquez et al., 2004). Estas observações, contudo, não excluem a possibilidade de que os canabinóides possam diminuir a atividade do VEGF de forma indireta, através de alvos em outros processos mediados por receptores que estimulam o sistema VEGF (Blázquez et al., 2004).

Sabe-se que a ceramida, um lipídio segundo mensageiro que controla o destino celular em diferentes sistemas (Hannun and Obeid, 2002; Kolesnick, 2002), também inibe tanto a produção de VEGF como a ativação de seu receptor, indicando que a ceramida tem um papel central na ação anti-angiogênica dos canabinóides (Velasco et al., 2004). Portanto, os canabinóides inibem o crescimento tumoral ao ativar receptores canabinóides tanto nas células tumorais quanto nas células da vasculatura endotelial. Pela inibição da migração e sobrevivência da célula endotelial, os canabinóides irão prevenir diretamente a formação de vasos sanguíneos. Já no alvo tumoral, os canabinóides irão induzir apoptose das células tumorais e também suprimir os fatores pro-angiogênicos e a

produção de MMP, desta forma bloqueando o crescimento tumoral e a angiogênese.

EFEITO ANTIMIGRATÓRIO (ANTIMETASTÁTICO)

A ação da matriz metaloproteinases (MMPs) e de seus inibidores (tecidos inibidores da matriz metaloproteinases – TIMPs) tem um papel central na migração e na invasividade das células tumorais (Blázquez et al., 2008a). Aumento da expressão e ativação das MMPs, incluindo a MMP-2 (Eglebad and Werb, 2002; Overall and Kleinfeld, 2006; Rao, 2003; Nakada et al., 2007) foi identificado na maioria dos cânceres humanos, comparados com tecidos normais, sendo este aumento associado a prognóstico pobre (Eglebad and Werb, 2002; Deryugina and Quigley, 2006; Overall and Kleinfeld, 2006). Adicionalmente, o mais proeminente inibidor MMP, TIMP-1, é seletivamente supra-regulado em vários tumores (ex: mama, gástrico, coloretal, entre outros), também sendo associado a prognóstico pobre (Hornebeck et al., 2005; Würtz et al., 2005; Yasui et al., 2005; Chirco et al., 2006). Este achado se deve, pelo menos em parte, a ações do TIMP-1 independentes da MMP, como promoção da proliferação e sobrevivência celular do tumor assim como da angiogênese tumoral (Hornebeck et al., 2005; Chirco et al., 2006). Ainda assim, pesquisas adicionais são necessárias para determinar se a inibição do TIMP-1 induzida pelo canabinóide está relacionada com suas ações antitumorais nos gliomas, como na inibição da migração celular tumoral (Blázquez et al., 2008a), na indução de morte celular tumoral e na inibição da angiogênese tumoral (Blázquez et al., 2008a). Salienta-se que, nas células tumorais HeLa (carcinoma cervical humano), o aumento (e não a diminuição) do TIMP-1, induzido pelo delta-9-THC, foi associado à diminuição da invasividade destas células (Ramer and Hinz, 2008).

Ao explorar o efeito dos canabinóides sobre o TIMP-1 (Blázquez, 2008a) e a MMP-2 (Blázquez et al., 2008b), esta autora descreveu que a administração peritumoral de delta-9-THC diminuiu o crescimento do tumor e a expressão de

TIMP-1 e MMP-2 em ratos imunodeficientes marcados com células C6.9 do glioma (mas não nos ratos marcados com células C6.4). Esta ação foi mimetizada pelo JWH-133 (um agonista do receptor canabinóide CB2) e inibida pela fumonisina B1, sugerindo uma relação direta da ceramida neste mecanismo. Similar diminuição de TIMP-1 e de MMP-2 foi constatada em material de biópsias adquiridas de dois pacientes com GBM tratados com delta-9-THC (Blázquez et al., 2008a; 2008b). Os achados *in vitro* foram corroborados por estudos *in vivo*. O delta-9-THC diminuiu o mRNA de TIMP-1 e de MMP-2 em cultura de células C6.9 do glioma, efeito este não verificado em cultura de células C6.4 (resistentes) (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b). Durante o período de avaliação (24 hs), o delta-9-THC não diminuiu a viabilidade das células C6.9, mostrando que as expressões do TIMP-1 e da MMP-2 precedem a apoptose evocada pelo canabinóide (Blázquez et al., 2008a).

A diminuição das expressões do TIMP-1 e do MMP-2 também foi observada em várias linhas de células do astrocitoma humano *in vitro* após a administração de delta-9-THC (SW1088, T98 G, U87 MG e U118 MG, células do GBM) (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b). Estas ações também foram mediadas pela ceramida, pois outro inibidor seletivo da síntese de ceramida *de novo*, ISP-1, bloqueou os efeitos encontrados pelo delta-9-THC. Outro elemento envolvido nos efeitos deste canabinóide foi a proteína de stress p8, já que a diminuição da sua expressão reverteu os efeitos do delta-9-THC sobre a expressão do TIMP-1 e da MMP-2 (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b).

A migração celular do glioma também foi avaliada em cultura de células C6 e U87. Neste estudo foi constatado que o delta-9-THC (1.5 μ M) inibiu a migração destas células, ao menos em partes, via ativação de receptores CB2 (exceção feita para as células C6.4) (Blázquez et al., 2008a; Blázquez et al., 2008b). Resultados similares foram verificados com a AEA (5, 10 μ M), que diminuiu os níveis de MMP-2 nas células U87 (Blázquez et al., 2008b). No entanto, este efeito não envolveu a ativação dos receptores canabinóides. Outros canabinóides, como o JWH-133 (25 μ M) e WIN 55,212-2 (25 μ M), também exerceram efeitos anti-

migratórios nas células vasculares endoteliais que, neste caso, foram mediados pelos receptores canabinóides. Adicionalmente, o JWH-133 também diminuiu a atividade e a expressão da matriz metaloproteinase-2 (marcador de malignidade tumoral), uma enzima proteolítica que permite o colapso dos tecidos e a remodelação durante a angiogênese e metástase, em células C6 e em células do astrocitoma humano (Blázquez et al., 2003).

A relação entre a inibição da expressão da MMP-2 e a inibição da invasão celular do glioma sugere que a MMP-2 pode ser utilizada como um novo marcador da atividade antitumoral canabinóide (Blázquez et al., 2008b). Adicionalmente a essa infra-regulação, fatores como mudanças nos níveis de TIMP-1 (Blázquez et al., 2008a) são provavelmente envolvidas tanto na inibição da atividade enzimática da MMP-2 (Blázquez et al., 2003) quanto no controle global da invasão celular tumoral pelo canabinóide (Blázquez et al., 2008b).

Em relação a outros canabinóides, Vaccani (2005) relatou um significativo efeito anti-migratório do CBD em células U87 do glioma humano *in vitro*, sendo este efeito não mediado pelos receptores canabinóides, TRPV1 ou outros receptores acoplados à proteína G1/0. Em um estudo prévio, foi descrito que o CBD estimula a migração das células BV-2 (microglia) em ratos (Walter et al., 2003), através de sua interação com um receptor ainda não estabelecido chamado “endothelial receptor sensitive to Ab-CBD” (Jarai et al., 1999). Neste sentido, os efeitos anti-migratórios do CBD no glioma podem ser decorrentes da interação deste canabinóide com um tipo de receptor similar ao descrito por Jarai (1999) que apresenta propriedades agonistas inversas (Vaccani et al., 2005). Finalmente, vale ressaltar que o efeito anti-migratório dos canabinóides tem sido reportado em outros tipos de células tumorais, como nas células SW480 de carcinoma do cólon (Joseph et al., 2004) e em células de câncer de tireóide em ratos (Portella et al., 2003; Pisanti et al., 2006).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS NEUROBLASTOMAS

Neuroblastoma é o tumor extracranial sólido mais comum na infância e corresponde a 15% das mortes por câncer pediátrico (Wagner and Dauks, 2009). Pelo menos 40% das crianças com neuroblastoma são designados como pacientes de alto risco, com base em características adversas, tais como idade \geq 18 meses, presença de doença disseminada, características histológicas desfavoráveis e amplificação do oncogene *MYCN* (Park et al., 2008). O tratamento atual para o neuroblastoma de alto risco consiste de uma sequência coordenada de quimioterapia, cirurgia e radiação (Matthay et al., 1999; Pearson et al., 2008). Mesmo com os tratamentos mais avançados disponíveis atualmente, é esperado que apenas um terço das crianças com neuroblastoma de alto risco sobrevivam (Wagner and Dauks, 2009).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos dos neuroblastomas. As linhas de células N18TG2, SH-AY5Y e LAN-5 (mas não a SK-NBE) expressam o receptor CB1. Já a linha de células CHP100 expressa poucos receptores canabinóides funcionais, no entanto, diferente das demais, expressa o receptor TRPV1.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

O primeiro estudo a descrever o efeito dos canabinóides nos neuroblastomas foi o de End (1977). Neste estudo o autor descreveu que o delta-9-THC (100 μ M) foi extremamente tóxico às células NB2A do neuroblastoma de ratos, evidenciado por uma rápida redução no número de células (decreceu para menos de 1% do controle no final de 5 dias), sem o retorno do crescimento após a remoção dos 100 μ M de THC no dia 3. Sánchez (1998a) encontrou resultados similares em células N18TG2, no entanto, com concentrações de delta-9-THC significativamente inferiores (0.25-1 μ M) àquelas utilizadas por End. Embora as

células N18TG2 expressem o receptor CB1, o mesmo não mediou os efeitos apoptóticos do delta-9-THC, já que a administração de SR141716, não reverteu os efeitos observados por este canabinóide (Sánchez et al., 1998a). Adicionalmente, os efeitos do delta-9-THC foram similares ao observado pela N-acetilesfingosina, um análogo da ceramida.

Em um outro estudo, utilizando células CHP100 do neuroblastoma humano, Macarrone (2000) descreveu que a AEA (0.1-1 μM) induziu apoptose de forma tempo- e concentração- dependentes. Curiosamente, outros endocanabinóides, como o o 2-AG (1.4 \pm 0.2 μM), linoleoiletanolamida (1.4 \pm 0.2 μM), oleoiletanolamida (1.3 \pm 0.2 μM) e palmitoiletanolamida (1.4 \pm 0.2 μM) não exerceram efeitos apoptóticos sob as mesmas condições experimentais (Macarrone et al., 2000). Vale ressaltar que em células C6, o 2-AG apresentou efeito antiproliferativo similar ao da AEA (Jacobsson et al., 2000). Esta discrepância pode ser explicada pelo fato das células CHP100 apresentarem poucos receptores CB1 e CB2 funcionais e desta forma a AEA (mas não o 2-AG) poderia interagir com receptores TRPV1. De fato, o efeito apoptótico da AEA foi revertido pela capsazepina (um agonista dos receptores TRPV1) e adicionalmente a capsaicina (um agonista dos receptores TRPV1) mimetizou os efeitos encontrados pela AEA. Estes achados foram corroborados por Bari (2005). Evidências prévias sugerem que a AEA atua como agonista total dos receptores TRPV1 em humanos (Zygmunt et al., 1999, Smart et al., 2000). A ativação deste receptor pode induzir apoptose em células neuronais (Sugimoto et al., 1999) e imunológicas (Macho et al., 1999), através do aumento de cálcio intracelular (Lam et al., 2007).

Assim como nas células CHP100, a exposição de AEA (10-100 μM) por 24 h diminuiu a viabilidade celular e induziu morte celular apoptótica nas células SH-SY5Y do neuroblastoma (Movsesyan et al., 2004). Pasquariello (2009), por sua vez, pesquisou os efeitos antitumorais da AEA não apenas nas células SH-SY5Y, mas também nas células LAN-5 e SK-NBE do neuroblastoma. Em estudo com duração de 24 hs, relatou que a AEA (0-12 μM) diminuiu a viabilidade celular e induziu apoptose das células SH-SY5Y e LAN-5 de forma concentração-

dependente. No entanto, as células tumorais SK-NBE, que não expressam os receptores CB1, não sofreram alterações com o tratamento com a AEA (Pasquariello et al., 2009). Adicionalmente, o 2-AG (12 μ M), diferente da AEA, não apresentou efeitos antiproliferativos nestas células (Pasquariello et al., 2009). Estes achados suportam a hipótese que os efeitos da AEA nestes modelos são dependentes da sinalização mediada pelos receptores TRPV1.

MECANISMOS MOLECULARES

Nas células CHP100 do neuroblastoma humano, a AEA exerceu seus efeitos na morte celular pela mediação da liberação de citocromo c (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2005) e ativação das caspases 3 e 9 (apoptose 'mitocondrial') (Macarrone et al., 2000). Também houve o envolvimento da COX-2 e da 5-LOX, já que os seus respectivos inibidores antagonizaram o efeito apoptótico exercido pela AEA (Macarrone et al., 2000). Vale ressaltar que o ATFMK, um inibidor da enzima que degrada a AEA (FAAH) potencializou os efeitos da AEA neste modelo (Macarrone et al., 2000). Resultados similares foram encontrados com o inibidor da recaptura intracelular de AEA (o AM404) (Macarrone et al., 2000). Neste caso, a inibição da degradação e recaptura intraneuronal da AEA disponibiliza uma maior quantidade intracelular de AEA, que ao atuar em receptores vanilóides, ativa os mecanismos da COX-2 e da 5-LOX.

Ainda nas células CHP100, Bari (2005) mostrou que a AEA (1 μ M) não exerceu seus efeitos apoptóticos pela mediação de transportadores de lipídios de membrana e nem pela diminuição da MAPK e PI3K, mecanismos estes que mediaram a apoptose nas células C6 do glioma. Curiosamente, segundo o autor, o efeito apoptótico da AEA neste modelo parece depender da ativação do receptor CB1, que estão pouco expressos nestas células (Bari et al., 2005).

Sobre os mecanismos subjacentes aos efeitos apoptóticos da AEA nas células tumorais do neuroblastoma SH-AY5Y, Movsesyan (2004) descreveu que este canabinóide promoveu aumento de cálcio intracelular, diminuição do

potencial da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c e aumento da atividade da caspase 3. No entanto, o efeito apoptótico da AEA não envolveu os mecanismos de caspases intrínsecos ou extrínsecos, já que inibidores de caspases (3, 8 e 9) não afetaram a morte celular induzida pela AEA (Movsesvan et al., 2004). Adicionalmente, experimentos com células SH-SY5Y caspase-8 e caspase-9 dominante-negativas não diminuíram significativamente a morte celular provocada pela AEA (Movsesvan et al., 2004). Por outro lado, o aumento da atividade da calpaína tem um papel crucial na ação da AEA neste modelo. Esse mecanismo foi verificado pela clivagem da α -espectrina, a qual foi atenuada pelo inibidor da calpaína, calpastatina (Movsesvan et al., 2004). Adicionalmente, foi observado que a inibição da calpaína limitou a morte celular induzida pela AEA bem como a liberação de citocromo c induzida por este canabinóide (Movsesvan, 2004). Vale ressaltar que o aumento de cálcio intracelular induzido pela AEA, é crucial para a ativação da calpaína (Mombouli et al., 1999; Sprague et al., 2001; De Petrocellis et al., 2001).

Outros mecanismos moleculares foram descritos. Pasquariello (2009) verificou que a AEA aumentou a expressão da proteína BiP, um sensor do estresse do retículo endoplasmático, nas células SH-SY5Y e LAN-5 do neuroblastoma. Além disso, este efeito foi mediado pelo receptor CB1. A importância do estresse do retículo endoplasmático foi bem descrita no estudo de Salazar (2009). Paralelamente, também via sinalização mediada pelos receptores CB1, houve um aumento de dois marcadores apoptóticos associados à proteína BiP, o p53 e o PUMA (Pasquariello et al., 2009). Adicionalmente, foi constatado o envolvimento da p38 MAPK e a p42/44 MAPK, já que os inibidores destas cinases reverteram o aumento da expressão mRNA do BiP, p53 e PUMA induzido pela AEA (Pasquariello et al., 2009). Portanto, neste modelo, a atividade apoptótica da AEA é mediada pelo receptor CB1 através da ativação da p38 e a p42/44, que por sua vez aumenta a expressão de BiP e, conseqüentemente, dos marcadores apoptóticos p53 e PUMA (Pasquariello et al., 2009).

Ainda sobre os possíveis mecanismos envolvidos na morte celular das células do neuroblastoma, Fulda (2009) descreveu que a inibição do mecanismo

PI3K/AKT/mTOR deve ser considerado um alvo terapêutico nos neuroblastomas com pior prognóstico. Embora os canabinóides não tenham sido testados em relação a este mecanismo nestas células, o estudo de Salazar (2009) mostrou, de forma inequívoca, que o delta-9-THC infra-regulou este eixo como parte de um mecanismo que antecedeu a morte apoptótica de várias células do neuroglioma humano. Portanto, é possível que os canabinóides, particularmente o delta-9-THC, possam exercer este mecanismo nos neuroblastomas.

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS FEOCROMOCITOMAS

Feocromocitomas são tumores originários das células cromafins do eixo simpático adrenomedular, caracterizados pela autonomia na produção de catecolaminas (Gerlo and Sevens, 1994). Dentre os feocromocitomas, mais de 90% são benignos e únicos, e na maioria dos casos a ressecção tumoral leva à cura (Faiçal and Shiota, 1997). Por outro lado, quando malignos, estes tumores apresentam metástases frequentemente em ossos, linfonodos regionais, fígado, pulmões, cérebro e cordão espinhal (Benowitz, 1990; Lopes et al., 1992; Zanella and Faiçal, 1993; Jones et al., 1980; Lansberg et al., 1993). A resposta desses tumores malignos é pobre à radioterapia e à quimioterapia com ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina (Faiçal and Shiota, 1997; Adjallé et al., 2009).

Nesta revisão, foram feitas pesquisas com as células PC-12 do feocromocitoma de ratos. Esta linha de células é considerada um modelo útil para estudos neurobiológicos e neuroquímicos. As mesmas expressam apenas os receptores TRPV1 e canabinóide CB1.

MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES

Sarker descreveu, em seus três estudos (Sarker et al., 2000; Sarker et al., 2003a; Sarker and Maruyama, 2003b) que a AEA induziu apoptose nas células PC-12 do feocromocitoma de ratos sem a mediação dos receptores canabinóides e vanilóide.

Conforme descrito na seção 'resultados', o mecanismo de transporte lipídico mediou todos os eventos sequenciais ativados pela AEA, já que o depletor do colesterol de membrana MCD (Metilciclodextrina) inibiu a apoptose induzida pela AEA. Estes eventos sequenciais incluem: a geração de superóxido (estresse oxidativo), ativação da ASK1, ativação da p38MAPK e da JNK, translocação da Bax do citosol para a mitocôndria (com conseqüente diminuição do potencial da

membrana mitocondrial), liberação de citocromo c e ativação da caspase 3. A AEA também ativou a p42/44 MAPK (Sarker et al., 2003a). No entanto, este efeito não é suficiente para a apoptose das células PC-12, pois o seu inibidor seletivo não inibiu a morte celular induzida por este canabinóide.

Um evento precoce importante induzido pela AEA foi o aumento da ASK1 (cinase reguladora de sinal de apoptose 1) (Sarker and Maruyama, 2003b). A ASK1 é ativada em resposta ao TNF α , Fas e estresse oxidativo (Ichijo et al., 1997; Chang et al., 1998; Gotoh and Cooper, 1998). Sarker (2000, 2003b) mostrou que a AEA induziu apoptose nas células PC-12 pelo mecanismo de estresse oxidativo.

Estudos prévios relatam que a superexpressão da forma inativa da ASK1 pode inibir a morte celular induzida pelo TNF α ou Fas (Ichijo et al., 1997; Chang et al., 1998). Sarker (2003b) mostrou que a superexpressão de ASK1-KM nas células PC-12, obtidas através de transferência de ASK1 inativa para estas células, fez com que estas células se tornassem resistentes à apoptose induzida pela AEA. Além disso, a ASK1-KM inibiu a ativação da p38 MAPK/JNK (Sarker and Maruyama, 2003b). Estes achados sugerem que a ASK1 tem um importante papel na ação apoptótica da AEA nas células PC-12 e que sua participação é um evento precoce à ativação da p38 MAPK/JNK.

Quanto aos mecanismos mitocondriais, relatos da literatura descrevem que, em resposta à agentes apoptóticos, ocorre translocação da Bax do citosol para a mitocôndria (Hsu et al., 1997; Wolter et al., 1997), o que induz a liberação de citocromo c e ativação de caspases (Jurgensmeier et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Outros estudos mostraram que, na apoptose induzida pelo TNF α ou Fas, a ativação das caspases antecede a ativação da p38 MAPK/JNK (Juo et al., 1997; Roulston et al., 1998). No entanto, no estudo de Sarker (2003b), o zVAD (um inibidor da caspase) e a ciclosporina A (um inibidor de abertura de poros da mitocôndria) inibiram a morte celular induzida pela AEA, mas não a ativação da p38 MAPK/JNK. Portanto, a ativação da p38 MAPK/JNK é um evento precoce à ativação das caspases. Estes achados foram corroborados por Ghatan (2000), mostrando que na apoptose de neurônios sob estresse oxidativo, a p38MAPK induziu translocação mitocondrial da Bax..

Outro pesquisador que estudou os efeitos antitumorais dos canabinóides nas células PC-12 foi Erlandsson. Em seu estudo o pesquisador mostrou que o CP55,940 induziu apoptose bem como o aumento da atividade da NF- κ B (Erlandsson et al., 2002). O NF- κ B é um regulador transcripcional que tem um papel central na morte celular programada (Erlandsson et al., 2002), sendo a elevação de sua atividade proposta como ativadora de morte celular (Barkett and Gilmore, 1999; Mattson et al., 2000; Schneider et al., 1999; Denk et al., 2000). No entanto, Erlandsson (2002) mostrou que a ativação deste fator de transcrição não foi necessário para a indução de apoptose pelo CP55,940.

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS TUMORES DE PRÓSTATA

O câncer de próstata é considerado a segunda maior causa de mortes relacionadas a cânceres em homens dos países ocidentais (Sarfaraz et al., 2006). O desenvolvimento destes tumores está intimamente ligado ao desequilíbrio entre os diferentes fatores reguladores de crescimento (como hormônios androgênicos e fatores de crescimento) e seus receptores (Lalani et al., 1997; Kim et al., 1999; Untergasser et al., 1999; Feldman and Feldman, 2001). Mesmos com os recentes avanços no diagnóstico e tratamento, as terapias atuais são incapazes de eliminar completamente as células tumorais que não dependem de androgênio (Bahnon, 2007).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Em relação à expressão de receptores canabinóides, observou-se que as linhas de células PC-3, DU-145 e LNCaP contêm ambos os receptores CB1 e CB2 (Melck et al., 2000; Sánchez et al., 2003a). A expressão do receptor CB1 é maior nas células PC-3 que nos outros dois tipos celulares, sendo que a expressão do receptor CB2 nas células PC-3 é similar ao das células DU-145. Por outro lado, os receptores CB2 são mais expressos nas células PC-3 que nas células LNCaP. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais prostáticas, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

As diferentes células tumorais prostáticas apresentaram efeitos antiproliferativos através de mecanismos celulares diversos, dependendo do canabinóide utilizado. Ruiz (1999) descreveu que o fitocanabinóide delta-9-THC (0-10 μ M) diminuiu significativamente a viabilidade das células PC-3 (androgênio-independentes) de forma concentração- e tempo- dependentes, tendo como

mecanismo celular a apoptose. Este canabinóide exerceu seu efeito apoptótico sem a mediação de receptores canabinóides, a despeito da presença dos mesmos nestas células (Ruiz et al., 1999). O canabinóide sintético WIN 55,212-2 (0.5 e 1 μ M), no entanto, não apresentou efeito na viabilidade nas células PC-3 (Ruiz et al., 1999).

As células PC-3, bem como as células DU-145 e LNCaP também foram utilizadas para a avaliação dos efeitos antitumorais do endocanabinóide AEA em contexto de proliferação das mesmas pela indução do fator de crescimento epidermal (EGF) (Mimeault et al., 2003). Neste estudo, a AEA (1-10 μ M) inibiu o crescimento das linhas de células androgênio-independentes (PC-3 e DU-145) de forma mais potente que as linhas de células androgênio-dependentes (LNCaP). O mecanismo celular pelo qual a AEA exerceu sua ação antiproliferativa, diminuindo os níveis da EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), foi através do sequestro do ciclo celular na fase G1, mediado pelos receptores CB1 e a outros receptores acoplados à proteína Gi/G0 (Mimeault et al., 2003). A AEA também induziu efeito apoptótico e necrótico, sendo estes efeitos mediados pelos receptores CB1 e CB2 (Mimeault et al., 2003).

As linhas de células DU-145 (androgênio-independentes e prolactina-responsivas), por sua vez, foram utilizadas para a avaliação dos efeitos antitumorais de vários canabinóides (0-1 μ M) em contexto de proliferação das mesmas pela prolactina exógena (Melck et al., 2000). Os endocanabinóides AEA e 2-AG e o canabinóide sintético HU-210 inibiram significativamente o crescimento dessas células. O análogo estável da AEA (meAEA), por sua vez, imitou os efeitos dos outros canabinóides, porém de forma menos potente. Foi descrito, adicionalmente, que estes canabinóides exerceram suas ações antiproliferativas pela mediação dos receptores CB1 e pela diminuição dos níveis dos receptores de prolactina nestas células (Melck et al., 2000).

Olea-Herrero (2009a), por sua vez, pesquisou os efeitos dos canabinóides meAEA e JWH-015 nas células tumorais prostáticas sem a influência de fatores de crescimento. Em estudo com duração de 48 hs, a meAEA e o JWH-015, ambos em concentrações de 0-25 μ M, diminuíram a viabilidade das células PC-3, DU-145

e LNCaP de forma concentração-dependente (significativamente a partir de 5 μM). Este efeito, no entanto, foi menos pronunciado nas células LNCaP (Olea-Herrero et al., 2009a). Experimentos adicionais, com utilização das células PC-3, mostraram que estes canabinóides induziram apoptose (e secundariamente necrose) e sequestro do ciclo celular na fase sub-G1 (Olea-Herrero et al., 2009a). Estes efeitos foram mediados pelos receptores CB2, pois foi observado que tanto o antagonista deste receptor quanto o silenciamento do mesmo (siRNA CB2) bloquearam os efeitos dos canabinóides (Olea-Herrero et al., 2009a). O fato do efeito antiproliferativo dos canabinóides ter sido menos pronunciado nas células LNCaP está em concordância com resultados de outros estudos que mostraram que estas células expressam uma quantidade menor de receptores CB2 que as células PC-3 e DU-145 (Sarfaraz et al., 2005). Experimentos *in vivo* em tumores de ratos marcados com células PC-3 verificaram que estes canabinóides reduziram de forma significativa o crescimento tumoral, bem como o peso e o volume dos mesmos. Novamente, estes efeitos foram mediados pelo receptor CB2 (Olea-Herrero et al., 2009a). Os resultados deste estudo são compatíveis com achados prévios de que a estimulação do receptor CB2 é envolvida na atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* em outros modelos tumorais (Caffarel et al., 2006; Carracedo et al., 2006a, Fernandez-Ruiz et al., 2007).

Em dois outros estudos, o WIN 55,212-2 teve seus efeitos antiproliferativos pesquisados nas células tumorais LNCaP (Sarfaraz et al., 2005; 2006). Estas células tumorais são dependentes de androgênios. Portanto, neste modelo, o receptor de androgênio tem um papel crucial no desenvolvimento e na progressão do câncer (Lamb et al., 2001; Wang et al., 1997; Koivisto et al., 1998). Sarfaraz (2005; 2006) descreveu que o WIN 55,212-2, em concentrações de 1-10 μM , diminuiu a viabilidade das células LNCaP (de forma concentração-dependente) bem como induziu apoptose das mesmas. Adicionalmente houve um efeito antiproliferativo por mecanismo de sequestro do ciclo celular (fase G0/G1). As ações deste canabinóide foram mediadas pelos receptores CB1 e CB2 (Sarfaraz et al., 2006). Além disso, foi constatado que o WIN 55,212-2 diminuiu tanto a expressão da proteína do receptor do androgênio como a concentração

intracelular e a secreção de PSA. Finalmente, experimento com o marcador de proliferação celular, PCNA, mostrou uma redução do mesmo após o tratamento com WIN 55,212-2 (Sarfaraz et al., 2005).

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Os mecanismos moleculares através dos quais a AEA exerceu seus efeitos antiproliferativos nas células cancerígenas de próstata (que proliferaram pela indução do EGF), envolveu a diminuição da proteína cinase A (PKA) e a concomitante ativação da MAPK (De Petrocellis et al., 1998; Mimeault et al., 2003). A inibição da PKA parece levar à infra-regulação dos níveis EGFR (receptores do fator de crescimento epidermal) nas células tumorais prostáticas, desta forma neutralizando os mecanismos de cascatas do EGF (Mimeault et al., 2003). Este autor relatou que o bloqueio da sinalização celular mediada pela PKA aumenta os níveis da proteína p27KIP1. Os produtos da proteína p27KIP1 inibem a atividade cinase dos complexos ciclinas-CDKs, como o complexo ciclina E-CDK2 e o complexo ciclina D-CDK4 ou CDK6, e desta forma, inibe a proliferação celular (Mimeault et al., 2003). Por outro lado, a neutralização desta sinalização media parcialmente o acúmulo de ceramida que, por sua vez, também está envolvida nos efeitos celulares induzidos pela AEA. Adicionalmente, os efeitos da AEA na toxicidade precoce devem ser mediados pela infra-regulação da EGFR, enquanto os efeitos massivos apoptóticos/necróticos, observados após longo período de incubação com a AEA, devem ocorrer pela infra-regulação da EGFR e pela ativação do mecanismo da síntese de ceramida *de novo* (Mimeault et al., 2003).

Mimeault (2003) também descreveu, em seu estudo, que a estimulação das células LNCaP (androgênio-dependente) pelo EGF, associado à α -diidrotestosterona (α -DHT), teve seu efeito proliferativo inibido pela AEA com uma sensibilidade comparável às células LNCaP estimuladas pelo EGF apenas. Desta forma, sugeriu que os mecanismos de cascatas responsáveis pelo crescimento

das células LNCaP, estimulado pelo androgênio, é também inibido pela AEA (Mimeault et al., 2003). Estes dados estão em concordância com outro estudo que mostra que a infra-regulação da p27KIP1 mediou o crescimento das células tumorais prostáticas (MDA PCa2a e MDA Pca2b), estimulado tanto pelo androgênio quanto pelo EGF (Untergasser et al., 1999). Assim, é provável que a AEA, pela inibição da cascata PKA e pela infra-regulação dos níveis da proteína EGFR, poderia neutralizar os mecanismos de cascatas de ambos EGF e α -DHT (Mimeault et al., 2003). Esse processo envolveria, provavelmente, a supra-regulação da p27KIP1 (Mimeault et al., 2003).

Olea-Herrero (2009a), por sua vez, descreveu os mecanismos subjacentes aos efeitos apoptóticos e de sequestro do ciclo celular induzidos pelo JWH-015 nas células PC-3. Em seu estudo, mostrou que este canabinóide induziu à acumulação intracelular de ceramida (de forma concentração-dependente) nestas células pela mediação do receptor CB2. Adicionalmente, mostrou que os efeitos antiproliferativos deste canabinóide foram mediados pelo acúmulo de ceramida de novo, pois a fumonisina B1, mas não o inibidor da esfingomielina, D609, antagonizou estes efeitos (Olea-Herrero et al., 2009a). Desta forma, comprovou que a ceramida adveio da síntese de ceramida *de novo*. A acumulação de ceramida de novo, como indutora de apoptose pela mediação dos receptores CB2, já foi relatada em outros modelos tumorais pela ação dos canabinóides (Gómez Del Pulgar et al., 2002a; Herrera et al., 2006; Carracedo et al., 2006a, Cianchi et al., 2008). Estudos com agentes quimioterápicos também descreveram efeitos na morte celular pela estimulação da geração de ceramida (Claria et al., 2006; Lin et al., 2006). Por outro lado, a atenuação dos níveis desta foi relatada como provocadora de resistência à radiação nas células tumorais prostáticas (Mahdy et al., 2009).

Experimentos de Olea-Herrero (2009a) também mostraram que o canabinóide JWH-015 ativou a JNK nas células PC-3 (Olea-Herrero et al., 2009a). A ativação desta quinase de stresse, pela mediação do receptor CB2, já foi relatada em estudos prévios nas células da microglia (Correa et al., 2009) e nas células epiteliais de pulmão (Sarafian et al., 2008). A ceramida, por sua vez, foi

previamente descrita como ativadora de várias enzimas envolvidas nos sinais de cascata de estresse, entre as quais as proteínas quinases Jun JNKs (Ruvolo et al., 2003). Adicionalmente, o estudo de Olea-Herrero (2009a) verificou que o JWH-015 induziu a um aumento da fosforilação da p38 MAPK.

Este estudo também demonstrou que o JWH-015 inibiu o eixo Akt-mTOR e ativou o eIF2 α (Olea-Herrero et al., 2009a), os quais são envolvidos na regulação de autofagia e da resposta do estresse do retículo endoplasmático (Olea-Herrero et al., 2009a; Salazar et al., 2009). Olea-Herrero (2009a) descreveu que estes mecanismos são supostamente envolvidos na morte celular tumoral prostática induzida pelo JWH-015 (Olea-Herrero et al., 2009a). Estes achados são concordantes com os achados de Salazar (2009), que descreveu que estes mecanismos mediaram a morte apoptótica de várias células dos gliomas pela indução do canabinóide delta-9-THC.

A liberação de fatores pró-apoptóticos como o citocromo c da mitocôndria leva à formação de complexos multiméricos conhecidos como apoptossoma e dá início à ativação da cascata de caspases. O fato de que o JWH-015 induziu liberação de citocromo c para dentro do citosol e ativou a caspase 9 nas células PC-3 (Olea-Herrero et al., 2009a) confirma o envolvimento da apoptose e indica a ocorrência da ativação do mecanismo apoptótico intrínscio.

A meAEA foi particularmente pesquisada nas células PC-3 em outro estudo desta autora (Olea-Herrero et al., 2009b). Foi mostrado que este canabinóide induziu a uma diminuição da viabilidade celular pela mediação parcial do receptor CB2 e pela acumulação da ceramida de novo (Olea-Herrero et al., 2009b), mecanismos estes também verificados pela ação do JWH-015 nestas células (Olea-Herrero et al., 2009a). Adicionalmente, este estudo pesquisou a associação entre o canabinóide meAEA e os seus efeitos na imunidade antitumoral. Em seus experimentos, Olea-Herrero (2009b) mostrou que a meAEA induziu à secreção da citocina IL-6 (interleucina-6) pelas células PC-3, também pela mediação do receptor CB2. No entanto, o inibidor da síntese de ceramida de novo (fumonisina B1) não teve efeito na secreção desta citocina, mostrando que a biossíntese de ceramida não foi envolvida na indução de IL-6 pela meAEA. Experimentos

adicionais confirmaram, no entanto, que a fosforilação da ceramida, pela ação da enzima CERK, mediou este efeito imunológico (Olea-Herrero et al., 2009b).

A ceramida intracelular pode ser metabolizada em C1P pela enzima CERK, que é envolvida em respostas pró-inflamatórias. Neste estudo, experimento com infra-regulação da CERK (siRNA CERK) bloqueou a indução de IL-6 pela meAEA nas células PC-3, sugerindo que esta enzima tem um papel crítico regulador na secreção de IL-6 (Olea-Herrero et al., 2009b), em concordância com relatos de outros estudos que descreveram o papel pró-inflamatório estabelecido da CERK (Saxena et al., 2008). A citocina IL-6, em particular, é secretada em grandes quantidades no tecido glandular tumoral benigno da próstata (Mechergui et al., 2009), bem como nas células PC-3 e DU-145 (Olea-Herrero et al., 2009b), com taxas significativamente altas em quaisquer fases refratárias a hormônios (Mechergui et al., 2009). As células tumorais LNCaP (androgênio-sensitivas), por sua vez, não produzem níveis significativos desta citocina (Olea-Herrero et al., 2009b). Embora os níveis de IL-6 sejam relacionados à progressão do câncer de próstata, o seu papel no desenvolvimento tumoral é ainda obscuro. Estudos recentes mostraram que a IL-6 age em associação com o fator transformador de crescimento (TGF)- β para induzir diferenciação de células T “normais” em células T-helper (células TH17) (Oukka, 2008; Basso et al., 2009). Estas últimas, por sua vez, secretam a IL-21, um potente agente antitumoral (Spolski and Leonard, 2008a; 2008b).

Vários estudos demonstraram a associação dos receptores CB2 com respostas imunológicas em animais e em humanos. Um estudo recente mostrou que estes receptores modulam o desenvolvimento das células T(H), quimotaxia e desenvolvimento tumoral (Cabral and Griffin-Thomas, 2009). Desta forma, os dados do estudo de Olea-Herrero (2009b) sugerem que as células PC-3 tem um papel significativo na sustentação e amplificação do processo inflamatório através da produção local de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, poderiam promover o recrutamento e a ativação de células imunes adicionais para dentro da próstata. Estes dados indicam o uso potencial da metanandamida no tratamento

imunoterápico do câncer de próstata, embora experimentos *in vivo* sejam necessários.

Já os mecanismos moleculares através dos quais o canabinóide WIN 55,212-2 exerceu seus efeitos inibitórios do crescimento celular e antiproliferativos nas células cancerígenas LNCaP foram profundamente estudados por Sarfaraz (2005; 2006), como descrito acima. Sarfaraz (2006) descreveu que o WIN 55,212-2 induziu apoptose e sequestro do ciclo celular (fase G0/G1) quando exposto à essas células. Esses efeitos foram mediados pela supra-regulação prolongada de ERK 1/2 e pelos receptores canabinóides. Adicionalmente, este autor descreveu a ocorrência de infra-regulação do mecanismo PI3K/AKT. O mecanismo ERK 1/2 tem um comportamento dual e é envolvido tanto na proliferação como no sequestro do ciclo celular (Sarfaraz et al., 2006). A ativação deste mecanismo é complexa e depende de vários fatores, um dos quais a duração do estímulo (Sarfaraz et al., 2006). Já o mecanismo P13K/AKT é uma resposta comum das células para a estimulação do fator de crescimento e é essencial para a sobrevivência (Sarfaraz et al., 2006), sendo necessária a sua infra-regulação para que ocorra morte celular.

Vários dos mecanismos envolvidos na fase G0/G1 foram modulados pelo WIN 55,212-2 nas células LNCaP (Sarfaraz et al., 2006). Os complexos ativos ciclina-CDK foi um deles (Sarfaraz et al., 2006). A atividade dos mesmos é regulada pelas proteínas ckis, que incluem a p21 e a p27KIP1 (Melck et al., 2000; Sarfaraz et al., 2006). As ckis inibem a atividade quinase associada com os complexos cdk-ciclina, assim modulando os eventos de fosforilação, que têm um importante papel na progressão do ciclo celular (Macleod et al., 1995; Sherr, 1996; Jacks and Weinberg, 1996; Sherr and Roberts, 1999; Sánchez and Dynlacht, 2005). O canabinóide WIN 55,212-2 induziu a um aumento da p27KIP1 e consequente diminuição da expressão da cdk-2, cdk-4 e cdk-6 (Sarfaraz et al., 2006).

Este canabinóide também infra-regulou a expressão da proteína pRb (retinoblastoma), uma reguladora-chave da transição G1-S do ciclo celular (Nevins et al., 1997; Deshpande et al., 2005). Parece haver associação entre a infra-

regulação das cdk4/6 com a diminuição desta proteína supressora do tumor (Sarfraz et al., 2006). Estudos têm estabelecido que membros da família do retinoblastoma sejam capazes de exercer supressão da atividade do crescimento devido às suas interações com os heterodímeros E2F/DP, cuja função é ativar a transcrição dos genes requeridos para a progressão do ciclo celular (Kasten and Giordano, 1998; Taya, 1997). Neste estudo, o WIN 55,212-2 infra-regulou a E2F (E2F1, E2F2, E2F3, E2F4) e diminuiu a expressão das proteínas DP1 e DP2 (Sarfraz et al., 2006).

Adicionalmente, foi descrito que este canabinóide induziu a um aumento da expressão da p53, que é uma das maiores reguladoras da apoptose (Sarfraz et al., 2006). A supra-regulação da p53 resulta na sobreposição de mecanismos precoces que suprimem os mecanismos mitogênicos e de sobrevivência, entre os quais os membros da família Bcl-2 (Strasser et al., 2000; Oltsdorf et al., 2005). A Bcl-2, por sua vez, é encontrada em altos níveis em mais da metade dos tumores humanos e estudos têm mostrado que ela forma um complexo heterodímero com o membro pró-apoptótico Bax, desta forma neutralizando os efeitos apoptóticos do mesmo (Sarfraz et al., 2006). Assim, alterações nos níveis de Bax e Bcl-2, com mudanças da relação de proporção Bax/Bcl-2, são consideradas um fator decisivo em determinar quando as células vão sofrer apoptose sob as condições experimentais que promovem a morte celular (Sarfraz et al., 2006). Neste estudo, o WIN 55,212-2 aumentou a proporção Bax/Bcl-2 de modo a favorecer a apoptose (Sarfraz et al., 2006).

Por fim, Sarfraz (2006) descreveu que este canabinóide ativou a cascata de caspases iniciadoras (caspase 9) e efetoras (caspases 3, 6, 7) com concomitante clivagem da Poli(ADPribose)polimerases (PARP).

INIBIÇÃO DA ANGIOGÊNESE E DA INVASIVIDADE TUMORAL

Em relação à angiogênese tumoral, Sarfraz (2005) demonstrou que o canabinóide WIN 55,212-2 reduziu significativamente a expressão da proteína

VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), demonstrando seu efeito inibitório na angiogênese tumoral.

Nithipatikom (2004), por sua vez descreveu, em relação à invasividade das células tumorais, que o endocanabinóide 2-AG (1 μM), o seu análogo noladina éter (10 μM) e a metanandamida (10-1000 nM) inibiram a invasividade das células PC-3 (principalmente) e DU-145, mediados pelo receptor CB1 e pela diminuição da PKA. O WIN 55,212-2 (1-100 nM), que em doses maiores (0.5 e 1 μM) não apresentou efeito na viabilidade celular das células PC-3 no estudo de Ruiz (1999), também inibiu a invasividade das células PC-3 e DU-145 pela mediação do mesmo receptor canabinóide (Nithipatikom et al., 2004). As células LNCaP, no entanto, não apresentaram efeitos inibitórios da invasividade pelos canabinóides descritos acima (Nithipatikom et al., 2004).

A ativação do receptor CB1 leva à diminuição da atividade da adenil ciclase (Howllet et al., 1984), o que pode resultar no rompimento dos mecanismos de transmissão que regulam a invasividade (Howe, 2004). Este mecanismo foi confirmado pela verificação experimental de que houve inibição da proteína quinase A (PKA) nas células tratadas com 2-AG e noladina éter (Nithipatikom et al., 2004). A literatura embasa, portanto, que este mecanismo pode ser um dos efeitos inibidores na invasão das células tumorais prostáticas androgênio-independentes pelos canabinóides (Nithipatikom et al., 2004). A expressão relativamente alta dos receptores CB1 nas células PC-3 pode ser uma das razões pelas quais esta linha de células é a mais sensível aos canabinóides em comparação com as outras células.

Por fim, o bloqueio experimental do metabolismo do 2-AG inibiu a invasão celular das células PC-3 e DU-145, o que suporta a hipótese de que o 2-AG endógeno seja um regulador negativo da invasividade de células tumorais da próstata androgênio-independentes (Nithipatikom et al., 2004). Esta hipótese foi confirmada em outro estudo do mesmo autor (Nithipatikom et al., 2005), em que foi mostrado que os inibidores da hidrólise do 2-AG (OTFP, DETFP e DDTFP) exerceram ações antimigratórias nestas células. Esta ação inibitória é particularmente útil devido à alta produção de 2-AG endógeno que ocorre nas

mesmas (Nitiphatikom et al., 2005). Desta forma, os resultados deste estudo sugerem que a manutenção e/ou aumento das concentrações endógenas de 2-AG são importantes no controle da invasão celular, o que demonstra um novo alvo terapêutico no tratamento do câncer de próstata.

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS TUMORES DE MAMA

À despeito dos recentes avanços na detecção precoce do câncer de mama, aproximadamente 30% dos pacientes em estágio precoce apresentam recorrência da doença (Jemal et al., 2006). O tratamento sistêmico desta malignidade inclui agentes citotóxicos, hormonais e imunoterapêuticos, os quais são ativos no início da terapia em 90% dos tumores primários de mama e em 50% das metástases. Após um período variável de tempo, no entanto, ocorre progressão da doença, sendo observado uma resistência às multidrogas (Ghersli et al., 2005; Schultz and Weber, 1999; Stockler et al., 2000; Wilcken et al., 2007).

Nesta revisão, todos os canabinóides testados diminuíram a proliferação de todas as células tumorais de mama pesquisadas, à exceção da PEA. Este canabinóide, no entanto, assim como a oleamida, apresentaram efeito potencializador da ação da AEA nos efeitos antiproliferativos da mesma (Bisogno et al., 1998; Di Marzo et al., 2001).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Todas as células tumorais pesquisadas expressam ambos os receptores canabinóides CB1 E CB2, com exceção da linha de células EVSA-T (Caffarel et al., 2006), que expressa apenas o receptor CB2. Salienta-se que as linhas de células MDA-MB-231, MDA-MB-468, SkBr3, MCF-7 e T-47D expressam maiores quantidades de CB2 que de CB1 (Caffarel et al., 2006). Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais de mama, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS HORMONAIS – IMPORTÂNCIA DA PROLACTINA

A maioria das linhas de células tumorais de mama (ex.: MCF-7, EFM-19) são hormônio-sensitivas (Simon et al., 1985; Ginsburg and Vonderhaar, 1995; Clevenger et al., 1995; Shiu and Iwasiov, 1985; Fuh and Wells, 1995). Estas

células sintetizam prolactina em altas quantidades (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999) e este hormônio, por sua vez, promove a proliferação das mesmas (Fuh and Wells, 1995). Por outro lado, estas células são pouco responsivas à influência da adição exógena de prolactina, não apresentando resposta proliferativa adicional à prolactina endógena (Fuh and Wells, 1995). Devido à sua capacidade de acelerar a transição G1/S do ciclo celular mitótico (Clevenger et al., 1992), este hormônio parece agir como o maior agente proliferativo autacóide nestas células (Simon et al., 1985; Ginsburg and Vonderhaar, 1995; Clevenger et al., 1995; Shiu and Iwasiov, 1985; Fuh and Wells, 1995).

As interações hormonais, portanto, parecem ter importância marcante nos efeitos antiproliferativos dos canabinóides. O endocanabinóide AEA, por exemplo, parece ter suas ações restritas às células tumorais que expressam os receptores da prolactina e/ou receptores estrogênicos e que proliferam em resposta ao tratamento com hormônios lactogênicos e/ou esteróides (Simon et al., 1985; Ginsburg and Vonderhaar, 1995; Clevenger et al., 1995; Shiu and Iwasiov, 1985). Os canabinóides sintéticos, por sua vez, parecem influenciar as ações e os níveis desses hormônios (Howlett and Pertwee, 1995; Wendenfeld et al., 1994; Wenger et al., 1995; Romero et al., 1994; Fernandez-Ruiz et al., 1997; Wenger et al., 1997). Salienta-se, no entanto, que um estudo com células MCF-7 mostrou que não houve interação entre os compostos canabimiméticos e os receptores estrogênicos (Ruh et al., 1997).

De Petrocellis (1998) descreveu, em seu estudo, que as linhas de células tumorais da mama mais sensíveis aos efeitos antiproliferativos da AEA (ex.: MCF-7, EFM-19 e T-47D) foram também as que melhor responderam ao tratamento com o anticorpo prolactina (dados não mostrados). Desta forma, sugeriu que a potência antiproliferativa da AEA parece ser paralela ao grau de dependência da prolactina endógena que estas células possuem para proliferarem-se (De Petrocellis et al., 1998). No entanto, como a prolactina é o alvo da ação antiproliferativa da AEA, este canabinóide não estaria agindo através da redução dos níveis de prolactina (De Petrocellis et al., 1998). O mecanismo antiproliferativo

deve-se, pelo menos em parte, à interferência deste canabinóide com a ação proliferativa da prolactina endógena. Essa interferência ocorre pela mediação do receptor da prolactina (De Petrocellis et al., 1998).

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

Os efeitos antitumorais dos canabinóides e dos endocanabinóides pela mediação de receptores têm sido descritos tanto para a inibição da mitose (sequestro do ciclo celular), mediada pelo CB1 (como o caso de algumas células hormônio-sensitivas), quanto para a indução de apoptose seguindo a ativação dos TRPV1 e/ou receptores CB2 (Ligresti et al., 2006).

O estudo de De Petrocellis (1998) descreveu que a AEA (0.5 e 1.5 μM), assim como outros agentes canabimiméticos (metanandamida, 2-AG e HU-210), induziram potente inibição da proliferação das células tumorais (EFM-19 e MCF-7) pela mediação do receptor canabinóide CB1, tendo como mecanismo celular o sequestro do ciclo celular na fase G1/S, sem ocorrência de apoptose ou necrose.

Mecanismo celular semelhante e pela mediação do mesmo receptor (CB1) foi descrito por Sarnataro (2006) para os efeitos antiproliferativos induzidos pelo Rimonabanto (0.1-1 μM) (antagonista/agonista inverso do receptor CB1) nas células tumorais MCF-7 e T47D (menos invasivas), e principalmente nas células MDA-MB-231 (mais invasivas e hormônio-insensitivas). Em seu estudo *in vivo*, este autor mostrou, adicionalmente, que o rimonabanto induziu a uma diminuição significativa do volume dos tumores de mama (MDA-MB-231), induzidos pela inoculação de células tumorais em ratos, em relação ao controle (Sarnataro et al., 2006).

A inibição da proliferação celular pelo Rimonabanto parece depender, além de sua dosagem, dos níveis de expressão do receptor CB1 nas diferentes linhas de células tumorais da mama e do fenótipo destes cânceres (mais invasivo ou menos invasivo) (Sarnataro et al., 2006). Foi observado, neste estudo, que as

células MDA-MB-231 expressam níveis mais altos do receptor CB1 do que as outras células tumorais pesquisadas neste estudo (Sarnataro et al., 2006).

A Met-F-AEA (análogo estável da AEA) (10 μ M), por sua vez, também induziu efeitos antiproliferativos (sequestro do ciclo celular) sem indução de apoptose nas células tumorais MDA-MD-231 (humanas) (Grimaldi et al., 2006; Laezza et al., 2006) e TSA-E1 (camundongos) (Grimaldi et al., 2006). Experimentos indicaram que o sequestro do ciclo celular nas células MDA-MB-231 ocorreu na fase S, com conseqüente diminuição das células tumorais na fase G2/M (Laezza et al., 2006). Estas ações antiproliferativas foram mediadas pelo receptor CB1 (Grimaldi et al., 2006).

Caffarel (2006), em seu estudo, avaliou os efeitos do fitocanabinóide delta-9-THC (1-12 μ M) em várias linhas de células tumorais da mama (EVSA-T, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SkBr3, MCF-7 e T-47D), que expressaram maior quantidade de receptores CB2 em relação aos receptores CB1. Experimentos mostraram que este canabinóide induziu significativo efeito antiproliferativo nestas células, de forma mais marcante nas células fenotipicamente mais agressivas (Caffarel et al., 2006), em concordância com os efeitos verificados pelo rimonabanto (Sarnataro et al., 2006). O sequestro do ciclo celular induzido pelo delta-9-THC ocorreu na fase G2-M e foi associado ao mecanismo de morte celular apoptótica (Caffarel et al., 2006). Neste estudo, embora o delta-9-THC tenha induzido apoptose das células tumorais em todas as fases do ciclo celular, a maioria delas estava no compartimento G2-M (Caffarel et al., 2006). Estes efeitos do delta-9-THC foram mediados (parcialmente) pelos receptores CB2 (mas não pelos receptores CB1) (Caffarel et al., 2006). No entanto, como o efeito mediador do receptor CB2 foi parcial, é provável a existência de processos CB2-independentes na ação antiproliferativa do delta-9-THC.

Em estudo com as células tumorais MDA-MB-231 e MCF-7, Ligresti (2006) descreveu que o Canabidiol (CBD), bem como o CBD enriquecido com extratos da planta Cannabis, induziram potente inibição do crescimento destas células *in vitro*. O mesmo ocorreu em estudo *in vivo* nas células MDA-MB-231, em que estes canabinóides inibiram significativamente o crescimento dos tumores de ratos

inoculados com estas células (Ligresti et al., 2006). O mecanismo celular do CBD, no entanto, não apresentou um modelo único de ação. Nas células MDA-MB-231 (hormônio-insensíveis), o efeito antiproliferativo do canabidiol (10 µM) ocorreu por apoptose, em decorrência de ativação direta ou indireta dos receptores CB2 e VR1, elevação intracelular de cálcio através de mecanismo independente de receptores canabinoide/vaniloide e formação de ROS ('estresse oxidativo') (Ligresti et al., 2006). Já nas células MCF-7 (hormônio-sensíveis), o CBD induziu a um sequestro do ciclo celular na fase G1/S (Ligresti et al., 2006). Dos canabinóides pesquisados, apenas o canabigerol e o ácido canabidiol ativaram os receptores VR1 (Ligresti et al., 2006). Neste estudo (Ligresti et al., 2006), o delta-9-THC teve fracos efeitos observados. A baixa expressão de receptores CB1 nestas células pode explicar a resistência à toxicidade verificada pelo delta-9-THC (McKallip et al., 2005).

Os canabinóides sintéticos (JWH-133 e WIN 55,212-2) também foram pesquisados, em relação aos seus efeitos antitumorais, nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-231. Qamri (2009) mostrou que os mesmos, em concentrações de 0.1-10 µM, induziram a uma diminuição da viabilidade destas células de forma concentração-dependente. O JWH-133 apresentou significância estatística a partir de 2.5 µM, enquanto o WIN 55,212-2 teve efeito significativo a partir de 5 µM de concentração nas células MDA-MB-231. Já nas células MDA-MB-468, ambos os canabinóides apresentaram efeito significativo a partir de 5 µM. Adicionalmente, foi observado que ambos os canabinóides (10 µM) induziram apoptose e sequestro do ciclo celular na fase G0-G1 nos dois tipos celulares (Qamri et al., 2009).

Em sua pesquisa *in vivo* com duração de quatro semanas, este autor também mostrou que tanto o JWH-133 (5 mg/kg/dia) quanto o WIN 55,212-2 (5 mg/kg/dia) induziram a uma diminuição significativa do volume dos tumores dos ratos marcados com células MDA-MB-231, em comparação com os ratos do grupo controle (Qamri et al., 2009). Os efeitos antitumorais do JWH-133 *in vivo* foram mediados pelo receptor CB1 e os efeitos do WIN 55,212-2 foram mediados pelos receptores CB1 e CB2 (Qamri et al., 2009). Foi observado, adicionalmente, que ambos os canabinóides induziram apoptose e a uma diminuição significativa do

marcador de proliferação (Ki67) nas células MDA-MB-231, observadas através de tecidos excisionados dos tumores destes ratos (Qamri et al., 2009).

Experimento adicional foi realizado em modelos de ratos transgênicos PyMT. Este modelo tem sido utilizado para estudar os efeitos de drogas antitumorais, pois ele reconstitui o processo encontrado na progressão do câncer de mama humano e a ocorrência de metástase espontânea (Qamri et al., 2009). Neste experimento, foi observado que o tratamento com JWH-133 retardou o desenvolvimento do processo carcinogênico, mostrando, após uma semana, que os tumores mamários PyMT foram marcadamente reduzidos em tamanho nos ratos tratados com JWH-133 (0.12 g) em relação ao controle (0.28 g) (Qamri et al., 2009). Os ratos tratados com este canabinóide também mostraram uma redução significativa do Ki67 (40%) e do CD31 (37%) (Qamri et al., 2009). Desta forma, o JWH-133 aumentou a latência do crescimento tumoral e diminuiu este crescimento em relação ao controle. Adicionalmente, ele também reduziu a agressividade dos tumores mamários nos ratos PyMT.

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

A AEA, através da ativação dos receptores CB1, tem ação inibidora em ambas prolactina basal (endógena) e prolactina exógena em algumas células tumorais humanas de mama (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999). A proliferação destas células, induzidas pelo NGF (fator de crescimento de nervo), também é inibida pela AEA, através da supressão dos níveis dos receptores de prolactina (PRLr) e dos receptores NGF (trk). Salienta-se que as células tumorais humanas da mama têm alta afinidade pelo receptor NGF (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999). Os mecanismos antiproliferativos da AEA envolvem, pelo menos em parte, os mecanismos cAMP/PKA e Raf-1/MAPK, através da inibição da adenil ciclase e da ativação da MAPK (Melck et al., 1999).

Melck (1999) descreveu, em estudo com células tumorais MCF-7 e EFM-19, que o ativador da adenil ciclase, forskolina, e o inibidor da MAPK, PD098059,

neutralizaram, enquanto o inibidor da PKA (proteína quinase A), RpcAMPs, imitou os efeitos da AEA. Desta forma, sugeriu o envolvimento dos sinais de cascatas da cAMP/PKA e MAPK na inibição, pela AEA, dos níveis de PRLr/trk e da proliferação celular. Neste estudo, foi observado que a atividade basal da MAPK foi estimulada pelo RpcAMPs e inibida pela forskolina. No entanto, a forskolina, por si só, não inibiu a translocação da Raf-1 para a membrana celular (Melck et al., 1999). Isso sugere que, nas células MCF-7, a MAPK é constitutivamente infra-regulada somente em parte, através da fosforilação catasilada da PKA, com subsequente inibição da Raf-1 (Morrison and Cutler, 1997). A inibição da adenil ciclase pela AEA, mediada pelo CB1, deve liberar este tom inibitório e restaurar potencialmente a atividade da MAPK pelo aumento da translocação da Raf-1, um efeito que é revertido pela forskolina (Melck et al., 1999).

O fato da forskolina não ter prevenido a estimulação da MAPK induzido pela AEA sugere a possibilidade de que a AEA ative a MAPK independentemente dos efeitos sobre a adenil ciclase e da translocação da Raf-1. No entanto, somente a ativação da MAPK pela AEA, dependente da cAMP, induziu a inibição da proliferação celular (Melck et al., 1999). Isso porque, neste estudo, não foi observado efeito citostático cumulativo com doses submáximas da RpcAMPs (que imita somente o efeito dependente de cAMP na enzima) em associação com a AEA. Este resultado sugere, adicionalmente, que a AEA pode reduzir a proliferação das células MCF-7, pela inibição da formação de cAMP, sem que ocorra a ativação da MAPK (Melck et al., 1999).

É interessante descrever, em relação à MAPK, que tanto a ativação quanto a inibição da mesma pode levar à inibição da proliferação das células tumorais humanas de mama, dependendo das condições da cultura e da presença e concentrações de fatores de crescimento (Melck et al., 1999). É possível que um tom finamente regulado da atividade MAPK seja necessário para que estas células tenham proliferação normal (Melck et al., 1999). Rompimento deste tom tanto pelo bloqueio (com PD098059) ou desinibição sustentada (inibição dos níveis de cAMP mediada pelo CB1) devem levar à diminuição da proliferação (Melck et al., 1999).

Já em linhas de células MDA-MB-231 (hormônio-insensitivas), Sarnataro (2006) descreveu que o mecanismo de sequestro do ciclo celular do Rimonabanto envolveu a diminuição da expressão das ciclinas D e E, e o aumento dos níveis da p27KIP1, efeitos estes mediados pelo receptor CB1 e pelo mecanismo de transporte lipídico.

Em relação aos mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos antiproliferativos da Met-F-AEA nas células MDA-MB-231, houve aumento da p27KIP1 (Grimaldi et al., 2006; Laezza et al., 2006) e uma diminuição da expressão da ciclina E (Laezza et al., 2006), em concordância com efeitos verificados na ação antiproliferativa do rimonabanto (Sarnataro et al., 2006). Laezza (2006), no entanto, observou que a Met-F-AEA também induziu aumento da p21WAF de forma tempo-dependente, com um efeito marcante após 24 hs de tratamento (Laezza et al., 2006). Este aumento foi correlacionado com uma diminuição da ciclinas A além da ciclina E, com consequente inibição da Cdk2 (Laezza et al., 2006). Assim, parece que o sequestro do ciclo celular ocorreu como consequência da perda específica da atividade da Cdk2, devido à supra-regulação da p21WAF e da redução da formação do complexo ativo ciclina E/quinase Cdk2 (Laezza et al., 2006). Também a pRB, que é um substrato direto da quinase Cdk2 (Bartek and Lukas, 2001), foi hipofosforilada pela ação da Met-F-AEA, contribuindo para a inibição dessa quinase (Laezza et al., 2006).

Este estudo também verificou que os efeitos antiproliferativos da Met-F-AEA foram mediados pela fosforilação da Chk1 e degradação da Cdc25A (Laezza et al., 2006). Esta quinase media tanto a fase S quanto a fase G2 do ciclo celular, tendo como alvo a proteólise da fosfatase Cdc25A, com consequente dano do DNA (Zhao et al., 2002; Sorensen et al., 2003, Xiao et al., 2003; Zhou and Bartek, 2004). A Cdc25A, por sua vez, regula positivamente o ciclo celular pela ativação das Cdks (Laezza et al., 2006). A ação da Met-F-AEA nestes alvos foram confirmadas pelo experimento em que houve coincubação das células MDA-MB-231 com Met-F-AEA na presença do inibidor ChK1, mostrando inibição da degradação da Cdc25A, sugerindo a importância da fosforilação da Chk1 nesta degradação (Laezza et al., 2006). Assim, a degradação da Cdc25A, pela ativação

da Chk1, inibiu a ativação da Cdk2 com conseqüente inibição dos complexos ciclina E-Cdk2 e ciclina A-cdk2 (Laezza et al., 2006).

Em relação aos efeitos antiproliferativos do delta-9-THC (5 μ M) nas células tumorais EVSA-T, Caffarel (2006) descreveu que o mesmo induziu sequestro do ciclo celular na transição G2-M através da infra-regulação dos níveis totais de Cdc2 (p34, ciclina dependente de quinase 1), bem como de sua atividade enzimática específica (diminuiu a quantidade da Tyr15). Adicionalmente, induziu a um aumento dos níveis da p21 e da proteína Wee1 e a uma diminuição dos níveis da proteína Cdc25C e da survivina nestas células (Caffarel et al., 2006).

A Cdc2 tem um papel essencial comprovado na ocorrência da progressão do ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2005). Esta cinase é a maior CDK (ciclina dependente de quinase) controladora da entrada de células em mitose, após completar os eventos na fase G2 (Stark and Taylor, 2004). Para ser ativada, ela precisa ser desfosforilada no seu resíduo Tyr15 (Kawabe, 2004). A fosforilação da Cdc2 em Tyr15 é controlada pela família de proteínas quinases Wee1/Mik1 e pela fosfatase Cdc25C (Kawabe, 2004). A p21, por sua vez, é uma inibidora CDK conhecida por prevenir a ativação da Cdc2-ciclina B (Stark and Taylor, 2004). Foi proposto, em outros estudos, que a p27, uma inibidora CDK tradicionalmente associada à regulação da transição G1-S, pode também inibir a Cdc2 na fase G2-M (Nakayama et al., 2004). Neste estudo (Caffarel et al., 2006), porém, não houve modificação nos níveis da p27 (dados não mostrados). A survivina, por sua vez, é um membro da família inibidora de apoptose, expressa em todas as linhas de células tumorais da mama pesquisadas neste estudo (Caffarel et al., 2006).

Ainda em relação aos efeitos antiproliferativos do delta-9-THC nas células tumorais EVSA-T, este mesmo autor (Caffarel, 2008) verificou, em experimento de análise de perfil de genes, que este canabinóide induziu a uma supra-regulação dos níveis de JunD nestas células, bem como a um aumento dos níveis da proteína JunD (Caffarel et al., 2008). Adicionalmente, mostrou que este evento mediou, em estágio precoce, as ações antiproliferativas do delta-9-THC nas células tumorais EVSA-T (Caffarel et al., 2008), mostrando um novo alvo para a inibição das células tumorais da mama. Isso foi verificado em experimento em

que o JunD foi silenciado (siRNA JunD), mostrando que estas células se tornaram resistentes à ação antiproliferativa deste canabinóide. Este estudo também mostrou que o gene supressor de tumor (Tes) e o JunD são interrelacionados e que ambos foram ativados precocemente à supra-regulação da p27 pelo delta-9-THC (Caffarel et al., 2008). Experimento com siRNA JunD também possibilitou a observação de que houve anulação do efeito de diminuição dos níveis de Cdc2 pelo delta-9-THC (Caffarel et al., 2008), mais uma vez mostrando que a ativação do JunD foi um evento precoce aos efeitos antiproliferativos induzidos pelo delta-9-THC. Adicionalmente, foi verificado que o delta-9-THC induziu a um aumento da proteína de stress p8. No entanto, este foi um evento independente da supra-regulação do JunD (Caffarel et al., 2008). Nestas células (EVSA-T), assim como em vários modelos tumorais, o delta-9-THC apresentou seletividade na ação antitumoral. Foi observado que as células mamárias epiteliais, usadas como controle, não tiveram as expressões do JunD, do Tes, da p27 ou da p8 afetadas pela ação deste canabinóide (Caffarel et al., 2008).

O JunD é um dos membros dos fatores de transcrição da família de ativadores de proteína 1 (AP-1). Os membros desta família foram associados à proliferação celular, transformação oncogênica, metástases e angiogênese tumorais (Mechta-Grigoriou et al., 2001; Efert and Wagner, 2003). No entanto, estudos recentes revelaram que as suas funções dependem do contexto celular, da natureza do estímulo e do membro particular da família AP-1 em questão (Caffarel et al., 2008). Embora o foco deste estudo tenha sido a investigação do JunD nos efeitos antiproliferativos do delta-9-THC, a participação de outros membros da família AP-1 (ativador de proteína-1) nos sinais evocados pelo THC não pode ser descartada (Caffarel et al., 2008). As mesma forma, não deve ser descartada a participação de outros fatores de transcrição modulados pelo THC, como o Id2 e o Zfp36L1, ou até outros fatores não transcripcionais relacionados aos genes, nos eventos primários subjacentes aos efeitos antiproliferativos descritos neste estudo (Caffarel et al., 2008).

Em relação aos mecanismos subjacentes aos efeitos antiproliferativos exercidos pelos canabinóides sintéticos JWH-133 e WIN 55,212-2, foi mostrado

que estes canabinóides induziram a uma significativa redução dos níveis de PGE₂, bem como a uma diminuição significativa dos níveis de COX-2 (Qamri et al., 2009). Uma diminuição de 6-8 vezes na expressão de COX-2 também foi verificada em tecidos tumorais excisionados (Qamri et al., 2009). Para confirmar uma relação direta entre a infra-regulação da COX-2 e a indução de apoptose pelos canabinóides sintéticos, foi feita coincubação do canabinóide JWH-133 ou WIN 55,212-2 com o inibidor da COX-2, NS-398. Nestes experimentos, foi verificado uma indução significativa de apoptose nas células tumorais em relação ao controle (uso isolado dos canabinóides) (Qamri et al., 2009). Estes dados sugerem que a associação destes canabinóides com os inibidores da COX-2 pode representar uma nova estratégia quimiopreventiva para o tratamento do câncer de mama.

A infra-regulação da COX-2 verificada pelos canabinóides sintéticos contrasta com outras pesquisas que mostram que os endocanabinóides exercem seus efeitos antiproliferativos pela supra-regulação da COX-2 em outros modelos tumorais (Patsos et al., 2005b; Van Dross, 2009). Uma hipótese para esta discrepância é a de que o endocanabinóide AEA, utilizado nestas outras células, tem seus efeitos mediados através de mecanismos receptor-independentes, diferente do verificado pelos canabinóides sintéticos (Qamr et al.i, 2009). Já em relação aos efeitos dos canabinóides sintéticos na diminuição da secreção de PGE₂, houve concordância com vários outros estudos que mostraram que o aumento da secreção desta prostaglandina está relacionado à estimulação da proliferação celular tumoral (Qiao et al., 1995; Mutah et al., 2002; Pozzi et al., 2004).

Qamri (2009) mostrou, adicionalmente, que a atividade da Cdc42 foi significativamente diminuída pelos canabinóides JWH-133 e WIN 55,212-2. A Cdc42 é um importante membro da família GTPase que, por sua vez, tem sido implicada na regulação da expressão da COX-2 em diferentes linhas de células (Qamri et al., 2009). Em análise dos extratos nucleares das células MDA-MB-231, obtida de células tratadas com canabinóides, também foi mostrado uma expressão reduzida da c-Fos e c-Jun, em comparação com as células controle (Qamri et al., 2009). Estes fatores de transcrição também são relacionados à ativação da COX-2

(Chen et al., 2005). Estes dados sugerem que a inibição da expressão da COX-2 verificada também deve ser regulada pela reduzida expressão destes fatores de transcrição nas células tumorais da mama.

EFEITOS POTENCIALIZADORES DA PEA E DA OLEAMIDA NOS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DOS CANABINÓIDES

As células EFM-19 contém enzimas com uma atividade de hidrólise da AEA ligada à membrana, com dependência de pH e sensibilidade aos inibidores de forma semelhante aos previamente relatados para a FAAH (Bisogno et al., 1998). Também expressam, além da AEA e de seu precursor N-araquidonoil-Ptd-Etanolamidas, a oleamida e a enzima FAAH, o que mostra que estas células tem os meios para sintetizar e inativar ambas as amidas bioativas de ácidos graxos (Bisogno et al., 1998). Desta forma, sugere-se que a AEA e a Oleamida podem funcionar como autócrinas, ou seja, apresentam mecanismos protetivos para a infra-regulação da proliferação celular das células cancerígenas humanas de mama (Bisogno et al., 1998).

Em seu estudo, Bisogno (1998), mostrou que a Oleamida exerceu uma significativa ação citostática nas células EFM-19, porém em concentrações maiores do que a AEA ($IC_{50} = 11.3 \mu M$) (Bisogno et al., 1998). É interessante observar que, embora a Oleamida não se ligue ao receptor CB1, teve a sua ação citostática mediada pelo mesmo, sugerindo que esta ação seja mediada por uma substância endógena canabinóide, possivelmente a AEA (Bisogno et al., 1998). Porém, em concentrações inefetivas para inibir a proliferação celular ($0.5 \mu M$), quando associada à AEA, fez com que a ação antiproliferativa da AEA fosse significativamente potencializada ($IC_{50} \text{ AEA} = 1.2 \mu M$) (Bisogno et al., 1998). A presença da oleamida no meio de incubação provocou uma significativa inibição da hidrólise da AEA deixando, desta forma, maior concentração de AEA disponível, por exemplo, para a ativação do receptor CB1.

Melck (1999) também descreveu que a estimulação da MAPK pela AEA foi aumentada pelos inibidores da hidrólise da AEA (1 μ M) e pela Oleamida (50 μ M). Aliás, alguns estudos descrevem que as células tumorais humanas de mama hidrolizam rapidamente este endocanabinóide (De Petrocellis et al., 1998; Bisogno et al., 1998). Por conseguinte, os inibidores da hidrólise enzimática da AEA aumentam significativamente os efeitos da AEA, tanto na proliferação celular quanto na atividade MAPK (De Petrocellis et al., 1998; Melck et al., 1999). Estes achados também indicam estes inibidores como possíveis alvos terapêuticos nestas células tumorais.

A PEA, por outro lado, não exerce efeito antiproliferativo nas células tumorais humanas da mama por si só (Bisogno et al., 1998; Di Marzo et al., 2001). Mas, assim como a Oleamida, tem efeito potencializador na ação antiproliferativa da AEA (Di Marzo et al., 2001). Este efeito da PEA na ação da AEA se deve, em parte, pela inibição da expressão e da atividade da FAAH em tratamento das células MCF-7 por longo período de incubação (Di Marzo et al., 2001). Outros mecanismos além deste devem ocorrer sobre as ações citostáticas da AEA, pois houve a observação de que a PEA apresenta efeito sinérgico também com o HU-210, que não pode ser hidrolisado pela FAAH (Di Marzo et al., 2001). Outros estudos descrevem também que a PEA, independentemente da FAAH, pode aumentar significativamente os efeitos agudos da AEA pela mediação dos receptores vanilóides VR1 (De Petrocellis et al., 2000).

Embora tenha sido sugerido previamente que a PEA age como um agonista do receptor CB2 (Facci et al., 1995; Calignano et al., 1998), esta hipótese não é suportada por dados recentes (Lambert et al., 1999; Griffin et al., 2000; Sheskin et al., 1997). No estudo de Di Marzo (2001), os efeitos da PEA na proliferação das células tumorais da mama não foram mediados pelo receptor CB2. A PEA também não apresenta afinidade para os receptores CB1 (Lambert et al., 1999; Griffin et al., 2000; Sheskin et al., 1997).

EFEITOS ANTIMETASTÁTICOS

O estágio de metástase dispõem atualmente de estratégias geralmente inespecíficas e altamente tóxicas (McAllister et al., 2007). Isso se deve, em parte, à falta de conhecimento sobre os mecanismos moleculares que regulam o desenvolvimento de tumores agressivos. A busca por conhecimentos sobre estes mecanismos tem caráter de urgência, tendo em vista a alta mortalidade verificada nestes estágios tardios do câncer. Esta revisão contemplou quatro canabinóides (CBD, Met-F-AEA, JWH-133 e WIN 55,212-2) nos efeitos antimigratórios das células tumorais agressivas de mama.

Grimaldi descreveu, em relação aos efeitos antimetastáticos da Met-F-AEA (10 μ M) *in vitro*, que a mesma diminuiu significativamente a adesão e a migração ao colágeno tipo IV, que é um dos componentes mais representativos do embasamento da membrana, embora não tenha havido modificação da expressão da molécula integrina (Grimaldi et al., 2006). Também diminuiu significativamente a fosforilação da FAK e da Src, duas tirosinas quinases envolvidas na migração e na adesão celular nas células MDA-MB-231 (Grimaldi et al., 2006). No estudo *in vivo*, este autor mostrou que a Met-F-AEA reduziu significativamente o número e a dimensão de nódulos de metástase de pulmão provenientes de tumor primário de mama (células TSA-E1), efeito este mediado pelo receptor CB1 (Grimaldi et al., 2006).

A disseminação metastática de células epiteliais depende da invasão celular tumoral no embasamento da membrana com subsequente migração, sobrevivência na circulação, e finalmente adesão e invasão para dentro dos tecidos ectópicos. Estes passos envolvem a cooperação entre integrinas, uma família de receptores de adesão trans-membrana, e matriz metaloproteinases (Grimaldi et al., 2006). As integrinas e a FAK são moléculas que têm sido associadas com o desenvolvimento de fenótipos mais invasivos e metastáticos. Os dados deste estudo indicam que, embora a expressão da integrina na membrana superficial da célula não tenha sido significativamente mudada pela Met-F-AEA, a afinidade da célula cancerígena pelo colágeno IV e a migração

foram fortemente reduzidas, assim sugerindo uma mudança de estado de ativação de determinadas integrinas (Grimaldi et al., 2006).

Muitos dos componentes da formação de metástases, como a anulação do contato entre as células, remodelação das interações da matriz celular e movimento das células pela mediação do citoesqueleto da actina, são controlados pelos membros da superfamília de proteínas que se ligam à GTP, Ras, que incluem a subfamília RND1/2/3 (Laezza et al., 2008). Assim, o oncogene K-ras pode contribuir para a malignidade através de efeitos na angiogênese, invasão e metástases (Grimaldi, 2006). Estudos prévios já descreveram que a estimulação dos receptores CB1, pela Met-F-AEA, inibe a atividade *ras* (Bifulco et al., 2001). Terapias que tem como alvo a K-ras, incluindo as drogas baseadas em canabinóides, pode ter utilidade particularmente através destes mecanismos (Grimaldi et al., 2006).

A interação entre as RDN1/2/3 controla todos os aspectos da motilidade e invasão celular pela conseguinte ativação do mecanismo RHOA (Laezza et al., 2008). Esta, uma vez ativada, ativa um complexo conjunto de sinais associadas à RHO, contendo mecanismo de ativação da proteína quinase (ROCK) (Laezza et al., 2008), a qual é responsável pela polimerização da actina necessária para a locomoção celular (Zhong et al., 2005). O mecanismo de hipofosforilação das tirosinas quinases (FAK e Src) é, inclusive, interconectado com o mecanismo das quinase RHOA/RHO para a regulação da migração celular (Frame, 2004).

Laezza (2008), em seu estudo, mostrou que o agonista CB1 Met-F-AEA (2.5-10 μ M) diminuiu os níveis da GTP-RHOA de forma tempo- (0-1 h.) e concentração- dependentes (significante em concentrações de 10 μ M), infra-regulando o mecanismo RHOA-ROCK nas células tumorais agressivas MDA-MB-231 pela mediação do receptor CB1. A Met-F-AEA também afetou a distribuição da RHOA e conseqüentemente a organização da actina (Laezza et al., 2008). Nas células tumorais tratadas com este canabinóide houve atenuação da translocação de RHOA do citosol (forma inativa) para a membrana plasmática (forma ativa) de forma tempo-dependente, com conseqüente redução significativa da formação das fibras de stress, através da interação com as RDN1/2/3 (Laezza et al., 2008).

Desta forma, houve perda de força de tração dependente do citoesqueleto da actina, necessário para a motilidade celular, e conseqüente efeito antimigratório deste canabinóide. A importância deste mecanismo foi confirmada por experimentos com superexpressão da RHOA dominante negativa e com inativação da família RHOA. Nestes experimentos houve inibição significativa na organização das fibras de stress e na migração (Laezza et al., 2008). Também estudo com inibição da ROCK induziu diminuição da transmigração das células MDA-MB-231 através membranas revestidas de Matrigel, com conseqüente redução na formação de fibras de stress (Laezza et al., 2008).

Estes dados, conjuntamente, sugerem que os receptores CB1 devem ser um alvo para estratégias terapêuticas com o objetivo de retardar o crescimento e o espalhamento metastático dos carcinomas de mama (Grimaldi et al., 2006).

Em estudo com células tumorais MDA-MB-231 e MDA-MB-468, Qamri (2009) mostrou que os canabinóides sintéticos JWH-133 e WIN 55,212-2 induziram a uma diminuição da migração, *in vitro*, das células MDA-MB-231 (concentração $\geq 5 \mu\text{M}$) e MDA-MB-468 (concentração $\geq 7.5 \mu\text{M}$). No caso, estes efeitos *in vitro* foram mediados pelo receptor CB2. Em seu estudo *in vivo*, por outro lado, mostrou que estes canabinóides (5 mg/kg/dia) induziram a uma redução significativa do número e do tamanho dos nódulos metastáticos de pulmão, oriundos de tumor primário de mama (MDA-MB-231), pela mediação dos respectivos receptores canabinóides (Qamri et al., 2009).

Metástases no pulmão, derivadas de inoculação de células MDA-MB-231 em ratos, também foram significativamente diminuídas pelo tratamento com o Canabidiol (IC50 = 6-10.6 μM), bem como o CBD enriquecido com extratos da planta Cannabis (Ligresti et al., 2006). Estes dados estão em concordância com ações inibitórias na migração de células tumorais previamente descritas para o CBD (Vaccani et al., 2005).

McAllister (2007), por sua vez, estudando os efeitos antimetastáticos de vários canabinóides nas células tumorais de mama, MDA-MB-231 e MDA-MB-436, mostrou que o CBD, o delta-9-THC e o WIN 55,212-2 (todos com concentrações de 0.1-1.5 μM) diminuíram significativamente a invasão das células tumorais mais

agressivas, MDA-MB-231, sendo o CBD o potente dos canabinóides. Os resultados significantes obtidos neste estudo, com baixas concentrações de canabinóides em comparação com as dos estudos de Ligresti (2006) e Qamri (2009), deve-se provavelmente ao fato de que estes experimentos foram feitos em meio de cultura com baixas concentrações de soro, diferentes dos outros dois estudos, que utilizaram meio de cultura com altas concentrações de soro.

McAllister (2007) também pesquisou os efeitos dos CBD na expressão da proteína Id-1. Estudos prévios mostraram que a proteína Id-1 tem um papel crucial durante a progressão do câncer de mama (Fong et al., 2003). Esta proteína estimula a proliferação, migração e invasão nas células tumorais de mama (Lin, et al. 2000; Desprez et al., 1998). Adicionalmente foi descrito que a segmentação da expressão Id-1 reduz parcialmente a invasão das células tumorais de mama *in vitro* e as metástases de câncer de mama em estudos animais (Fong et al., 2003; Minn et al., 2005). Baseado nestes dados existe a hipótese de que a inibição da expressão e/ou atividade da Id-1 poderia ser benéfica para pacientes com câncer de mama. No entanto, abordagens na segmentação da expressão de Id-1, incluindo terapia gênica não são rotineiramente usadas na clínica, sendo necessário do desenvolvimento de outras estratégias para esse fim.

McAllister (2007) mostrou que o CBD (0.1-1.5 μM) inibiu a expressão da proteína Id-1 de forma concentração-dependente, mesmo em concentrações submicromolares, sendo significativamente mais efetivo que os outros canabinóides. E que a inibição da Id-1 precedeu os efeitos inibitórios do CBD na proliferação e na invasividade (McAllister et al., 2007), o que sugere que esta infra-regulação representa a causa, e não a consequência, na diminuição da agressividade das células tumorais mamárias. Adicionalmente, mostrou que o CBD também modulou a proteína Id-1 nos níveis de expressão de gene, infra-regulando os níveis do gene Id-1 mRNA e do produto do gene Id-1 (434 bp); efeito também reproduzido nas células MDA-MB-436 (McAllister et al., 2007). Este efeito inibitório da proteína Id-1, bem como a modulação desta proteína nos níveis de expressão dos genes, pelo CBD, foram reproduzidos nas células menos

metastáticas MDA-MB-436, sugerindo um fenômeno mais geral que particular (McAllister et al., 2007).

Este estudo mostrou, portanto, que a ação do CBD nestas células induziu efetivamente a uma inibição de mudanças genóticas e fenotípicas que levam os tumores agressivos à invasão e metástase. Experimento importante realizado neste estudo, em que houve expressão ectópica da Id-1 nas células MDA-MB-231 revelou anulação dos efeitos do CBD na invasão celular (McAllister et al., 2007). Baseado em estudos prévios (Fong et al., 2004), sugere-se que a diminuição da proteína Id-1, sob o tratamento com CBD, poderia conseqüentemente levar a uma infra-regulação dos genes promotores do crescimento como o *Zfp289* assim como a uma infra-regulação dos genes promotores de invasão, como os da membrana da matriz metaloproteinases (*MT1-MMP*) (McAllister et al., 2007).

Este efeito na redução da expressão da Id-1 pelos canabinóides poderia fornecer uma estratégia terapêutica também para outros tipos agressivos de câncer. Isso porque a supra-regulação da expressão da Id-1 foi encontrada durante a progressão da maioria dos tumores sólidos investigados (Ling et al., 2006).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS TUMORES DO CÉRVIX UTERINO

A conscientização sobre a necessidade de prevenção do câncer de colo uterino, bem como a descoberta de vacina contra o HPV diminuíram a incidência destes tumores nos últimos anos. No entanto, eles continuam sendo a segunda maior causa de câncer em mulheres (Contassot et al., 2004b; Barthi et al., 2009).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Os receptores canabinóides CB1 e CB2 e o receptor vanilóide VR1 foram expressos nas linhas de células tumorais HeLa, Caski e C299. Os receptores canabinóides também foram expressos nas células SW756. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais cervicais, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

Mon (1981) foi o primeiro autor a demonstrar os efeitos antiproliferativos dos canabinóides nas células tumorais cervicais. Em seu estudo, com duração de 24 hs, mostrou que os fitocannabinóides delta-9-THC (5, 10, 15, 20, 40 μM), delta-8-THC (1, 5, 10 μM), 11-OH-delta-9-THC (5, 10, 15 μM) e canabinol (5, 10, 15 μM) diminuíram o crescimento exponencial das células HeLa S3 de forma concentração-dependente. O delta-8-THC, por sua vez, foi o canabinóide que exerceu efeito antiproliferativo mais pronunciado nestas células (Mon et al., 1981).

Contassot (2004b), por sua vez, pesquisou o efeito do endocannabinóide AEA não apenas nas linhas de células HeLa, mas também nas linhas de células Caski e C299. Em estudo com duração de 5 dias, mostrou que este canabinóide, em concentrações de variaram de 3-100 μM , diminuiu a viabilidade celular e induziu apoptose de forma concentração-dependente (significativamente em concentrações acima de 30 μM) nestas células. Estes efeitos foram mediados pelo receptor VR1, pois o antagonista do receptor vanilóide (capsazepina) atenuou a

apoptose induzida pela AEA (Contassot et al., 2004b). Os antagonistas dos receptores canabinóides, por outro lado, além de não terem mediado os efeitos antitumorais deste canabinóide, apresentaram efeito sinérgico com o mesmo (Contassot et al., 2004b).

O análogo estável da AEA (meAEA) (Ramer and Hinz, 2008; Eichele et al., 2009), bem como o delta-9-THC (Ramer and Hinz, 2008) também tiveram seus efeitos estudados nas células HeLa. Em estudo com duração de 72 hs, Eichele (2009) mostrou que a meAEA (10 μ M) induziu apoptose (fragmentação do DNA) significativa nestas células em diferentes pontos do tempo. Verificou, no entanto, que este efeito ocorreu através de mecanismo receptor-independente (Eichele et al., 2009), diferente do que foi relatado para os efeitos apoptóticos induzidos pela AEA nestas células (Contassot et al., 2004b).

Ramer (2008), por sua vez, em experimento de ensaio para a verificação do efeito dos canabinóides na invasidade tumoral (células com alta densidade) das células HeLa, observou que a meAEA (10 μ M) e o delta-9-THC (1 μ M) não diminuíram a viabilidade das mesmas sob estas condições. No entanto, efeitos de toxicidade celular, através de mecanismo receptor-independente, foram observados pela ação de ambos os canabinóides quando houve diminuição experimental da densidade celular (Ramer and Hinz, 2008), sendo este resultado compatível com a baixa densidade celular descrita nos ensaios de Eichele (2009). Através deste experimento, Ramer (2008) relatou pela primeira vez que a toxicidade induzida pelos canabinóides é dependente da densidade celular (Ramer and Hinz, 2008). Este efeito já foi bem documentado em estudos com vários quimioterápicos, incluindo tamoxifeno (Brandt et al., 2004), doxorubicina, e vincristina (Kobayashi et al., 1992). Nestes estudos, foi descrito que as drogas quimioterápicas apresentavam “efeito inócuo” em ensaios de células com alta densidade, resultando em disponibilidade comprometida das mesmas em seus sítios de ligação intracelulares (Kobayashi et al., 1992).

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Contassot (2004b) avaliou as ações da AEA nos mecanismos de caspases das células HeLa, Caski e C299 e descreveu que a mesma induziu a uma ativação da caspase 7 nestas células.

Eichele (2009), por sua vez, realizou vários experimentos no intuito de avaliar os efeitos moleculares da meAEA (10 μ M) nas células HeLa. Em seu estudo, mostrou que este canabinóide induziu seus efeitos na morte celular pela mediação da ceramida, pois o inibidor desta, fumonisina B1, inibiu os efeitos da meAEA nestas células. Adicionalmente, relatou a indução de um aumento da expressão da COX-2 e subsequente síntese de PGs pela meAEA nas células HeLa (Eichele et al., 2009). Salienta-se que a ceramida foi previamente relatada como indutora da expressão da COX-2 e como ativadora das MAPKs (Subbaramaiah et al., 1998). A ativação das MAPKs, por sua vez, foram implicadas como eventos reguladores precoces da expressão da COX-2 (Ramer et al., 2001).

Eichele (2009), em seu estudo, confirmou uma relação direta entre a COX-2 e a apoptose. Isso foi verificado em experimentos com inibição da expressão da COX-2 (siRNA COX-2) nas células HeLa, onde se observou que a apoptose (fragmentação do DNA) induzida pela meAEA foi inibida e o aumento da proteína COX-2 por este canabinóide foi abolida (Eichele et al., 2009). Adicionalmente, foi mostrado que o inibidor da COX-2 (NS-398) interferiu significativamente com a ação citotóxica e pró-apoptótica da meAEA, inibindo completamente a indução da síntese de PGE2 e PGD2 pela mesma (Eichele et al., 2009). De forma interessante, o NS-398 também inibiu, mas não de forma significativa, a expressão da COX-2 mRNA, sugerindo uma regulação de feedback positivo da expressão da COX-2 pelos derivados desta (PGs) (Eichele et al., 2009), um fenômeno já relatado por vários autores (Hinz et al., 2000; Debey et al., 2003; Rosch et al., 2005). Estes dados, conjuntamente, sugerem que a meAEA induziu morte celular apoptótica através da liberação de prostaglandinas por este canabinóide, induzida pelo aumento da COX-2. Adicionalmente, este estudo mostrou que a PGD2 e seu

produto desidratado 15d-PGJ2 foram os principais produtos da meAEA responsáveis pela apoptose das células HeLa (Eichele et al., 2009). Isso foi verificado pela observação, em experimento, de que a supressão da L-PGDS (siRNA LPGDS) diminuiu a apoptose induzida pela meAEA bem como inibiu a expressão da proteína L-PGDS basal (Eichele et al., 2009). A L-PGDS catalisa a conversão de PGH2 em PGD2 e é conhecida por induzir a apoptose (Herlong and Scott, 2006). A PGD2 e seu produto desidratado 15d-PGJ2 também foram descritas, em outro estudo, como indutores de apoptose nas células HeLa, diferente do que foi mostrado pela PGE2 nestas células (Eichele et al., 2009).

Este estudo também mostrou que a ativação da PPAR γ mediou a apoptose induzida pela meAEA nas células HeLa (Eichele et al., 2009). Em experimentos, foi verificado que a inibição da PPAR γ (siRNA PPAR γ) aboliu a apoptose induzida pela meAEA, sendo este efeito também obtido pelo antagonista do PPAR γ . (Eichele et al., 2009). Adicionalmente, o agonista do PPAR γ imitou os efeitos apoptóticos da meAEA (Eichele et al., 2009). Já houve relato, em um estudo, de que a PGD2 ativa a PPAR γ (Kim et al., 2005). Esta ativação, por outros compostos, já foi relatada como inibidores do crescimento celular tumoral *in vitro* e em modelos animais (Na and Surh, 2003; Kim et al., 2005; Han and Roman, 2007).

Por fim, os efeitos pró-apoptóticos da meAEA, dependentes da COX-2 e do PPAR γ , foram também observados nas células C33A do carcinoma cervical humano e nas células A549 do carcinoma de pulmão, sugerindo que ambas as proteínas são mediadoras-chave da apoptose induzida pela meAEA (Eichele et al., 2009).

EFEITOS ANTIMETASTÁTICOS

Rudolph (2008) descreveu a influência dos mastócitos no aumento da taxa de migração das células SW756 do carcinoma cervical humano, sendo este efeito inibido pelo 2-AG (100 nM) e pelo WIN 55,212-2 (30 μ M). Também mostrou que o

2-AG (10-100 nM) e o WIN 55,212-2 (1-30 μ M) inibiram a taxa de migração das células SW756 de forma concentração-dependente pela mediação do receptor canabinóide CB1 (Rudolph et al., 2008).

Ramer (2008), por sua vez, descreveu que a metanandamida (0.1-10 μ M) e o delta-9-THC (0.01-1 μ M) induziram a uma diminuição da invasão das células HeLa através da reconstituição da membrana basal (Matrigel). Este efeito ocorreu de forma concentração-dependente e foi significativo mesmo com doses submicromolares, em estudo com duração de 72 hs. Este autor relatou, no entanto, que a redução da invasão celular não foi associada a uma diminuição da motilidade celular, o que sugere que o efeito dos canabinóides na invasividade destas células foi especificamente dependente da modulação de enzimas degradadas da matriz (Ramer and Hinz, 2008). Os efeitos inibitórios na invasividade de ambos os canabinóides foram mediados pelos receptores CB1 e CB2, e também pelo receptor VR1 no caso da meAEA (Ramer and Hinz, 2008). Diferente do mecanismo receptor-independente verificado para os efeitos citotóxicos em ensaios com baixa densidade celular, experimentos como este, que utilizaram alta densidade das células, mostraram um profundo efeito anti-invasivo pela mediação dos receptores descritos acima (Ramer and Hinz, 2008). Embora as observações deste estudo descartem o papel decisivo da migração na mediação da ação anti-invasiva dos canabinóides neste sistema, outros autores relataram propriedades antimigratórias dos canabinóides, sugerindo que os mesmos afetam a migração dependendo do tipo celular e/ou de maneira dependente de quimioatraentes (Ramer and Hinz, 2008).

Ramer (2008), neste estudo, também sugeriu uma ligação causal entre a ativação do receptor canabinóide, indução de TIMP-1 (inibidor do tecido da matriz metaloproteinases) e diminuição da invasividade das células HeLa (Ramer and Hinz, 2008). Foi observado que os canabinóides pesquisados induziram a um aumento do TIMP-1 bem como da expressão de sua proteína pela mediação dos receptores CB1 e CB2 (no caso do delta-9-THC e meAEA) e também VR1 (no caso apenas da meAEA) (Ramer and Hinz, 2008). Estes eventos foram verificados precocemente aos efeitos anti-invasivos (Ramer and Hinz, 2008). Adicionalmente,

houve supressão significativa dos efeitos inibitórios na invasividade, induzidos pelos canabinóides, em experimento em que o TIMP-1 foi inibido (siRNA TIMP-1), mostrando uma evidência convincente para o papel crucial do TIMP-1. Ramer (2008) também relatou o efeito anti-invasivo do tratamento com canabinóide, dependente de TIMP-1, em outra linha de células do carcinoma cervical humano (C33A), assim como nas células humanas do carcinoma de pulmão (A549) (dados não mostrados) (Ramer and Hinz, 2008). Salienta-se que vários estudos já relataram o papel do TIMP-1 em reduzir a invasividade (Khokha et al., 1989; Khokha et al., 1992; Chan et al., 2005; Cattaneo et al., 2005; Park et al., 2005a; Park et al., 2005b; Ramer et al., 2007).

Como mostrado acima, o papel do TIMP-1 foi evidente neste estudo experimental. No entanto, o próprio autor salienta que não se sabe se este dado é passível de generalização para outros tipos de células além das examinadas neste estudo, quais sejam, as células HeLa, C33A e A549. Esta colocação foi cabível, tendo em vista que foi evidenciado diminuições nos níveis de TIMP-1 com consequente efeitos antimigratórios, induzidos pelo delta-9-THC, nas células C6.9 do glioma (*in vitro* e *in vivo*), nas células do astrocitoma humano SW1088, T98 G, U87 MG, U118 MG, células do GBM (*in vitro*) e também em biópsias de pacientes do glioblastoma multiforme tratados com delta-9-THC (Blázquez et al., 2008a). Estas observações podem sugerir que as ações do TIMP-1 sejam dependentes do tipo de célula tumoral.

Os resultados deste estudo também sugerem que as MAPKs são alvo dos mecanismos receptores dos canabinóides, e que as suas ativações ocorrem anteriormente à indução do TIMP-1. Foi verificado que os canabinóides induziram fosforilação da p38 MAPK e da p42/44 MAPK pela mediação dos receptores canabinóides (Ramer and Hinz, 2008). Adicionalmente, foi mostrado que os seus respectivos inibidores antagonizaram os efeitos dos canabinóides na inibição da invasividade e no aumento da expressão do TIMP-1 (Ramer and Hinz, 2008). A observação de que o receptor VR1 não mediou os efeitos da meAEA na ativação das MAPKs (Ramer and Hinz, 2008) sugere que a ativação deste receptor

aumenta a expressão do TIMP-1 através de um mecanismo que contorna as MAPKs.

Em relação às MMPs, este estudo mostrou que, embora os canabinóides tenham induzido a uma diminuição da MMP-2, esta não parece ter contribuído para as ações anti-invasivas neste sistema experimental (Ramer and Hinz, 2008). Salienta-se que a diminuição verificada da MMP-2 não foi mediada pelos receptores canabinóides (Ramer and Hinz, 2008). Adicionalmente, em experimento em a expressão da MMP foi suprimida pelo siRNA, foi observado um papel decisivo da MMP-9 na invasão celular basal das células HeLa (Ramer and Hinz, 2008).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NO CÂNCER DE TIREÓIDE

O carcinoma de tireóide é a malignidade mais comum do sistema endócrino, responsável pela maioria das mortes decorrentes de cânceres endócrinos (Schlumberger et al., 2003; Maciel and Biscolla, 2006; Sherman, 2003). Os carcinomas diferenciados (papilares e foliculares), dependentes de *kras*, têm relativamente melhor prognóstico, mas 10-20% dos pacientes morrem devido à recorrência ou progressão destes tumores em função da falta de efetividade dos tratamentos (Shi et al., 2008). Já os carcinomas indiferenciados (anaplásticos) são altamente agressivos, com média de sobrevida dos pacientes inferior a 8 meses (Are and Shaba, 2006).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Em relação à expressão de receptores canabinóides, temos que as células KiMol e os tumores de ratos marcados com estas células expressam os receptores CB1. A expressão desses receptores também está presente nas células TK-6 e nos ratos marcados com as células MPTK-6. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais de tireóide, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

O análogo estável da AEA, Met-F-AEA, foi bastante estudado nas células tumorais da tireóide dependente do oncogene *ras*. Nos estudos incluídos nesta revisão, foi mostrado que este canabinóide não é capaz de induzir morte apoptótica nestas células. O mecanismo de sequestro do ciclo celular, por outro lado, foi descrito em um estudo (Bifulco et al., 2001) e sugerido em outro (Portella et al., 2003). Os receptores CB1, por sua vez, parecem estar presentes como mediadores nos efeitos anti-câncer nestes modelos tumorais.

Em estudo *in vitro* com duração de 24 hs, Bifulco (2001) mostrou que a Met-F-AEA (10 μ M) inibiu significativamente a proliferação das células KiMol através de sequestro do ciclo celular na fase G0/G1. A morte celular tumoral, por sua vez, não ocorreu por apoptose nem por necrose. Já no estudo realizado *in vivo*, em que a administração peritumoral da Met-F-AEA (0.5 mg/kg/dose) foi iniciada dois dias após a inoculação subcutânea de células KiMol em ratos, foi observado que a mesma induziu a uma redução significativa do peso tumoral em relação aos ratos do grupo controle (Bifulco et al., 2001). Salienta-se que os receptores CB1 mediaram os efeitos da Met-F-AEA *in vitro* e *in vivo* e que a ação da Met-F-AEA foi acompanhada por uma potente supra-regulação do mRNA deste receptor (Bifulco et al., 2001). Por outro lado, as células não transformadas da tireóide exibiram menor expressão de receptores CB1 quando tratadas com este canabinóide (Bifulco et al., 2001). Especula-se que este fenômeno deva contribuir para os papéis supressores de tumor (Bifulco et al., 2001) propostos para os endocanabinóides em outros estudos (Guzmán et al., 2001a; De Petrocellis et al., 1998; Bisogno et al., 1998), levando as células cancerígenas a responderem de forma mais eficaz aos efeitos antiproliferativos dos agonistas CB1.

Bifulco, em outro estudo (Bifulco et al., 2004), avaliou não apenas a Met-F-AEA, mas também outro análogo estável da AEA, arvanil, assim como o endocanabinóide 2-AG (todos com IC50 abaixo de 10 μ M) nas células KiMol. Nesta pesquisa, verificou que todos estes compostos inibiram a proliferação das células KiMol de forma concentração-dependente. Assim como previamente mostrado para as ações da Met-F-AEA nestas células (Bifulco et al., 2001), a morte celular tumoral não ocorreu por mecanismo apoptótico e este efeito foi observado pela ação de todos os canabinóides testados. Adicionalmente, este autor pesquisou a influência do VDM-11 (inibidor da captação celular dos endocanabinóides) e do AA-5-HT (inibidor da hidrólise dos endocanabinóides) nestas células e mostrou que os mesmos imitaram os efeitos dos canabinóides sob as mesmas concentrações. Neste estudo, a Met-F-AEA teve seus efeitos *in vitro* mediados pelo receptor CB1 (Bifulco et al., 2004). No entanto, o antagonista do receptor CB1 (SR141716) inibiu apenas um pouco os efeitos antiproliferativos

do 2-AG, AA-5-TH e do arvanil, o que sugere que estes compostos agiram através de outros mecanismos que não foram os dos receptores canabinóides (Bifulco et al., 2004). (vide abaixo). Foi verificado, adicionalmente, que todos os compostos pesquisados apresentaram evidência antitumoral *in vivo*, reduzindo significativamente o crescimento e o volume dos tumores ao final do estudo (Bifulco et al., 2004). Destaca-se que o VDM-11 foi mais eficaz que o AA-5-HT no efeito inibitório do crescimento tumoral e que ambos não provocaram efeitos tóxicos nos animais utilizados nos experimentos (Bifulco et al., 2004). Neste estudo *in vivo*, a administração peritumoral dos compostos pesquisados foi iniciada junto com a inoculação subcutânea de células KiMol nos ratos (Bifulco et al., 2004).

Portella (2003), por sua vez, também utilizando o canabinóide Met-F-AEA, descreveu que o mesmo, em concentrações de 10 μ M, inibiu a proliferação das células TK-6 e das células MPTK-6 (metastáticas de pulmão). Estas últimas, por sua vez, foram inibidas de forma mais eficaz que as primeiras. Concomitantemente à esta inibição, foi observada uma marcante supra-regulação nos níveis dos receptores CB1, bem como uma potente infra-regulação nos níveis dos receptores VEGF (verificada *in vitro* e *in vivo*; efeitos mediados pelo CB1). Estes efeitos também ocorreram de forma mais eficaz nas células metastáticas que nas células tumorais primárias da tireóide (dados não mostrados), em experimento realizado durante 4 dias (Portella et al., 2003). Assim, provavelmente através dos efeitos diferenciais na expressão dos receptores CB1, a Met-F-AEA parece apresentar potência antiproliferativa mais eficaz nas células de tireóide de ratos quanto mais estas células se tornam malignas e invasivas (Portella et al., 2003).

Portella (2003) também pesquisou os efeitos da Met-F-AEA *in vivo*, em ratos com tumores marcados com células KiMol. No entanto, diferente dos outros estudos (Bifulco et al., 2001; Bifulco et al., 2004), o tratamento com este canabinóide foi iniciado 20 dias após a inoculação subcutânea destas células nos ratos, quando os tumores já estavam estabelecidos e crescendo. Este experimento verificou que a Met-F-AEA, pela mediação dos receptores CB1,

também induziu a uma significativa redução do volume tumoral nestes ratos em relação aos ratos do grupo controle, indicando que drogas baseadas em AEA podem ser terapeuticamente eficazes na inibição do crescimento de tumores originados destas células tumorais (Portella et al., 2003). Salienta-se que as ações da Met-F-AEA *in vivo* foram exercidas com doses de 0.5 mg/kg (Portella et al., 2003). Estas doses são 10 vezes menores que as mostradas em outros estudos como sendo necessária para provocar efeitos tóxicos em ratos, como diminuição dos comportamentos motores e nocicepção (Adams et al., 1995). Os achados deste estudo e dos de Bifulco (2001; 2004) indicam, portanto, que dois componentes do sistema endógeno canabinóide, os endocanabinóides e os receptores canabinóides CB1, representam alvos potencialmente úteis para o desenvolvimento de agentes terapêuticos com o objetivo de controlar o crescimento tumoral dependente do oncogene ras, como é o caso das células KiMol (Bifulco et al., 2001; Portella et al., 2003), TK-6 e MPTK-6 (Portella et al., 2003).

Salienta-se que o fitocanabinóide CBD, bem como o CBD associado aos extratos de cannabis, também apresentaram evidências antitumorais *in vivo* em ratos com tumores marcados com células KiMol. Ligresti (2006) relatou que estes compostos analisados induziram a uma diminuição significativa dos tumores destes ratos em relação aos tumores de ratos do grupo controle (ver 'tabela de estudo incluídos', seção 'tumores de mama').

Shi (2008), por sua vez, pesquisou a influência da superexpressão do receptor CB2 nas células do carcinoma anaplástico de tireóide (ARO). Ao analisar o perfil de expressão dos genes nas células ARO e ARO/IL-12 (células ARO modificadas geneticamente com inclusão de interleucina-12), foi verificado que o gene CB2, dentre 3757 genes, foi altamente expresso, sendo esta expressão 8 vezes maior nas células ARO/IL-12 que nas células ARO (Shi et al., 2008). Desta forma, este autor mostrou, pela primeira vez, que a expressão do receptor CB2 é induzida como consequência da expressão de interleucina-12 nas linhas de células ARO. Pesquisando os efeitos dos canabinóides WIN 55,212-2 (2, 20 μ M) e JWH-133 (1, 5 μ M) nestas células, verificou que as células ARO/IL-12

(ARO/CB2) foram mais susceptíveis à apoptose induzida pelos canabinóides em comparação com as células ARO (Shi et al., 2008). Experimentos *in vivo* mostraram, adicionalmente, que o JWH-133 (50 µg/ml) induziu a uma diminuição significativa dos tumores de ratos marcados com células ARO/CB2 em relação aos tumores de ratos marcados com as células ARO. Esta superexpressão do CB2, portanto, faz com que as células ARO/IL-12 se tornem mais susceptíveis à apoptose e à regressão de seus tumores pela mediação do agonista CB2. Estas células também se mostraram mais susceptíveis à apoptose *in vitro* induzida pelo quimioterápico paclitaxel em comparação com as células ARO (Shi et al., 2008). A descoberta da superexpressão de CB2 induzida pelo IL-12 nas células de câncer de tireóide deve oferecer um novo alvo para o tratamento do câncer anaplástico de tireóide.

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Bifulco (2004) estudou a possibilidade dos endocanabinóides poderem inibir o crescimento celular tumoral também através de mecanismos que não sejam os mediados pelos receptores canabinóides. Esta hipótese foi baseada em estudos prévios em que os níveis de canabinóides são aumentados em alguns tumores (Ligresti et al., 2003; Pagotto et al., 2001; Schmid et al., 2002), e que exercem um efeito tônico inibidor da proliferação das células cancerígenas (Ligresti et al., 2003). Assim, substâncias que inibem a degradação dos endocanabinóides poderiam ser capazes de inibir o crescimento tumoral *in vivo*.

Em seu estudo, mostrou que o VDM-11 (inibidor da captação celular dos endocanabinóides) e o AA-5-HT (inibidor da hidrólise dos endocanabinóides), que quase não possuem afinidade pelos receptores canabinóides, inibiram o crescimento tumoral *in vivo* de forma tão eficaz quanto os agonistas dos receptores canabinóides (Bifulco et al., 2004). Também mostrou que estes compostos obtiveram seus efeitos pelo aumento dos níveis dos endocanabinóides

nos tumores, verificado nos tumores excisionados de ratos tratados com estes compostos (Bifulco et al., 2004).

O AA-5-HT induziu a uma significativa elevação da concentração de ambos AEA e 2-AG, enquanto o VDM-11 aumentou apenas os níveis de 2-AG (Bifulco et al., 2004). Estes achados, associados às diferenças nas eficácias antitumorais do VDM-11 e do AA-5-HT, provavelmente devidas às suas respectivas diferenças nas propriedades farmacocinéticas, sugerem a possibilidade de que a elevação dos níveis endógenos de 2-AG poderia ser suficiente, por si só, em inibir o crescimento tumoral *in vivo* pelo seu “mecanismo interno”, pois este composto é 150 a 300 vezes mais abundante que a AEA (Bifulco et al., 2004).

Diferente dos agonistas CB1, que atuam nos tecidos que expressam funcionalidade destes receptores, o uso destes compostos deve ser considerado mais específico, pois atuam somente nos tecidos que expressam canabinóides endógenos que, por sua vez, contribuem, de forma tônica, no exercício de ações protetivas nos tumores (Bifulco et al., 2004).

A possibilidade do uso de substâncias que inibem a degradação e/ou a captação celular dos endocanabinóides, abriria uma nova abordagem para drogas antitumorais que poderiam evitar, ou pelo menos limitar, os possíveis efeitos colaterais psicotrópicos e imunossupressivos típicos dos agonistas “diretos” dos receptores canabinóides (Bifulco and Di Marzo, 2002; Guzmán, 2003). Estas substâncias levariam à ativação dos receptores canabinóides preferencialmente onde ocorre a síntese e degradação dos endocanabinóides, por ex., nos sítios do crescimento tumoral (Bifulco et al., 2004).

Ao pesquisar as células KiMol e os tumores oriundos da inoculação destas células em ratos, Bifulco (2001) mostrou que os efeitos antiproliferativos e antitumorais da Met-F-AEA (10 μ M) foi acompanhado de marcante diminuição da atividade da p21ras. Utilizando a mesma amostra, Portella (2003) confirmou estes efeitos para este canabinóide seguidos de indução de uma diminuição significativa da atividade da p21ras e de um aumento, de forma significativa, dos níveis da p27KIP1 nas células KiMol *in vitro* e *in vivo*.

A p27KIP1, que comanda (inibe) a atividade da quinase dependente de ciclina-2 durante a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular, quando superexpressa, pode bloquear a progressão do ciclo celular na fase G1, inibindo a proliferação celular (Portella et al., 2003; Sarfaraz et al., 2006). Nestas condições aumentadas, também inibe a migração da célula endotelial, influenciando na inibição da angiogênese (Goukassian et al., 2001). É importante destacar que esta proteína está sob o controle negativo do oncogene *ras* na proliferação de células de tireóide epiteliais humanas (Jones et al., 2000).

MECANISMO ANTI-ANGIOGÊNICO

A maior ênfase funcional dos oncogenes, como os mutantes *ras*, como contribuidores do desenvolvimento tumoral, tem sido em seu impacto na formação do tumor, e crescimento dos mesmos, através de mecanismos indiretos como a angiogênese tumoral (Rak et al., 2000). Desta forma, mutações oncogênicas ou amplificação de *ras* são associadas com a supra-regulação do fator pró-angiogênico VEGF, cuja expressão aumentada, por sua vez, é associada com a supra-regulação de um grande número de tipos tumorais humanos ou com eventos de transformação celular (Rak et al., 2000; Viglietto et al., 1995; Wang et al., 1998; Miyagi et al., 2001; Hetian et al., 2002).

A Met-F-AEA, através da ativação do receptor CB1, foi capaz de bloquear a atividade da p21*ras*, com conseqüente redução marcante dos níveis de expressão do VEGF, bem como dos níveis de expressão do VEGFR1 (Portella et al., 2003), um dos dois receptores que tem papel crucial na medição da neoangiogênese e da proliferação endotelial (Fusco et al., 1982; Viglietto et al., 1995; Viglietto et al., 1997; Belletti et al., 1999; Rak et al., 2000; Pisanti et al., 2007). Esta infra-regulação dos níveis VEGF e VEGFR1 foram observadas nos tumores KiMol, (*in vivo*), e também nas células KiMol, TK-6 e MPTK-6 (*in vitro*) (Portella et al., 2003).

O papel do receptor CB1 nos efeitos antiangiogênicos da Met-F-AEA também foi demonstrado por Pisanti (2007) nas células endoteliais de aorta de

porco (PAE) e nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) *in vitro*. Em estudo com duração de 24 hs, este autor mostrou que Met-F-AEA (5-20 μM) apresentou efeito inibitório da proliferação das mesmas, induzida pelo bFGF (fator de crescimento fibroblástico básico). Este estudo verificou que a Met-F-AEA (10 μM) não alterou a distribuição de células nas fases do ciclo celular, sendo descartado o mecanismo de sequestro do ciclo celular. Por outro lado, foi observada apoptose das células endoteliais, sendo este efeito mediado parcialmente pelo receptor CB1. Pesquisando os mecanismos moleculares subjacentes à apoptose das células endoteliais induzida por este canabinóide, foi relatado que o mesmo induziu a uma ativação da p38 MAPK e da NFkB (Pisanti et al., 2007), modulando, desta forma, alguns fatores de sobrevivência. No entanto, apenas a ativação da p38 MAPK mediou os efeitos da Met-F-AEA, pela verificação de que somente o seu inibidor específico atenuou os efeitos deste canabinóide (Pisanti et al., 2007).

Este estudo também realizou experimentos para testar a potência inibitória da Met-F-AEA na diferenciação das células endoteliais em estruturas tubulares, que é considerada uma função crucial das células endoteliais no processo de angiogênese. Utilizando as células endoteliais PAE como amostra, em ensaio para formação de tubo bidimensional *in vitro*, foi verificada que a Met-F-AEA (10 μM) diminuiu significativamente a formação de redes capilares, induzidas pelo bFGF, através de significativa redução do número de intersecções de estruturas tubulares, em estudo com duração de 6 hs. Outro experimento, utilizando como amostra as HUVECs *in vitro*, verificou que a Met-F-AEA (10 μM) diminuiu significativamente a atividade MMP-2 pela mediação do receptor CB1, em estudo com duração de 24 hs. A MMP-2 tem um papel importante na remodelação da matriz e na formação de novos vasos durante a angiogênese (Bussolino et al., 1997; Davis and Senger, 2005).

Pisanti (2007) pesquisou adicionalmente os efeitos da Met-F-AEA nas células tumorais KiMol em ensaios bidimensionais *in vitro*. Neste experimento, mostrou que a Met-F-AEA foi efetiva em inibir o processo de renovação da angiogênese, induzindo uma forte redução do número de novos vasos e também

no tamanho médio dos mesmos. Ensaios tridimensionais, utilizando como amostra as células KiMol e as PAE mostraram estes mesmos efeitos. Este estudo relatou, adicionalmente, que a Met-F-AEA inibiu a atividade angiogênica *in vivo*, induzindo uma redução de 2.8 vezes no número de novos vasos sanguíneos formados, comparados ao controle (modelo de ensaio de membrana 'chick' corioalantóicas (CAM)) (Pisanti et al., 2007). Desta forma, este estudo mostrou, em vários ensaios, as ações antiangiogênicas induzidas pela Met-F-AEA. Associada às suas ações inibidoras do crescimento das células tumorais da tireóide, mostra-se como um composto promissor para o tratamento dessas malignidades.

É sabido que múltiplos mecanismos estão envolvidos na proliferação das células tumorais e que terapias combinadas são geralmente mais efetivas que a administração de uma única droga. As substâncias canabimiméticas podem ser um alvo potencial na complementação terapêutica de outros agentes antitumorais que afetam ou não os mecanismos mediados pela K-ras.

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NO CÂNCER DO PULMÃO

Os cânceres de pulmão são a maior causa de mortes por câncer no mundo. A alta proporção de casos fatais observados nestes tipos de tumores é atribuída à baixa resposta às terapias atuais e à natureza biológica agressiva da doença (Preet et al., 2008). Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Os receptores CB1 e CB2 foram identificados nas células A549 e SW-1573. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais de pulmão, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES

Munson (1975) foi o primeiro pesquisador a descrever os efeitos antitumorais dos canabinóides. Utilizando células do adenocarcinoma Lewis de pulmão mostrou, em estudo *in vivo*, que os canabinóides delta-9-THC (25-100 mg/kg), delta-8-THC (50-400 mg/kg) e canabinol (100 mg/kg) inibiram o crescimento dos tumores de ratos marcados com estas células tumorais (Munson et al., 1975). O canabidiol, por outro lado, induziu a uma aumento do crescimento tumoral (Munson et al., 1975). Em relação aos efeitos dos canabinóides na sobrevivência dos ratos, este autor descreveu que o delta-8-THC apresentou maior potência neste efeito em relação aos outros compostos. O delta-9-THC, por sua vez, também aumentou a sobrevivência dos ratos, porém apenas em sua dosagem máxima (400 mg/kg), que seria considerada tóxica para o ser humano (Munson et al., 1975). Neste estudo, também foi observado efeito de tolerância, pois dias após o término do tratamento foi verificado que os tumores dos ratos tratados com os canabinóides voltaram a crescer em patamares próximos aos dos tumores dos ratos do grupo controle (Munson et al., 1975).

Sarafian (2002a) descreveu, por sua vez, em estudo *in vitro* com duração de 24 hs, que o delta-9-THC (0-15 µg/ml) diminuiu a viabilidade das células tumorais A549, de forma concentração-dependente a partir de 5 µg/ml, e de forma significativa a partir de 12.5 µg/ml. Adicionalmente, verificou que este canabinóide induziu a uma diminuição da reserva energética (ATP) destas células de forma concentração-dependente (de forma significativa a partir de 5 µg/ml de concentração) (Sarafian et al., 2002). Este evento ocorreu precocemente, a partir de 1 h de exposição ao delta-9-THC, e levou a uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial (Sarafian et al., 2002).

Este mesmo autor, em outro estudo (Sarafian et al., 2002b), investigou a influência do estresse oxidativo na toxicidade induzida pelo delta-9-THC nas células tumorais A549. Neste estudo, mostrou que o delta-9-THC (IC₅₀ = 16-18 µM/ml) induziu morte dessas células por mecanismo necrótico (Sarafian et al., 2002b). Adicionalmente, mostrou que o mesmo (10 µg/ml) não teve efeito na geração de ROS nas células A549, diferente do que foi verificado em experimento, neste estudo, com a droga estimulante de apetite, BHA (50 e 100 µM) (Sarafian et al., 2002b). Por outro lado, descreveu que o tratamento conjunto de ambas as drogas pesquisadas neste estudo aumentou em aproximadamente 30% a morte necrótica dessas células (Sarafian et al., 2002b). No entanto, o efeito na geração de ROS, pelo BHA, não foi aumentado pelo co-tratamento com este canabinóide (Sarafian et al., 2002b). Desta forma, mostrou que o sinergismo na toxicidade descrito acima não ocorreu pelo mecanismo de estresse oxidativo. Por outro lado, descreveu que o delta-9-THC induziu citotoxicidade através da diminuição da reserva energética dessas células e que este efeito foi sinérgico com o co-tratamento com BHA (Sarafian et al., 2002b).

Athanasiou (2007), por sua vez, pesquisando as células H460 (câncer de pulmão que não são de pequenas células), mostrou que os canabinóides AEA, delta-9-THC e HU-210 (todos com 100 µM) induziram a mudanças morfológicas características de apoptose nestas células, após tratamento por 2 horas. Adicionalmente, descreveu que estes efeitos foram diretamente relacionados à modulação da função mitocondrial. Isso foi verificado pela observação, em

experimentos com mitocôndrias de coração de ratos, de que estes canabinóides (0-20 μM) induziram a uma diminuição do potencial da membrana mitocondrial e a uma diminuição do consumo do oxigênio mitocondrial (Athanasίου et al., 2007). Em concentrações de 0-100 μM , os mesmos causaram mudanças bifásicas na atividade do complexo mitocondrial I e II-III (Athanasίου et al., 2007).

A verificação do aumento da atividade do complexo I, induzido por baixas concentrações dos canabinóides deve-se a mudanças do fluido da membrana (Patel and Katyare, 2006). Isso sugere que os canabinóides possam ser moduladores fisiológicos/patológicos da função mitocondrial (Athanasίου et al., 2007). Mudanças bifásicas, concentração-dependentes, na atividade da ATPase e no inchaço mitocondrial são sugestivos de ocorrência de interação do delta-9-THC com receptores fosfolipídicos da proteína na membrana mitocondrial (Bino et al., 1972). Outro estudo, utilizando mitocôndrias vivas, mostrou que o delta-9-THC causou inchaço mitocondrial e liberação de enzimas da matriz, sugerindo que o mesmo obteve seus efeitos pela desestabilização da cardiolipina, um fosfolípido mitocondrial (Mahoney and Harris, 1972). Qualquer interação entre canabinóides e cardiolipina é considerada potencialmente importante, pois a modulação do estado de oxidação do citocromo c pode causar a sua liberação da membrana interna da cardiolipina para o espaço intermembrana, assim sensibilizando as concentrações livres de citocromo c, o que favorece a apoptose mitocondrial (Ott et al., 2007).

Preet (2008), por sua vez, ampliou as bases do conhecimento sobre os mecanismos de ação subjacentes aos efeitos antitumorais do delta-9-THC no câncer de pulmão. Pesquisando as células tumorais A549 e SW-1543 (adenocarcinomas de pulmão que não são de pequenas células), mostrou que o delta-9-THC (1-20 μM) não teve efeito significativo na viabilidade celular em estudo com duração de 24 hs (Preet et al., 2008). No entanto, induziu apoptose e inibiu a proliferação celular em tratamento por 72 hs (dados não mostrados) (Preet et al., 2008).

A maioria das células tumorais do adenocarcinoma de pulmão (não de pequenas células) superexpressam o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) (Preet et al., 2008), o qual tem sido correlacionado a prognóstico pobre e

resistência à quimioterapia (Yarden, 2001). Preet (2008) mostrou, pela primeira vez, que o delta-9-THC (10 μ M) diminuiu os efeitos na migração e na invasão, induzidos pelo EGF, das linhas de células A549 e SW-1543 *in vitro*. Adicionalmente, verificou que este canabinóide inibiu o crescimento do câncer de pulmão e as metástases *in vivo*, em modelos de camundongos marcados com células A549 (Preet et al., 2008).

Ao descrever os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos do delta-9-THC, este autor mostrou que este canabinóide não modulou a expressão ou a fosforilação do EGFR (Preet et al., 2008), diferente do descrito por Hart (2004). Por outro lado, aumentou a fosforilação da FAK no resíduo da tirosina 397 (Preet et al., 2008). Embora o aumento da fosforilação da FAK tenha sido associado com a migração celular (Preet et al., 2008), o aumento da fosforilação da tirosina FAK junto às fosfatases da proteína tirosina geneticamente inativa mostraram, por outro lado, que reduzem o potencial migratório da células (Lu et al., 2001; McLean et al., 2005).

Este estudo também mostrou uma redução das fosforilações das ERK1/2, JNK1/2 e AKT, induzidas pelo EGF, em células tratadas com o delta-9-THC (Preet et al., 2008). A ativação das quinases MAPKs (ERK1/2 e JNK1/2), mediada pelo EGFR, foi previamente relatada como reguladora da migração e da invasão celulares mediadas pelo EGF (Ulrich et al., 1990; Hauck et al., 2001; Yarden, 2001). Uma correlação entre a redução da ativação da ERK/JNK e a inibição da migração celular, estimulado por fator de crescimento, também foi mostrada em experimentos com inibidores e com inativação genética da ERK1/2 e JNK1/2 (Yujiri et al., 2000; Yarden, 2001).

Os achados *in vivo*, por sua vez, adicionalmente confirmaram as propriedades antitumorais e antimetastáticas do delta-9-THC nas células tumorais A549. A redução da angiogênese (verificada pelo imunoensaio CD31) e da proliferação (verificada pelo imunoensaio Ki67), bem como os achados da fosforilação da FAK e da diminuição das fosforilações das ERK1/2 e AKT nos tumores tratados com este canabinóide, devem ser sido responsáveis pela redução do crescimento tumoral (Preet et al., 2008). Desta forma, as ações do

delta-9-THC foram evidenciadas *in vitro* e *in vivo* em tumores pulmonares que superexpressam o receptor do fator de crescimento epitelial.

Ramer (2008) e Eichele (2009) também relataram propriedades antitumorais dos canabinóides nas células tumorais A549 *in vitro*. Eichele (2009) descreveu que a meAEA induziu apoptose destas células pela mediação da ativação da COX-2 e do PPAR γ . Ramer (2008), por sua vez, descreveu que a meAEA e o delta-9-THC apresentaram atividade inibitória da invasividade destas células pela mediação do aumento da TIMP-1. Descrições aprofundadas destes mecanismos podem ser vistos na seção 'canabinóides e tumores do cérvix uterino' desta revisão sistemática.

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NAS LEUCEMIAS E LINFOMAS

As leucemias são consideradas a 12^o doença neoplásica mais comum (Colin D et al., 2001). No entanto, a leucemia linfocítica aguda, particularmente, é considerada a maior causa de câncer em crianças de 0-14 anos de idade (Ries et al., 2008). Os linfomas são a neoplasia hematológica mais comum nos Estados Unidos, sendo que os linfomas não-Hodgkin correspondem a 90% destes cânceres (Jemal et al., 2008). Além disso, o linfoma não-Hodgkin é a quinta neoplasia maligna mais comum em ambos os sexos nos EUA, sendo a nona causa de morte por câncer entre homens e a sexta entre mulheres (Jemal et al., 2008).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Em relação à expressão de receptores canabinóides, temos que as células tumorais leucêmicas de camundongo murino (EL-4, LSA, P815) expressam CB1 e CB2 (McKallip et al., 2002). Já as células tumorais humanas leucêmicas e de linfomas (Jurkat, Molt-4, Sup-T1) expressam altas quantidades de CB2, mas não de CB1. As linhas de células tumorais CEM e HEL-92 expressam altos níveis desses receptores, enquanto que nas células HL60 os níveis foram baixos. As células primárias do linfoma (MCL, CLL, BL) expressam os receptores CB1 e CB2 (Flygare et al., 2005; Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2008; Ek et al., 2002; Islam et al., 2003), bem como as células DAUDI do linfoma (Macarrone et al., 2000). Já as linhas de células U937 do linfoma não expressam os receptores canabinóides (Macarrone et al., 2000; Gustafsson et al., 2006). Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas leucemias e nos linfomas, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

Os diferentes canabinóides pesquisados exerceram, nas diferentes linhas de células tumorais linfoblásticas, diminuição da viabilidade celular e indução de apoptose como mecanismo celular. Estes efeitos foram mediados, na maioria estudos, pelos receptores canabinóides. Em algumas linhas de células, a apoptose foi mediada não somente pelos receptores CB2, conhecidos por serem expressos em altas quantidades no sistema imune, mas também pelos receptores CB1 e VR1.

LINFOMAS

Macarrone (2000) foi o primeiro pesquisador a descrever a ação apoptótica dos canabinóides nas células dos linfomas. Utilizando o endocanabinóide AEA (0.25-1 μ M), mostrou que o mesmo induziu apoptose nas células do linfoma U937, de forma concentração-dependente, pela mediação dos receptores vanilóides (VR1) (o antagonista do receptor vanilóide, capsazepina, inibiu a apoptose induzida pela AEA). Também descreveu que estes receptores mediam a apoptose das células DAUDI dos linfomas, concordante com o estudo posterior realizado por Bari (2006a). Os receptores canabinóides, expressos nas células DAUDI, não só não mediam os efeitos apoptóticos das mesmas, como exerceram efeito sinérgico à AEA, aumentando a indução de apoptose (Macarrone et al., 2000; Bari et al., 2006a). Por outro lado, os endocanabinóides 2-AG, LEA, OEA e PEA não foram capazes de induzir morte celular programada nas células U937 e DAUDI (Macarrone et al., 2000). O fato destes endocanabinóides não ativarem os receptores vanilóides (Zygmunt et al., 1999) ou possuírem uma potência menor em relação à AEA (Smart et al., 2000) poderia justificar a ausência de apoptose verificada nestas células.

Os efeitos antiproliferativos dos canabinóides também foram pesquisados nas células B do linfoma não-Hodgkin (Rec-1, L144, L102). Flygare (2005)

mostrou que o endocanabinóide AEA (5 μM) e o canabinóide sintético WIN 55,212-2 (5 μM) induziram à diminuição da viabilidade celular, supressão do crescimento e morte celular por apoptose nas células do MCL ('mantle cell lymphoma'), sendo estes efeitos mais proeminentes em culturas com baixas concentrações de soro (Flygare et al., 2005). Estes efeitos foram mediados pelos receptores CB1. No entanto, foi verificado que o antagonista do receptor CB1 (SR141716) antagonizou os efeitos apoptóticos da AEA apenas em pequenas concentrações (0.5 μM). Já em concentrações de 5 μM , o SR141716 apresentou efeito sinérgico à AEA na indução de apoptose. E, mesmo isoladamente, induziu apoptose das células L144 e L102, obtidas de biópsias de dois pacientes com MCL, a partir de 1 μM de concentração (Flygare et al., 2005). Morte celular potencializada, pela pré-incubação da AEA com estes antagonistas, já foi relatada em outros estudos (Macarrone et al., 2000). O SR141716 tem mostrado agir, em adição aos seus efeitos antagonistas, como agonistas inversos para os receptores CB1 (Pertwee, 2005; Sarnataro et al., 2006).

Gustafsson (2006), por sua vez, mostrou que o análogo estável da AEA (meAEA, 10 μM) também induziu morte celular apoptótica nas células do MCL (Rec-1, Jeko, JVM-2, L718, L1547, L1676). Porém, diferente do que ocorreu com a AEA, este efeito foi mediado pelos receptores CB1 e também pelos receptores CB2. Estas ações foram imitadas pelo canabinóide sintético WIN 55,212-2 (10 μM) (Gustafsson et al., 2006).

Em outro estudo (Gustafsson et al., 2008), a meAEA teve seus efeitos antiproliferativos pesquisados não apenas nas células MCL, mas também em outras linhas de células do linfoma não-Hodgkin de células B (CLL, BL). Em concentrações de 10 μM , foi confirmada a morte celular induzida por este canabinóide nas células do MCL, sendo este efeito observado também nas células CLL. No entanto, as linhas de células BL (que expressam baixos níveis de CB2) e as linhas de células do plasma (usadas com controle) (SL-MM-2, que expressam baixos níveis de CB1), não sofreram morte celular pela ação da meAEA (Gustafsson et al., 2008). Adicionalmente, em seu estudo realizado *in vivo*, Gustafsson (2008) mostrou que meAEA induziu a uma diminuição significativa do

crescimento dos tumores em ratos marcados com células JEKO-1 (MCL) em relação ao controle (Gustafsson et al., 2008). Estes tumores apresentaram 25% de redução no índice mitótico, mas não houve diferença significativa na apoptose (dados não mostrados), sugerindo um possível efeito mediado pela regulação do ciclo celular (Gustafsson et al., 2008).

LEUCEMIAS

Rowley (1990) foi o primeiro pesquisador a descrever os efeitos antiproliferativos das células leucêmicas pela ação dos canabinóides. Utilizando como amostra as células tumorais ML2, K562 e HL60, mostrou que o fitocanabinóide delta-9-THC exerceu efeitos antiproliferativos nas mesmas em estudo realizado por 6 dias.

As células leucêmicas humanas HL60, bem como as células CEM e HEL-92, também foram utilizadas como amostra para a verificação das ações deste canabinóide em outro estudo (Powles et al., 2005). Em experimento realizado por 48 hs, o delta-9-THC (0-100 μ M) induziu a uma diminuição da viabilidade celular das mesmas (de forma concentração-dependente), bem como induziu apoptose em diferentes graus dependendo do tipo celular (Powles et al., 2005). Mecanismo de sequestro do ciclo celular (fase G1) também foi verificado em associação aos eventos mencionados, sendo que estes efeitos foram detectados nas primeiras horas de exposição destas células ao delta-9-THC (Powles et al., 2005). Estas três linhas de células tumorais apresentaram níveis variados de receptores canabinóides. Enquanto as células CEM e HEL-92 expressaram altos níveis desses receptores, os mesmos foram expressos em baixos níveis nas células HL60 (Powles et al., 2005). No entanto, foi verificado que o delta-9-THC exerceu seus efeitos antiproliferativos sem a mediação dos receptores canabinóides nestas células, pois os antagonistas CB1 e CB2 (isoladamente ou concomitantemente) não inibiram o efeito citotóxico do mesmo (Powles et al., 2005). De forma interessante, foi observado que as células HL60 foi a linha de células mais

sensível às ações antiproliferativas do delta-9-THC (Powles et al., 2005). O canabinóide PEA (1-100 μM), por outro lado, não apresentou efeito citotóxico significativo nestas linhas de células, bem como não antagonizou nem interferiu nos efeitos citotóxicos do delta-9-THC (Powles et al., 2005).

As células HL60 também foram pesquisadas em relação aos efeitos antitumorais do fitocanabinóide CBD e de seu homólogo sintético (CBD-DMH), tendo sido verificada a ocorrência de morte celular apoptótica nestas células pela ação de ambos os canabinóides (Gallily et al., 2003). Este autor também pesquisou a ação da irradiação gama (800 cGy) nestas células, tendo observado o mesmo efeito celular descrito acima. Adicionalmente, mostrou que o tratamento combinado dessa irradiação com o CBD (8 $\mu\text{g/ml}$) ou o CBD-DMH (15 $\mu\text{g/ml}$) induziu efeito sinérgico na morte apoptótica das células HL60 (Gallily et al., 2003). Por outro lado, as células humanas normais (monócitos), usadas como controle, não sofreram apoptose quando expostas a esses tratamentos (Gallily et al., 2003), mostrando seletividade da ação antitumoral.

McKallip (2002), por sua vez, pesquisou as linhas de células leucêmicas que expressam essencialmente os receptores canabinóides CB2 (Jurkat, Molt-4, Sup-T1). Nestas células, mostrou que o fitocanabinóide delta-9-THC (2.5-10 μM), o endocanabinóide AEA (5-40 μM) e o canabinóide sintético HU-210 (2.5-10 μM) exerceram mecanismo de morte celular apoptótica através da mediação dos receptores CB2, verificado em experimento com duração de 4 hs. O canabinóide sintético JWH-015 (1-20 μM) (McKallip et al., 2002) e o fitocanabinóide CBD (2.5, 5 μM) (McKallip et al., 2006) imitaram estes efeitos nas células Jurkat e Molt-4 em experimento com duração de 24 hs. Desta forma, este autor mostrou a importância da ativação dos receptores CB2 na ação antitumoral dos canabinóides nestas células. Salienta-se, no entanto, particularmente em relação às células Jurkat, que mecanismos apoptóticos induzidos por canabinóides foram verificados em outros estudos não somente pela mediação do receptor CB2 (Herrera et al., 2005; McKallip et al., 2006; Herrera et al., 2006), mas também pela mediação de ambos os receptores CB1 e CB2 (Jia et al., 2006). Por outro lado, o arvanil (agonista CB1/VR1, análogo estável da AEA, 25 μM) induziu apoptose nestas

células através de mecanismo receptor-independente (Sancho et al., 2003). O estudo de McKallip (2002) ressaltou, adicionalmente, que os efeitos apoptóticos ocorridos nas células Jurkat, Molt-4 e Sup-T1 foram mais pronunciados em meio de cultura sem soro, em comparação aos efeitos em meio de cultura com soro, reforçando a hipótese de que a interação direta dos canabinóides com as proteínas do soro, como a albumina, atenua os efeitos antiproliferativos dos mesmos (McKallip et al., 2002).

McKallip também pesquisou os efeitos do delta-9-THC nas células primárias da leucemia linfoblástica aguda, obtidas de biópsias de dois pacientes, e mostrou que o mesmo, em concentrações de 1, 5 e 10 μM , diminuiu a viabilidade celular bem como induziu apoptose nas mesmas (McKallip et al., 2002).

As células leucêmicas do camundongo murino (EL-4, LSA e P815) também foram utilizadas como amostras para a avaliação dos efeitos antitumorais dos canabinóides (McKallip et al., 2002; 2006). Em meio de cultura sem soro, os canabinóides delta-9-THC (3 μM), HU-210 (3 μM) e AEA (5, 10 μM) induziram apoptose das mesmas pela mediação do receptor CB2, em experimento com duração de 4 hs (McKallip et al., 2002). Estes efeitos foram imitados pelo fitocanabinóide CBD (2.5-10 μM) em pesquisa com duração de 24 hs (McKallip et al., 2006). No entanto, em experimento com o canabinóide WIN 55,212-2, foi mostrado que o mesmo não apresentou efeito significativo na indução de apoptose nestas células (McKallip et al., 2002). A razão pela qual o WIN 55,212-2 não induziu morte celular tumoral não é clara, porém especula-se que seja devido à diferenças na estrutura química de sua molécula e, conseqüentemente, na sua habilidade de ligação aos receptores canabinóides, quando comparados aos canabinóides clássicos como o delta-9-THC e o HU-210 (McKallip et al., 2002).

As células leucêmicas EL-4 do camundongo murino também foram pesquisadas *in vivo* em quatro experimentos (McKallip et al., 2002; McKallip et al., 2006). Este autor descreveu que o CBD (12.5, 25 mg/kg) provocou uma diminuição da viabilidade celular (de forma concentração-dependente), bem como um aumento significativo da porcentagem de células EL-4 apoptóticas, provenientes de fluido da cavidade peritoneal de ratos com tumores marcados

com estas células (McKallip et al., 2006). Estes efeitos também foram verificados, nestas mesmas condições, pelo tratamento destas células com o delta-9-THC (3 e 5 mg/kg) (McKallip et al., 2002). McKallip (2002) também descreveu que o delta-9-THC (5 mg/kg; 14 dias) induziu a uma diminuição do peso dos tumores, em relação ao controle, bem como a um aumento significativo da sobrevivência dos ratos com tumores marcados com células EL-4, mostrando que 25% dos ratos sobreviveram ao tumor e foram curados. De forma interessante, este autor também mostrou que estes ratos curados tornaram-se resistentes à nova inoculação de células do mesmo tipo de tumor (EL-4) (dados não mostrados) (McKallip et al., 2002). Estes dados, *in vivo*, demonstram o possível uso desses canabinóides como um novo tratamento para as leucemias.

Os dados destes estudos revelam, conjuntamente, que os tumores linfóides parecem ser altamente sensíveis aos canabinóides. Isso porque, em contraste com outros estudos com células não linfóides (Sánchez et al., 1998a; Ruiz et al., 1999; Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001a), em que os canabinóides induziram apoptose após 2 dias ou mais, os estudos com células leucêmicas mostraram importante indução de apoptose já nas primeiras horas de exposição aos mesmos (McKallip et al., 2002; Herrera et al., 2005; Powles et al., 2005; Lombard et al., 2005; Jia et al., 2006; McKallip et al., 2006; Herrera et al., 2006).

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

LINFOMAS

A apoptose induzida pela AEA nas células U937 do linfoma humano envolveu o aumento de cálcio intracelular, o rompimento mitocondrial, a liberação de citocromo c e ativação da cascata de caspases (Macarrone et al., 2000). Desta forma, foi mostrada a ocorrência de morte celular 'mitocondrial' pela ação da AEA. Diferente de outros tipos de morte celular programada (Ghafourifar et al., 1999), o

aumento de cálcio induzido pela AEA não agiu através da ativação da síntese de óxido nítrico, pois o L-NAME (inibidor da síntese do óxido nítrico) foi inefetivo em proteger estas células tumorais contra a ação apoptótica da AEA (Macarrone et al., 2000). Salieta-se que esta ação da AEA não foi observada como sendo em decorrência de seu precursor (ácido araquidônico) (Macarrone et al., 2000), como relatado em outro estudo com as mesmas células (Vanags et al., 1997). Isso porque o endocanabinóide 2-AG, através da atividade de hidrólise do ácido graxo (FAAH), possui maior capacidade de liberação de ácido araquidônico em comparação com a AEA (Goparaju et al., 1998), sendo que neste estudo o 2-AG não apresentou efeitos apoptóticos (Macarrone et al., 2000).

Pesquisas com as células U937 e DAUDI do linfoma humano também identificaram outros mecanismos mediadores da apoptose induzida pela AEA, quais sejam os mecanismos da 5-LOX e da COX (Macarrone et al., 2000). A importância mediadora da membrana do transporte lipídico também foi verificada para as ações da AEA nestas células (Bari et al., 2006a). Por outro lado, mecanismos potencializadores dos efeitos desse endocanabinóide foram observados pela ação dos seus inibidores de degradação (ATFMK) e de captação intracelular (AM404) (Macarrone et al., 2000).

Em relação aos mecanismos moleculares subjacentes à apoptose induzida pela meAEA e pelo WIN 55,212-2 nas células cancerígenas do MCL (linfoma não Hodgkin), Gustafsson (2006) mostrou uma sequência de eventos mediadores desta morte celular que ocorreram após a ativação dos receptores CB1 e CB2. Entre estes eventos está a acumulação de ceramida *de novo*. Sobre a ceramida, alguns estudos descreveram que a formação da mesma induz apoptose através de mecanismos tanto caspase-dependente quanto caspase-independente (Zhao et al., 2004) e, no caso do primeiro, que a ceramida pode tanto preceder a ativação das caspases ou ocorrer entre as caspases iniciadoras e efetoras (Tepper et al., 1999; Kroesen et al., 2001). Também já foi descrito que a p38 pode ser ativada tanto antes ou depois das caspases (Zaruabin and Han, 2005).

No estudo de Gustafsson, foi descrito que a inibição farmacológica da síntese de ceramida *de novo* inibiu a fosforilação da p38 e as mudanças no

potencial da membrana mitocondrial (Gustafsson et al., 2006), mostrando que a acumulação de ceramida antecedeu estes eventos. Adicionalmente, foi verificado que o inibidor da pan-caspase (z-VAD-FMK) não afetou o colapso da membrana mitocondrial, causado pela meAEA e pelo WIN 55,212-2 nas células tumorais transformadas Rec-1 (Gustafsson et al., 2006) mostrando, desta forma, que a ativação das caspases foi um evento tardio nestas células. Por fim, foi descrito que a ativação da caspase-3, induzida por ambos os canabinóides, foi completamente revertida pelos antagonistas dos receptores canabinóides CB1 (SR141716) e CB2 (SR144528) (Gustafsson et al., 2006). Assim, os dados deste estudo indicam que a meAEA e o WIN 55,212-2, a despeito de suas diferenças na seletividade CB1/CB2, induziram apoptose pela mediação da caspase-3 através da ligação com os receptores canabinóides nas células MCL. Estes experimentos possibilitaram a verificação da sequência dos eventos que induziram morte celular pela ativação dos receptores CB1 e CB2: acumulação de ceramida de novo, ativação da p38, perda do potencial da membrana mitocondrial e ativação das caspases (Gustafsson et al., 2006). Estes dados, conjuntamente, sugerem que alvos nos receptores CB1 e CB2 constituem uma nova abordagem no tratamento do MCL.

Este mesmo autor, em outro estudo (Gustafsson et al., 2009), investigou o mecanismo de acumulação de ceramida na mediação da morte das células Rec-1 (MCL) pela indução dos canabinóides meAEA e WIN 55,212-2. Descreveu que estes canabinóides induziram aumento (2-3.5 vezes) de subespécies da mesma (C16, C18, C24 e C24:1) principalmente pela medição do receptor CB1. Foi observado que a supra-regulação das C16, C18 e C24 foi mediadas pelo CB1, sendo que o aumento das C16 e C18 também foi mediado parcialmente pelo CB2 (Gustafsson et al., 2009). Adicionalmente, foi mostrado que estes canabinóides induziram supra-regulação da CerS3 e da CerS6 nas células Rec-1 em 2-2.6 vezes, sendo estes efeitos parcialmente mediados pelo CB1 (ambas) e pelo CB2 (CerS3) (Gustafsson et al., 2009). A CerS6 é a maior CerS e é expressa em altos níveis em vários tecidos (Mizutani et al., 2005), sendo associada com a síntese de espécies de ceramida C14 e C16 (Gustafsson et al., 2009). Por fim, foi mostrado

que a coincubação com inibidores das enzimas do mecanismo da ceramida de novo levou à diminuição da acumulação de ceramida bem como à diminuição da morte celular em resposta ao tratamento com meAEA. Assim, esta supra-regulação da CerS regulou a síntese de ceramida de novo em resposta à ação destes canabinóides nas células Rec-1 (Gustafsson et al., 2009). Estes resultados estão em concordância com outros estudos que mostraram que os antagonistas tanto CB1 quanto CB2 atenuaram a morte celular induzida pela meAEA no MCL e em outros linfomas que expressavam ambos os receptores (Gustafsson et al., 2006; Gustafsson et al., 2008).

Gustafsson (2009) também mostrou que a supressão das enzimas (SK-1 e GCS) que metabolizam a ceramida (usando inibidores ou siRNA) potencializa a acumulação de ceramida, a diminuição da viabilidade celular e o aumento da morte celular pela meAEA (Gustafsson et al., 2009). Desta forma, este estudo mostrou, pela primeira vez, que o efeito citotóxico do canabinóide pode ser aumentado pela modulação do metabolismo da ceramida. Estes achados sugerem que a interferência na conversão de ceramida deve fornecer um instrumento para melhorar os efeitos-alvo promotores da morte celular pelos canabinóides no MCL e em outros linfomas malignos que superexpressam o receptor CB1 (Gustafsson et al., 2009).

LEUCEMIAS

Vários experimentos foram realizados para verificação dos efeitos moleculares subjacentes à morte celular tumoral induzida pelos canabinóides. Gallily (2003) pesquisou apenas os mecanismos de caspases em relação à ação do fitocannabinóide canabidiol (CBD) nas células HL60, e mostrou que o mesmo induziu a uma ativação da caspase 3 nestas células, com consequente morte apoptótica das mesmas. Em relação às células CEM, HEL-92 e HL60, Powles (2005) realizou experimentos com duração de 3 horas no intuito de investigar as mudanças precoces causadas pelo delta-9-THC, ao invés de mudanças não

específicas associadas à apoptose, que surgiram de forma significativa depois de 6 horas. Neste estudo, observou-se que este canabinóide induziu mudanças no perfil de expressão de alguns genes nestas células. Foram verificadas uma marcante supra-regulação do gene *DUSP*, codificado MKPK3, e uma significativa infra-regulação do gene MAPK além de infra-regulação de dois genes isoformas Histona 1 (Powles et al., 2005).

O papel das proteínas isoformas Histona 1 nos mecanismos de sobrevivência celular ainda não foi esclarecido, embora tenha sido mostrado que outra isoforma Histona H1, H1.2, tem um importante papel na modulação positiva nos mecanismos apoptóticos (Konishi et al., 2003). Em relação ao gene MKPK3, sabe-se que ele especificamente se liga e inativa a ERK2 (Farooq et al., 2001). A MAPK, por sua vez, regula positivamente a ERK2, MEK2 (Powles et al., 2005). A inativação da ERK2, através tanto da MEK2 ou MAPK3, tem sido mostrado como indutora de apoptose (Rossig et al., 2002; Furukawa et al., 2003; Li et al., 2003). Desta forma, os dados deste estudo sugerem o envolvimento do mecanismo da MAPK na mediação dos efeitos celulares do delta-9-THC, possivelmente através da inativação da ERK2 (Powles et al., 2005).

A importância do mecanismo da MAPK foi ampliada pelo estudo de Liu (2008), em que foi mostrado que a apoptose induzida pelo delta-9-THC nas células CEM, HL60 e MOLT4 ocorreu paralelamente a uma diminuição nos níveis de fosforilação da ERK. Nestas células, Liu (2008) pesquisou, adicionalmente, o efeito citotóxico do delta-9-THC (dependente da diminuição da fosfo-ERK) em associação com quimioterápicos (citarabina, doxorubicina e vincristina) comumente utilizados no tratamento das leucemias (Liu et al., 2008). Em seus experimentos, mostrou a existência de sinergia entre estes compostos. Observou ainda que concentrações subletais do delta-9-THC (1 μ M), que não foram capazes de alterar o número de células mas que diminuíram a expressão da fosfo-ERK, sensibilizaram estas células à ação citotóxica dos quimioterápicos, verificada pela diminuição de seus respectivos IC50 (Liu et al., 2008). Isso reafirma o papel da fosfo-ERK na sinergia entre o delta-9-THC e estes quimioterápicos e mostra que essas associações apresentam eficácia citotóxica com minimização dos efeitos

colaterais, tanto do delta-9-THC quanto dos quimioterápicos (Liu et al., 2008). O emprego de doses subletais de um agente para obtenção de efeito nos mecanismos de transmissão de sinais já foi observado em outros estudos (Liu et al., 2002; DeFeo-Jones et al., 2005).

Já em relação às células leucêmicas humanas Jurkat, houve descrição de vários autores sobre os mecanismos moleculares através dos quais o canabinóide delta-9-THC exerceu seus efeitos antiproliferativos e na morte celular tumoral, mediados pelos receptores CB2 ou por ambos os receptores CB1 e CB2.

Herrera (2005) descreveu que ativação do receptor CB2, pelo delta-9-THC (1.5 μ M) nas células Jurkat, levou à ativação da ERK, JNK e p38 MAPK. Experimentos mostraram, no entanto, que a ERK e a JNK não estão aparentemente envolvidas na apoptose induzida pelo delta-9-THC. Isso porque apenas a inibição farmacológica da p38 MAPK atenuou a ativação das caspases (3 e 8) e a apoptose induzida pelo delta-9-THC nestas células. Neste estudo, este canabinóide induziu uma sequência de eventos que levaram à morte celular: a ativação do receptor CB2 induziu à perda do potencial da membrana mitocondrial (com consequente liberação de citocromo c), ativação da p38 MAPK e ativação das caspases 3 e 8 (Herrera et al., 2005). Este autor mostrou que a p38 MAPK foi envolvida na regulação da ativação das caspases ao invés de agir como reguladora primária dos eventos mitocondriais que ativam a liberação de citocromo c, diferente do mecanismo apoptótico, induzido pela meAEA e WIN 55,212-2, descrito por Gustafsson (2006), nas células do MCL.

Este mesmo autor, em outro estudo (Herrera et al., 2006), mostrou que a ativação do receptor CB2, pelo delta-9-THC (1.5 μ M) nas células Jurkat, levou à estimulação da síntese de ceramida *de novo*. Sequencialmente, verificou que a inibição farmacológica da síntese de ceramida inibiu a diminuição do potencial da membrana mitocondrial induzida pelo delta-9-THC nestas células (Herrera et al., 2006), o que sugeriria que a acumulação de ceramida precederia a perda do potencial da membrana mitocondrial. No entanto, de forma intrigante, a diminuição do potencial da membrana mitocondrial foi um evento precoce à acumulação de ceramida (Herrera et al., 2006). Uma possível explicação para esta observação é

a de que a acumulação local precoce da ceramida, no retículo endoplasmático ou na mitocôndria, poderia ter sido suficiente para ativar as respostas pró-apoptóticas observadas através do mecanismo intrínscio da mitocôndria (Herrera et al., 2006). Por outro lado, os dados desse estudo sugerem adicionalmente que, em adição a essas ações diretas na mitocôndria, a ceramida também deve ser envolvida na execução da apoptose num estágio tardio (Herrera et al., 2006). De qualquer modo, este experimento mostrou a importância da síntese de ceramida na apoptose induzida pelo delta-9-THC nas células leucêmicas pela ativação dos receptores CB2.

Outra observação controversa se faz em relação à p38 MAPK. Diferente do primeiro estudo de Herrera (Herrera et al., 2005), em que a ativação da p38 MAPK parecia ter um papel importante na execução da apoptose induzida pelo delta-9-THC, experimento de inibição farmacológica, neste estudo (Herrera et al., 2006), mostrou que esta quinase, bem como a ERK e a JNK, não foi responsável pela ação pró-apoptótica dependente da ceramida induzida pelo delta-9-THC. Desta forma, este estudo mostrou que a p38 MAPK não é regulada pela ceramida neste modelo (Herrera et al., 2006).

Por outro lado, ambos os estudos de Herrera (2005; 2006) mostraram concordância na observação de que houve ativação das caspases 3 e 8 pelo delta-9-THC nas células Jurkat. Diferente da ativação da caspase 3, que é indicativa de mecanismo apoptótico intrínscio ('morte mitocondrial'), a caspase 8 é um evento típico do mecanismo apoptótico extrínscio ('morte receptor') (Shiozaki and Shi, 2004). Ambos os estudos mostraram que a ativação da caspase 8 ocorreu no nível pós-mitocondrial, pois a co-incubação com os inibidores seletivos da caspase 8 ou da pan-caspase não preveniu a perda do potencial da membrana mitocondrial ativada pelo delta-9-THC (Herrera et al., 2005; 2006).

Estes dados são concordantes com o estudo de Lombard (2005), que ao pesquisar as células Jurkat mutantes 'deficientes em caspase 8' mostrou que as mesmas, em exposição ao delta-9-THC (10 μ M), apresentou inibição parcial da apoptose induzida pelo mesmo. No entanto, o uso de células Jurkat mutantes 'dominante-negativo caspase-9' (a caspase-9 também é envolvida no mecanismo

apoptótico intrínscico), em exposição ao mesmo canabinóide, resultou em inibição quase completa da apoptose (Lombard et al., 2005). Isso sugere que o delta-9-THC agiu primária e diretamente através do mecanismo intrínscico, e que o mecanismo extrínscico pôde favorecer a facilitação da apoptose tardiamente, através da conexão envolvendo BID.

Ainda em relação às células Jurkat, Jia (2006) mostrou, pela primeira vez, que os efeitos do delta-9-THC não foram mediados apenas pelos receptores CB2, mas também pelos receptores CB1 e os acoplados à proteína G. De forma interessante, este autor observou que, embora as células Jurkat expressem maiores níveis de receptores CB2 que de CB1, a exposição das mesmas ao delta-9-THC aumentou significativamente os níveis de ambos os receptores (Jia et al., 2006).

Em seu estudo, Jia (2006) ampliou as observações de estudos anteriores pela verificação de que o delta-9-THC (10 μ M) induziu apoptose destas células pela translocação da proteína Bad para a mitocôndria. Este evento ocorreu pela infra-regulação do mecanismo da Raf-1/MEK/ERK/RSK (Jia et al., 2006). Este autor mostrou que a pronunciada infra-regulação da fosforilação da Raf-1 foi associada com uma marcante redução nas fosforilações da MEK, o maior substrato Raf-1 (Hipskind et al., 1994), da ERK, o primeiro alvo da MEK (Troppmair et al., 1994), e da RSK, o primeiro substrato da ERK (Smith et al., 1999). Adicionalmente, que este processo ocorreu precocemente à ativação da cascata de caspases (Jia et al., 2006).

Essas ações do delta-9-THC foram suportadas pela observação de que a expressão experimental forçada da MEK/ERK, constitutivamente ativa, resultou em inibição da localização mitocondrial da Bad, além de inibição da ativação das caspases e da apoptose (Jia et al., 2006). Além disso, em experimento com depleção da Bad nas células Jurkat, foi observado que a apoptose mediada pelo delta-9-THC foi significativamente inibida (Jia et al., 2006). Destaca-se que a importância da quinase ERK na apoptose mediada pelo delta-9-THC nas células Jurkat, mostrada neste estudo, contrapõe os achados prévios de Herrera (2005). Salienta-se que estes estudos utilizaram diferentes concentrações de delta-9-THC.

O mecanismo MAPK consiste em três módulos paralelos de quinases serina/treonina (ERK, JNK e p38 MAPK), envolvidos na regulação de diversos eventos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (Chang et al., 2001). Na maioria, mas não em todos os sistemas estudados, a inativação da MEK e ERK é associada com a promoção da morte celular (Datta et al., 1997; Xia et al., 1995). O mecanismo através do qual isso ocorre não é sabido com certeza, mas deve variar dependendo do tipo de célula (Johnson and Lapadat, 2002; Howe et al., 2002; Jia et al., 2006). Neste estudo, a morte das células Jurkat, mediada pelo delta-9-THC, foi associada com a infra-regulação do mecanismo da Raf-1/MEK/ERK, sem alterar significativamente os módulos p38 MAPK e JNK (Jia et al., 2006). Adicionalmente, Jia (2006) mostrou que o delta-9-THC também diminuiu a fosforilação da Akt.. No entanto, não houve associação significativa da translocação da Bad com os mecanismos da PI3K/Akt e da proteína quinase A (PKA) (Jia et al., 2006).

A regulação da função da membrana mitocondrial e a liberação de fatores regulatórios apoptóticos pela mitocôndria são componentes-chave do repertório apoptótico, fortemente controlados pela família de proteínas Bcl-2 (Korsmeyer, 1999; Kroemer and Reed, 2000). Na ausência de mecanismos de sobrevivência, a proteína Bad é desfosforilada, transloca para a mitocôndria, e interage com a Bcl-2 e a Bcl-XL, desse modo inibindo a função de sobrevivência das mesmas (Zha et al., 1996; Scheid and Duronio, 1998). Conforme descrito acima, o delta-9-THC inativou o mecanismo citoprotetivo das quinases serina/treonina (Raf-1/MEK/ERK/RSK), que tem um papel funcional importante na mediação da translocação da Bad (Jia et al., 2006). Isso pode ter causado a localização da Bad na mitocôndria, como visto após o tratamento com o delta-9-THC.

Pesquisando outro fitocanabinóide, Mckallip (2006) descreveu os mecanismos moleculares subjacentes à ação apoptótica do canabidiol (CBD) nas células Jurkat. Em seu estudo, mostrou que o CBD induziu à ativação da cascata de caspases, à perda do potencial da membrana mitocondrial e à diminuição dos níveis da fosforilação da p38 MAPK. Estas ações do CBD foram mediadas pelos receptores CB2. (McKallip et al., 2006). Isso sugere que os níveis de expressão

destes receptores devem ter um importante papel na sensibilidade das células tumorais na morte celular pelo CBD. As ações deste canabinóide também foram mediadas pelo mecanismo de estresse oxidativo. Este estudo verificou que o CBD também induziu a um significativo aumento das NAP(P)H oxidases Nox4 e p22*phox* bem como da produção de ROS (McKallip et al., 2006). O mecanismo de estresse oxidativo tem sido associado com a ativação do mecanismo apoptótico intrínscio (Zorov et al., 2000; Singh et al., 2005). Salieta-se, no entanto, que experimentos comprovaram que não houve mediação dos receptores CB1, VR1 e acoplados à proteína G (McKallip et al., 2006) na apoptose induzida pelo CBD. Adicionalmente, foi mostrado que estas ações não foram mediadas pela ceramida (McKallip et al., 2006).

A indução da perda do potencial da membrana mitocondrial, com consequente liberação de citocromo c (McKallip et al., 2006), sugere um envolvimento direto da mitocôndria na indução de apoptose pelo CBD. No entanto, este estudo mostrou uma possível conexão entre os mecanismos apoptóticos intrínscios e extrínscios. Isso porque a ativação da cascata de caspases induziu a clivagem das caspases 8 (e redução das pró-caspases 2, 9, e 10), 3, PARP (poli-ADPribose polimerase), assim como da Bid (McKallip et al., 2006).

As NAD(P)H oxidases são um grupo de enzimas envolvidas na regulação da produção de ROS (Zorov et al., 2000; Singh et al., 2005). Ressalta-se que as NAP(P)H oxidases Nox4 e p22*phox* são conhecidas por exercerem papéis em diversos processos, incluindo a sobrevivência celular e a apoptose (Pedruzzi et al., 2004; Vaquero et al., 2004; Martyn et al., 2006). Neste estudo, no entanto, o CBD induziu a um aumento significativo destas NAP(P)H oxidases bem como da produção de ROS, sugerindo a possibilidade de que a regulação dessas enzimas e a subsequente geração de ROS possam ter um papel importante na indução de apoptose das células leucêmicas (McKallip et al., 2006). Isso foi comprovado em experimentos com inibidores das NAD(P)H oxidases, em que os mesmos preveniram os efeitos do CBD na morte celular tumoral. Adicionalmente, estes efeitos foram correlacionados com a habilidade desses inibidores em reduzir os níveis de ROS induzidos pelo CBD. Em relação ao aumento da produção de ROS,

experimentos demonstraram que o uso de antagonistas do mesmo (como o α -tocoferol) inibiram significativamente a apoptose induzidas pelo CBD nas células Jurkat (McKallip et al., 2006). Esta inibição, por sua vez, foi correlacionada proporcionalmente com o aumento dos níveis de ROS induzidos pelo CBD (McKallip et al., 2006). Estes dados suportam o papel do ROS (mecanismo de estresse oxidativo) na apoptose induzida por este canabinóide e sugerem, adicionalmente, que a regulação da geração do ROS, pelo CBD, pode ser uma estratégia efetiva para tratar as malignidades do sistema imune. Ações apoptóticas do CBD, relacionadas à geração de ROS, já foram relatadas em células do glioma (Massi et al., 2004).

Por fim, este estudo descreveu que o CBD induziu a uma diminuição dos níveis da fosforilação da p38 MAPK, enquanto a fosforilação da ERK e da JNK não foram afetadas (McKallip et al., 2006). Suporte para o papel da p38 na apoptose induzida pelo CBD vem de relatos que demonstraram que a exposição à este canabinóide leva a uma redução dos níveis da p38 fosforilada nas células neuronais PC-12 (Espósito et al., 2006). No entanto, no estudo de Herrera (2005) houve ativação da p38 nos mecanismos apoptóticos induzidos pelo delta-9-THC nas células Jurkat; e em outro estudo do mesmo autor (Herrera et al., 2006), esta quinase não teve efeito na apoptose induzida pelo delta-9-THC nestas células em modelo dependente de ceramida. Portanto, há discrepâncias em relação à importância dessa quinase na apoptose das células leucêmicas mediada pelos canabinóides e estudos aprofundados são necessários.

Sancho (2003), por sua vez, descreveu os mecanismos moleculares subjacentes à ação apoptótica do arvanil (análogo estável da AEA; agonista CB1/VR1) nas células Jurkat. Em seu estudo, mostrou que o mesmo exerceu seus efeitos nestas células pela mediação das caspases 3 e 8, bem como da FAAD (Sancho et al., 2003). Adicionalmente, mostrou que o mecanismo de estresse oxidativo mediou, pelo menos em parte, os efeitos apoptóticos do arvanil nestas células (Sancho et al., 2003).

Os mecanismos referentes à cascata de caspases foram verificados pela observação de que este canabinóide ativou tanto a caspase 3 quanto a caspase 8,

e experimentos com os seus respectivos inibidores mostraram uma inibição significativa da apoptose induzida pelo mesmo (Sancho et al., 2003). A ativação da caspase 7 (caspase executora ativada pela caspase 8) bem como a clivagem da PARP também foi observada pela ação de composto, e ocorreu de forma tempo-dependente em estudo com duração de 6 horas. Desta forma, este estudo mostrou a importância dos mecanismos intrínscio ('mitocondrial') e extrínscio ('morte receptor') na indução de apoptose pelo arvanil nas células Jurkat.

Adicionalmente, foi mostrado que o arvanil teve sua atividade apoptótica marcadamente inibida nas células Jurkat "FADD dominante negativa" em relação às células Jurkat normais, o mesmo ocorrendo em relação à ativação das caspases 3 e 8 (Sancho et al., 2003). No entanto, resíduos pequenos, embora significantes, de apoptose e de ativação das caspases, foram verificados nas células Jurkat "FADD dominante negativa" com concentrações mais elevadas de arvanil testadas (Sancho et al., 2003). Esta observação sugeriu um mecanismo adicional, independente do FADD, ativado pelo arvanil nas células Jurkat.

Foi mostrado previamente que os compostos vanilóides se comportam como análogos quinona e induzem ROS intracelular e apoptose nas células Jurkat (Macho et al., 1998; 1999; 2000; 2003). Sancho (2003) mostrou, em experimentos adicionais, que ambas as células Jurkat "normais" e "FADD dominante negativa" geraram ROS, de forma concentração-dependente, pela indução do arvanil (1-25 μ M) (Sancho et al., 2003). No entanto, como descrito acima, as duas células apresentaram diferenças em relação à apoptose induzida pelo arvanil. Estas diferenças sugerem que a geração de ROS poderia estar implicada na apoptose das células Jurkat, induzida por este composto, mas não em todo o processo, um fato que poderia explicar a apoptose residual observada nas células Jurkat "FAAD dominante negativa" tratadas com arvanil.

Salienta-se, adicionalmente, que este estudo verificou que as ações deste análogo estável da AEA foram independentes da FAAH, pois a sua inibição farmacológica com ATMFK não induziu apoptose nas células Jurkat (dados não mostrados) (Sancho et al., 2003).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NO CÂNCER DE PELE

O câncer de pele (não melanoma) é uma das malignidades mais comuns em seres humanos. O carcinoma de célula basal e o carcinoma de célula escamosa representam a grande maioria destes tumores (Limmer, 2001), sendo que o crescimento dos mesmos está fortemente associado com o surgimento de uma neovascularização (Bolontrade et al., 1998). Já o câncer de pele (melanoma) é a principal causa de mortes em malignidades cutâneas (Blázquez et al., 2006).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Em relação à expressão de receptores canabinóides, os receptores CB1 e CB2 foram expressos em todas as linhas de células tumorais epidermais (não melanoma), bem como nos respectivos tumores de pele derivados de humanos e animais. A expressão destes dois receptores também ocorreu nas células e tumores do melanoma. Já os melanócitos (células não tumorais) expressaram apenas o receptor CB1, enquanto que as células epidermais saudáveis expressaram ambos os receptores. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais de pele, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

Os três estudos desta revisão descreveram que os canabinóides exerceram seus efeitos antiproliferativos nas células tumorais sem exercerem ações citotóxicas nas células normais, agindo portanto, de forma seletiva.

Casanova (2003) descreveu que o canabinóide WIN 55,212-2 (25 nM) diminuiu a viabilidade das células tumorais epidermais PDV.C57 e HaCa4, em experimento realizado por 4 dias. Os canabinóides JWH-133 (25 nM) e HU-210 (25 nM), por sua vez, imitaram o efeito exercido pelo WIN 55,212-2 nestas células (dados não mostrados) (Casanova et al., 2003). Este autor relatou,

adicionalmente, que o WIN 55,212-2 e o JWH-133 bloquearam significativamente o crescimento dos tumores dos ratos marcados com células as PVD.C57 (Casanova et al., 2003). Experimentos verificaram que o WIN 55,212-2 (agonista misto CB1/CB2) induziu morte celular *in vitro* e *in vivo* através de mecanismo apoptótico, e que este efeito foi mediado por ambos os receptores canabinóides CB1 e CB2 (Casanova et al., 2003).

Utilizando como amostra as células do carcinoma escamoso de pele (JWF2), Van Dross (2009), por sua vez, descreveu que a AEA (15-30 μM) induziu a uma diminuição significativa da viabilidade destas células (de forma concentração-dependente) bem como induziu apoptose das mesmas, em estudo com duração de 24 hs. Salienta-se no entanto que, em baixas concentrações testadas (0.15-3 μM), a AEA provocou, por outro lado, leve aumento, embora não significativo, na viabilidade das células JWF2 (Van Dross, 2009). A PEA (0.15-30 μM), por sua vez, induziu morte (não apoptótica) destas células apenas com a concentração máxima testada (Van Dross, 2009).

Blázquez (2006), em estudo sobre o efeito dos canabinóides no tratamento do melanoma, descreveu que o delta-9-THC (1-3 μM) e o WIN 55,212-2 (100 nM) diminuíram a viabilidade das células tumorais de ratos (B16) e humanas (A375 e MelJuso) em estudo realizado por 72 hs. Adicionalmente, relatou que este efeito ocorreu por mecanismo celular apoptótico, pela verificação *in vivo* do aumento do número de células tumorais apoptóticas. Por outro lado, experimento *in vitro* mostrou a ocorrência de mecanismo de sequestro do ciclo celular na transição G1-S (Blázquez et al., 2006). Este estudo também descreveu que o canabinóide WIN 55,212-2 induziu a uma diminuição marcante do crescimento tumoral de ratos imunossuficientes e imunodeficientes marcados com células B16, sendo este efeito imitado pelo JWH-133 em ratos imunossuficientes (Blázquez et al., 2006). Este efeito do WIN 55,212-2 em ratos imunodeprimidos mostra que este canabinóide não exerceu efeito na imunidade antitumoral dos mesmos.

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Van Dross (2009), estudando as linhas de células do carcinoma escamoso de pele (JWF2), descreveu que as mesmas superexpressam a COX-2. Adicionalmente, relatou que AEA (30 μ M) induziu um aumento nos níveis de prostaglandinas série-D (PG-D2 e PGD2-EA) em mais de 200 vezes nestas células (Van Dross, 2009). Quanto aos níveis de prostaglandinas série-E, houve aumento aproximado de 10 vezes com 30 μ M de concentração de AEA e um máximo de 7 vezes no aumento dos níveis das prostaglandinas série-F com 15 μ M de concentração deste canabinóide (Van Dross, 2009).

Para verificar a associação entre a COX-2, PGs e apoptose das células JWF2, este pesquisador realizou vários experimentos. Em pesquisa com co-incubação de AEA e inibidor da COX-2 (NS-398, 5 μ M), foi verificado bloqueio total dos níveis de PG série-E e série-F, bem como redução dos níveis de PG série-D a níveis basais. Foi mostrado, adicionalmente, que os níveis de PG série-D foram abolidos com o uso de 25 μ M do NS-398 (Van Dross, 2009). Outro experimento, em que foi utilizado PGs via exógena, mostrou que a PGD2 e a PGD2-EA induziram a uma significativa diminuição da viabilidade destas células, sendo estes efeitos imitados pela ação dos derivados da PGD2 (PGJ2 (15d-PGJ2)), PGJ2 e de outras PG série-J (Van Dross, 2009). Este efeito, no entanto, não foi observado com a exposição das células JWF2 às PGs séries E e F (Van Dross, 2009). Desta forma, Van Dross (2009) mostrou que a AEA induziu apoptose (clivagem da caspase 3 e da PARP) nas células JWF2 através do seu metabólito catalisado pela COX-2 (Van Dross, 2009), em concordância com outros estudos que mostraram a atividade antiproliferativa das PGs séries D e J (Chen et al., 2005; Kondo et al., 2002; Ward et al., 2002). Experimento adicional foi realizado com as células HaCat, que são resistentes à ação da AEA por expressarem baixos níveis de COX-2. Nesta pesquisa, foi feita transferência de COX-2 para estas células, com verificação de que as mesmas apresentaram morte celular pela ação da AEA (Van Dross, 2009). Esses dados sugerem que a COX-2 converte a AEA em prostaglandinas, que por sua vez provocam morte celular.

Blázquez (2006), por sua vez, pesquisou os mecanismos subjacentes aos efeitos antiproliferativos do canabinóide WIN 55,212-2. Em seu estudo, descreveu que o mesmo induziu a uma diminuição da proteína AKT (*in vitro*) nas células tumorais do melanoma (B16), bem como diminuiu a fosforilação da proteína pRB (retinoblastoma) (*in vitro* e *in vivo*). A AKT é constitutivamente ativada em mais de 60% dos melanomas, principalmente em estágios tardios da doença (Thompson et al., 2005; Chudnovsky et al., 2005a), sendo considerada um elemento-chave do maior mecanismo de sobrevivência celular. Este mecanismo é geralmente desregulado em vários tipos de tumores, incluindo os melanomas (Chudnovsky et al., 2005a; Chudnovsky et al., 2005b; Bellacosa et al., 2005). Portanto, os dados de estudo de Blázquez (2006) suportam que a inibição da AKT induziu o sequestro do ciclo celular na transição G1-S através da hipofosforilação da pRB (Blázquez et al., 2006). No entanto, outros membros clássicos do mecanismo da transição G1-S (ex: CDK2/3, CDK4, p21, p27KIP1) não foram afetados pelo tratamento com este canabinóide (Blázquez et al., 2006). Adicionalmente, não houve modulação, pelos canabinóides, da cascata MAPK (ERK, JNK e p38MAPK) (Blázquez et al., 2006).

Estudos adicionais são necessários para esclarecer os vários desfechos dos mecanismos de sobrevivência tanto nestas células quanto em outros tipos de células tumorais. É possível que alguns fatores experimentais possam afetar estes mecanismos de sobrevivência nestes modelos. Alguns fatores são: natureza do ligante endo(canabinóide), como estabilidade e hidrofobicidade; potência da absorção do sinal, como potência do agonista, dose e tempo de exposição; as propriedades biológicas das células alvo, como origem, estado de diferenciação e capacidade de replicação; os receptores canabinóides, como quantidade e acoplamento à proteína G; e a presença de vários fatores em cultura, como fatores de crescimento e outros tipos de células/clones (Blázquez et al., 2006).

MECANISMO ANTIANGIOGÊNICO E ANTIMETASTÁTICO

A diminuição da angiogênese tumoral é um dos fatores que pode estar envolvido na ação antitumoral dos canabinóides. Alguns estudos mostraram que o crescimento do tumor de pele de ratos e sua progressão dependem de eventos críticos que levam a mudanças no epitélio e no estroma, incluindo o estabelecimento de uma angiogênese ativa (Bolontrade et al., 1998).

Estudos em tumores de pele mostraram que o perfil da morfologia dos vasos apresentou características de vasos estreitados nos carcinomas epidermais tratados com canabinóides (Casanova et al., 2003), em linha com achados de que vasos sanguíneos alargados constituem uma proeminente característica de progressão do tumor de pele (Bolontrade et al., 1998; Hawighorst et al., 2001). Diminuição da vascularização tumoral, caracterizada por diminuição da densidade vascular, também foi verificada em células tumorais do melanoma B16, associada com diminuição do tamanho tumoral, após tratamento com os canabinóides WIN 55,212-2 e JWH-133 (Blázquez et al., 2006).

Casanova (2003) também mostrou, em seu estudo, que os canabinóides WIN 55,212-2 e JWH-133 diminuíram, de forma significativa, os fatores pró-angiogênicos VEGF e Angiotensina-2 (Agn2) nos tumores epidermais. Adicionalmente, mostrou que outro membro da família VEGF, PIGF (fator de crescimento placentar), foi infra-regulado pelo tratamento com estes canabinóides nestes tumores (Casanova et al., 2003). A Agn2 e o PIGF devem agir em concordância com o VEGF, porque as suas expressões são altamente aumentadas desde os primeiros estágios do desenvolvimento tumoral (Casanova et al., 2002; Carmeliet et al., 2000; Yancopoulos et al., 2000).

Outro elemento que também foi infra-regulado pelo uso dos canabinóides WIN 55,212-2 e JWH-133 nas células tumorais epidermais foi o EGF-R (receptor do fator de crescimento epidermal), um receptor de citocina essencial para o crescimento tumoral em sua fase tardia (Casanova et al., 2003). Nas células epidermais, o EGF-R participa na regulação de funções-chave (Luetkeke et al., 1993; Luetkeke et al., 1994; Murillas et al., 1995; Jost et al., 2000). Em carcinomas

de pele de ratos, por exemplo, a ativação da Ha-ras, dependente do EGF-R, tem um papel central na expressão VEGF, na angiogênese e no crescimento tumoral (Casanova et al., 2002). Casanova (2003) relatou que os canabinóides WIN 55,212-2 e JWH-133 induziram a uma infra-regulação do EGF-R tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Este efeito mostrado em meio de cultura indica, portanto, que as mudanças observadas na atividade EGF-R *in vivo*, refletem um impacto direto dos canabinóides nas células tumorais, e não uma mera consequência da diminuição do tamanho do tumor.

Já em relação às células tumorais do melanoma (B16), Blázquez (2006) descreveu atividade dos canabinóides nas metástases. Neste estudo, mostrou que o canabinóide WIN 55,212-2 diminuiu o número de nódulos metastáticos de pulmão e de fígado oriundos de tumor primário de pele (melanoma), em dois diferentes modelos de ratos marcados com células B16 (Blázquez et al., 2006).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS TUMORES PANCREÁTICOS

O câncer pancreático é uma das mais malignas e agressivas formas de câncer (Li et al., 2004) e representa a quinta maior causa de morte por câncer em todo o mundo (Jemal et al., 2003). No momento em que é diagnosticado, 85% dos pacientes apresentam infiltrações metastáticas em nódulos linfáticos proximais, fígado e pulmões, e apenas 15-20% dos tumores são tipicamente ressecáveis (Li et al., 2004). De um modo geral, os pacientes afetados tem sobrevida média de um ano com o tratamento quimioterápico convencional (Carracedo et al., 2006b).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Todas as linhas de células tumorais humanas de pâncreas bem como os tecidos de biópsias humanas de tumores pancreáticos expressaram os receptores canabinóides CB1 e CB2 em níveis maiores que os expressos nos tecidos pancreáticos normais. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais pancreáticas, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

Fogli (2006) descreveu que a ACEA, AM251, JWH-015 e AM630 (todos com 10 μ M) inibiram o crescimento das células tumorais pancreáticas MiaPaCa2 em estudo realizado por 72 horas. Neste estudo, foi mostrado que o AM251 (antagonista CB1) foi o composto mais ativo nos efeitos antiproliferativos, em comparação às outras substâncias. Adicionalmente, descreveu que todos estes compostos tiveram seus efeitos mais pronunciados em meio de cultura com pouco ou nenhum soro. No entanto, foi relatado que o WIN 55,212-2 (10 μ M) e o SR141716 (10 μ M) não afetaram significativamente a viabilidade destas células em meio de cultura com soro (Fogli et al., 2006)

Neste estudo, o AM251 exerceu seus efeitos antiproliferativos através do mecanismo de morte celular apoptótica (fragmentação do DNA, ativação das caspases 3/7) independente da mediação dos receptores canabinóides, apesar da presença dos mesmos nestas células (Fogli et al., 2006). E quando associado com o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), uma das drogas mais usadas no tratamento do carcinoma pancreático (Willett et al., 2005), demonstrou sinergismo com o mesmo na inibição da proliferação celular e um índice de redução de doses favorável para ambas as drogas (Fogli et al., 2006).

É interessante destacar que o AM251 é um derivado diarilpirazole homólogo ao inibidor COX-2, celecoxibe, que por sua vez promove apoptose em linhas de células tumorais humanas de mama MDA-MB-231 através da ativação das caspases 3/7 (Basu et al., 2005). No entanto, as linhas de células MiaPaCa2 são COX-2 negativa (Yip-Schneider et al., 2000) e portanto a inibição da COX-2 não pode ser considerada para a toxicidade do AM251 (Fogli et al., 2006). Por outro lado, a função inibitória da COX-2 não é necessária para que ocorra a apoptose mediada pelo celecoxibe, sendo que estes efeitos antiproliferativos parecem ser atribuídos à progressão tardia das células através da fase G2-M (Ding et al., 2005). Estes dados sugerem que o AM251 exerceu seus efeitos nas células tumorais pancreáticas também através do mecanismo de sequestro do ciclo celular nesta fase do ciclo (Fogli et al., 2006).

Carracedo (2006b), por sua vez, pesquisou não só as células tumorais pancreáticas MiaPaCa2, mas também as células Panc1, Capan2 e BxPc3. E descreveu que o delta-9-THC (0-4 µM) induziu a uma diminuição da viabilidade celular, de forma concentração-dependente, bem como morte celular apoptótica pela mediação dos receptores canabinóides CB2 e pela acumulação de ceramida, (Carracedo et al., 2006b). É importante destacar que doses baixas do delta-9-THC, mas não do WIN 55,212-2, induziu levemente a proliferação das linhas de células Panc1 e Capan2, mas não das células MiaPaCa2 e BxPc3, um efeito que foi independente dos receptores canabinóides (Carracedo et al., 2006b).

Este estudo também mostrou que a administração peritumoral dos canabinóides delta-9-THC e JWH-133 reduziram, de forma marcante, o

crescimento de tumores já estabelecidos de ratos imunodeficientes marcados com injeção subcutânea de células MiaPaCa2 (Carracedo et al., 2006b). Já a administração intraperitoneal do WIN 55,212-2 reduziu marcadamente o crescimento dos tumores intra-pancreáticos (inoculação de células MiaPaCa2 diretamente no pâncreas) bem como diminuiu significativamente a extensão de células tumorais em órgãos adjacentes (baço) e distantes (diafragma, estômago, intestinos) (Carracedo et al., 2006b), indicando que este canabinóide afeta não só o crescimento como também a invasividade destas células tumorais. Este estudo mostrou, portanto, a eficácia do tratamento canabinóide, *in vivo*, sob diferentes cenários, quais sejam o uso de diferentes canabinóides administrados por diferentes vias e com células tumorais inoculadas em diferentes locais.

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Fogli (2006) descreveu que o AM251 induziu apoptose nas linhas de células tumorais pancreáticas MiaPaCa2. A observação de que o inibidor das caspases 3/7 reverteu parcialmente a toxicidade induzida pelo AM251, sugere que esta morte celular apoptótica deve ser mediada, pelo menos em parte, através de mecanismo dependente de caspase. Este estudo mostrou, adicionalmente, que o AM251 induziu a uma modulação de genes altamente regulados por importantes mecanismos do destino celular, como a quinase janus/transmissores e ativadores de sinais de transcrição (JAK-STAT) e a MAPK (Fogli et al., 2006).

Carracedo (2006b), por sua vez, demonstrou que o delta-9-THC (*in vitro*), assim como o AM251 (Fogli et al., 2006), induziu a ativação das caspases 3/7. Adicionalmente, relatou que o delta-9-THC induziu a um aumento dos níveis da p8 mRNA nas células MiaPaCa2, tendo sido verificado, paralelamente, aumento dos níveis das proteínas ATF-4 e TRB3 (Carracedo et al., 2006b), relacionadas ao estresse do retículo endoplasmático (Ohoka et al., 2005). Aumento da expressão da proteína pró-apoptótica TRB3 também foi verificado nos tumores de ratos tratados com o WIN 55,212-2 (Carracedo et al., 2006b). Todos estes eventos

foram mediados pelo CB2 e pela acumulação de ceramida, pois o SR144528 (mas não o SR141716) e o ISP-1 (inibidor da síntese de ceramida) inibiram estas ações do delta-9-THC (Carracedo et al., 2006b). Os resultados deste estudo, junto com outros dados obtidos em gliomas de ratos e células do astrocitoma humano (Carracedo et al., 2006a; Salazar et al., 2009), mostram que a supra-regulação da p8 e da ATF-4 media a apoptose induzida pelo canabinóide através da indução da proteína pró-apoptótica TRB3 (Ohoka et al., 2005; Mayumi-Matsuda et al., 1999; Salazar et al., 2009). De forma interessante, tem sido mostrado recentemente que a ATF-4 regula a expressão da TRB3 na indução de apoptose de células transformadas humanas (Ohoka et al., 2005).

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS TUMORES DE ORIGEM HEPÁTICA

Os colangiocarcinomas são cânceres devastadores de origem intra e extra-hepática e têm apresentado crescimento nas taxas de incidência e de mortalidade em todo o mundo (Alpini et al., 2001; Sirica, 2005). A única esperança para os pacientes afetados é a possibilidade de ressecção cirúrgica completa do tumor (Alpini et al., 2001; Sirica, 2005), sendo a quimioterapia convencional e a radioterapia inefetivas em prolongar a sobrevivência dos pacientes (Alpini et al., 2001). Já os hepatomas são o mais frequente tipo de câncer originado no fígado, sendo considerados o quinto tipo de câncer mais comum e o terceiro maior causador de mortes por câncer no mundo (Ji and Wang, 2009).

Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Em relação à expressão de receptores, temos que as linhas de células tumorais do colangiocarcinoma, bem como as células controle, expressaram os receptores CB1, CB2 e VR1, não havendo diferença significativa nos níveis das células tumorais e não tumorais. Já as linhas de células HepG2 do hepatoma expressaram essencialmente os receptores canabinóides CB2, apresentando baixos níveis de CB1. Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais origem hepática, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

DeMorrow (2007) descreveu o sistema endocanabinóide como um alvo terapêutico potencial para regular o crescimento celular dos colangiocarcinomas. Pesquisando as células Mz-ChA-1, HuH-28, HuCC-T1 e SG231, mostrou que a AEA (1 nM – 10 µM) e o 2-AG (1 nM – 10 µM) apresentaram efeitos opostos na proliferação das mesmas. Em seu estudo, foi relatado que a AEA diminuiu significativamente o crescimento das células tumorais enquanto o 2-AG

apresentou efeito estimulatório no crescimento das mesmas (DeMorrow et al., 2007). Estes efeitos ocorreram através de mecanismo receptor-independentes, apesar da presença dos receptores CB1, CB2 e VR1 nestas células (De Morrow et al., 2007). Em relação aos efeitos antiproliferativos da AEA, foi mostrada a ocorrência de morte celular apoptótica e de sequestro do ciclo celular (DeMorrow et al., 2007). Embora os efeitos promotores do crescimento dos canabinóides, em tumores de várias origens, tenham sido demonstrados previamente (Gardner et al., 2003), este é o primeiro relato demonstrando efeitos opostos destes dois endocanabinóides num mesmo tipo de tumor (DeMorrow et al., 2007).

DeMorrow, em outro estudo (DeMorrow et al., 2008), pesquisou os efeitos da AEA *in vivo* em ratos marcados com células tumorais do colangiocarcinoma, Mz-ChA-1. Neste estudo, foi verificado que o tratamento crônico (72 dias) com a AEA diminuiu significativamente o crescimento dos tumores a partir do 41º dia, sem que os ratos apresentassem sinais de toxicidade. Adicionalmente, observou-se que a AEA diminuiu significativamente a área de necrose tumoral enquanto aumentou a área de fibrose (DeMorrow et al., 2008).

O alvo terapêutico no colangiocarcinoma, portanto, tem como objetivo tanto a modulação dos níveis relativos dos abundantes endocanabinóides (AEA e 2-AG) *in vivo* ou a imitação dos efeitos antiproliferativos da AEA. É extremamente importante salientar que o desenvolvimento de drogas quimioterapêuticas que resultam num aumento geral dos níveis dos endocanabinóides deve ser visto com cautela, pois o 2-AG é o endocanabinóide mais abundante nos tecidos (Bisogno et al., 2005). Neste tipo de tumor, um tratamento que atinge especificamente os níveis da AEA sem afetar o 2-AG seria o ideal.

A células tumorais do hepatoma, HepG2, por sua vez, foram pesquisadas em relação à três derivados dos canabinóides: AEA (Biswas et al., 2003), AM251 (Lee et al., 2008) e WIN 55,212-2 (Giuliano et al., 2009). Em estudo com duração de 24 hs, Biswas (2003) descreveu que a AEA (1-15 μ M) diminuiu a viabilidade das células tumorais HepG2 de forma concentração-dependente (significante a partir de 10 μ M). Mecanismo de morte celular apoptótica e de sequestro do ciclo celular na fase G0/G1, ambos de forma receptor-independentes, foram verificados

em concentrações de 10-15 μM de AEA (Biswas et al., 2003). Estas células do hepatoma, expostas ao tratamento com o AM251 (10 μM) também apresentaram diminuição de sua viabilidade, observada de forma tempo-dependente em pesquisa realizada durante 5 dias, com observação de mudanças marcantes na morfologia das mesmas (Lee et al., 2008a). Giuliano (2009), por sua vez, descreveu que o WIN 55,212-2 (1-10 μM) diminuiu a viabilidade das células HepG2 de forma tempo- e concentração- dependentes em pesquisa realizada por 72 hs. Este autor mostrou, adicionalmente, que o WIN 55,212-2 induziu apoptose (aumento de células condensadas e com DNA fragmentado) e sequestro do ciclo celular na fase subG0/G1 nestas células, em pesquisa com 36 hs de duração. Esses efeitos, por sua vez, foram mediados pelos receptores CB2 (Giuliano et al., 2009).

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Em relação aos mecanismos subjacentes aos efeitos opostos exercidos pelos endocanabinóides AEA e 2-AG na proliferação das células tumorais do colangiocarcinoma, temos como mecanismo central a interação dos mesmos com o transporte lipídico na membrana plasmática (DeMorrow et al., 2007). Estudos prévios relataram que esta membrana é também requerida por várias drogas antitumorais para o seu sítio de ação (Arancia and Donelli, 1991; Burns, 1988; Tritton and Hickman, 1990). No entanto, pouco sabe sobre os mecanismos de sinais precoces envolvidos na membrana plasmática para que ocorra a indução de morte celular pela quimioterapia (DeMorrow et al., 2007). A pesquisa desses mecanismos é um alvo muito importante para desvendar possíveis abordagens terapêuticas no tratamento do câncer. Em relação aos canabinóides, vários estudos descreveram, em diferentes modelos de tumores, que as suas ações na inibição do crescimento ou na supressão tumoral ocorrem através de mecanismos receptor-independentes. Adicionalmente, foi verificado que, na maioria desses casos, os canabinóides interagiram com os mecanismos considerados elementos-

chave no destino celular, quais sejam as estruturas do transporte lipídico na membrana plasmática e/ou a regulação dos níveis de ceramida (Hinz et al., 2004a; Mimeault et al., 2003; Vaccani et al., 2005; Gardner et al., 2003; Giuliano et al., 2006).

Os dados do estudo de DeMorrow (2007) nas células tumorais humanas do colangiocarcinoma *in vitro*, sugerem que a AEA necessita da integridade estrutural da membrana de transporte lipídico para induzir os mecanismos de transmissão de sinais que resultam no aumento da apoptose/inibição do ciclo celular. Por outro lado, esta membrana não é necessária para o aumento da proliferação mediado pelo 2-AG (DeMorrow et al., 2007). Esses dados foram verificados em experimento nas células tumorais Mz-ChA-1, em que foi observado que o uso da Metil- β -ciclodextrina (MCD) e da filipina III (que são depletors da membrana do colesterol) inibiram os efeitos antiproliferativos induzidos pela AEA, mas não inibiram a estimulação da proliferação induzida pelo 2-AG (DeMorrow et al., 2007). Este estudo também mostrou que a acumulação de ceramida foi essencial para a morte celular induzida pela AEA (DeMorrow et al., 2007). A ceramida é um componente importante na estrutura do transporte lipídico, pois ao mudar as propriedades biofísicas da mesma, torna-a impermeável, estabilizando-a (Kolesnick et al., 2000; Xu et al., 2001). Outro dado importante relatado por DeMorrow (2007), ainda não mostrado em outro tipo de célula tumoral, é que a AEA recruta as proteínas Fas e FasL, que são componentes do complexo de 'morte receptor', para dentro das membranas do transporte de lipídios, facilitando a ativação do mesmo para a indução de apoptose.

DeMorrow, em outro estudo (DeMorrow et al., 2008), utilizando como amostra as mesmas células (Mz-ChA-1 do colangiocarcinoma), descreveu pela primeira vez que o efeito antiproliferativo da AEA *in vitro* ocorreu pela supra-regulação da expressão da Wnt 5a. Este mecanismo dependente de Wnt 5a foi descrito em outros estudos como possuidor de propriedades supressivas de tumor em outras formas de câncer (Kremenevskaja et al., 2005; Liang et al., 2003; Roman-Gomez et al., 2007; Ying et al., 2007; Ying et al., 2008). Em seu estudo, mostrou adicionalmente o papel do receptor órfão da tirosina quinase, Ror2.

Experimentos mostraram que o mesmo foi ativado pelo aumento da expressão da Wnt 5a e que subsequentemente ativou a JNK (DeMorrow et al., 2008). O efeito antiproliferativo da mecanismo Wnt 5a/Ror2/JNK já havia sido mostrado previamente em células tumorais do cólon (McLeod et al., 2007). Efeitos da ativação da JNK nos mecanismos antiproliferativos do colangiocarcinoma também já foram relatados em outro estudo (Werneburg et al., 2007). Como descrito anteriormente, a AEA exerceu seus efeitos antiproliferativos pela estabilização das estruturas do transporte lipídico (DeMorrow et al., 2007). No entanto, não é sabido se a ativação do mecanismo dependente da Wnt 5a, pela AEA, é diretamente relacionada com a membrana do transporte lipídico ou se é uma consequência de evento mediado por este mecanismo (DeMorrow et al., 2008). Um estudo progresso (Zhai et al., 2004) sugeriu que os sinais moleculares Wnt podem ser ativados pelas estruturas do transporte lipídico.

DeMorrow (2008) mostrou, adicionalmente, que a redução da progressão tumoral do colangiocarcinoma *in vivo*, pela AEA, foi acompanhada de diminuição da expressão de fatores tróficos, como a VEGF-C, e de seus receptores VEGF-R2 e CEGF-R3, sugerindo um mecanismo antiangiogênico. Estes fatores são necessários para a vascularização dos tumores (Ferrara, 2005a, Ferrara and Kerbel, 2005b) e contribuem para o desenvolvimento do crescimento tumoral do colangiocarcinoma (DeMorrow et al., 2008).

Em relação às células tumorais HepG2 do hepatoma, os efeitos apoptóticos da AEA foram mediados pela membrana do colesterol, pois os depletors desta membrana (MCD ou mevastatina) inibiram significativamente os efeitos deste canabinóide (Biswas et al., 2003). Em experimentos, também foi mostrado que o antioxidante N-acetil cisteína atenuou os efeitos da AEA nestas células (Biswas et al., 2003). A AEA, embora não tenha aumentado o ROS, aumentou a toxicidade celular induzida pelo mesmo, sendo este efeito antagonizado pelo MCD. Estes dados sugerem que a AEA aumenta a susceptibilidade das células HepG2 ao estresse oxidativo na presença da membrana do colesterol (Biswas et al., 2003). Adicionalmente, foi relatado que a AEA (10 μ M) induziu a fosforilação de ambas as p38 MAPK e JNK de forma tempo-dependente em estudo de 6 hs. Por outro lado,

a AEA induziu a uma infra-regulação dos fatores de sobrevivência celular Akt/PKB (Biswas et al., 2003). É importante salientar que, nestas células, o inibidor da acumulação celular da AEA, AM404, não teve efeito na morte celular induzida pela mesma (Biswas et al., 2003).

O AM251, por sua vez, exerceu seus efeitos antiproliferativos nas células HepG2 mediados pela fosforilação da ATF-3, da JNK e da AMPK (Lee et al., 2008a). Em concentrações de 0-30 μM , o AM251 induziu aumento da fosforilação da ATF3 de forma tempo- e concentração- dependentes, sendo estes efeitos antagonizados pelo inibidor da fosforilação da ATF-3 (Lee et al., 2008a). Foi verificado, adicionalmente, que o inibidor da JNK antagonizou os efeitos antiproliferativos do AM251 bem como seus efeitos na ativação da ATF-3 (Lee et al., 2008a). Dessa forma, este autor mostrou que a JNK, que já foi descrita como reguladora dos fatores de transcrição que inclui a ATF3 (Cai et al., 2000; Yin et al., 1997), é um regulador-chave que antecede a mesma. No entanto, o achado mais importante deste estudo é que a AMPK é envolvida na supressão da viabilidade das células HepG2 pela mediação do AM251 (Lee et al., 2008a). Este derivado canabinóide, em concentração de 10 μM , induziu a um aumento da fosforilação da AMPK no sítio Thr172. Adicionalmente, o inibidor desta fosforilação antagonizou parcialmente os efeitos do AM251 na fosforilação JNK/ATF3 (Lee et al., 2008a), mostrando que ativação da AMPK precede a ativação da JNK/ATF3.

O canabinóide WIN 55,212-2 (5, 10 μM), por sua vez, exerceu seu efeito apoptótico nas células HepG2 acompanhado de uma infra-regulação dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (Bcl-2 e Bcl-XL) e concomitante aumento nos níveis dos membros pró-apoptóticos (Bax e Bcl-XS) (Giuliano et al., 2009). Em consequência desses eventos, houve perda do potencial da membrana mitocondrial e ativação das caspases executoras 3 e 6 (Giuliano et al., 2009). Foi observado, adicionalmente, que o WIN 55,212-2 (5, 10 μM) ativou a caspase-8 (Giuliano et al., 2009). Esse último evento pode ter sido uma consequência da ativação de mecanismos apoptóticos extrínsecos ou de um laço regulatório relacionado às caspases 9 ou 3, como relatado por Reddy (2007) (Giuliano et al., 2009).

Em relação aos fatores de sobrevivência nas células HepG2, Giuliano (2009) descreveu, em seu estudo, que estas células expressaram altos níveis de survivina, fosfo-AKT e Hsp72. Após o tratamento destas células com o WIN 55,212-2 (10 μ M), no entanto, todas estas proteínas foram marcadamente infra-reguladas, sendo esta infra-regulação sugerida como papel-chave nas ações apoptóticas deste canabinóide (Giuliano et al., 2009). Foi observado, adicionalmente, que o WIN 55,212-2 induziu a uma diminuição nos níveis da fosforilação da BAD nestas células. Este evento pode ter sido uma consequência natural da infra-regulação da AKT (Giuliano et al., 2009). A inibição da fosforilação da BAD, por sua vez, poderia ativar a fase executora da apoptose através do aumento na proporção entre os membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família Bcl-2, com consequente ativação do mecanismo de morte mitocondrial (Giuliano et al., 2009).

Neste estudo, Giuliano (2009) pesquisou, adicionalmente, a influência do mecanismo PPAR γ na morte das células HepG2 induzida pelo WIN 55,212-2. Experimentos mostraram que o tratamento destas células com este canabinóide induziram a uma aumento significativo dos níveis de PPAR γ nas mesmas. Os inibidores específicos de PPAR γ (GW9662 ou T0070907), por sua vez, neutralizaram marcadamente a toxicidade celular induzida pelo WIN 55,212-2, bem como houve reversão parcial, pelo GW9662, da infra-regulação dos níveis dos fatores de sobrevivência (survivina, fosfo-AKT e fosfo-BAD) induzidos por este canabinóide (Giuliano et al., 2009). Estes achados indicam, portanto, que o aumento de PPAR γ antecedeu esses eventos. Este mecanismo é consistente com outros estudos que descreveram que a ativação da PPAR γ , por agonistas específicos, leva à inibição do crescimento, apoptose e diferenciação de várias células tumorais (Krishnan et al., 2007). Estas ações, por sua vez, foram firmemente relacionadas à infra-regulação da survivina e de outros fatores anti-apoptóticos como a AKT (Harikumar and Aggarwal, 2008; Kim et al., 2006).

Ao pesquisar a influência da membrana de transporte lipídico, Giuliano (2009) descreveu que o WIN 55,212-2 também exerceu suas ações apoptóticas nas células HepG2 pela mediação da mesma. Esse mecanismo foi confirmado

pela verificação de que o depletor desta membrana, MCD, inibiu parcialmente os efeitos apoptóticos deste canabinóide (Giuliano et al., 2009). Experimentos adicionais, em que foi avaliada a coincubação das células HepG2 com os antagonistas do receptor CB2 ou com os antagonistas da membrana de transporte lipídico, mostrou reversão parcial do aumento de PPAR γ -dependente do WIN 55,212-2 (Giuliano et al., 2009). Estes achados sugerem uma possível ligação entre os componentes desta membrana e os fatores de transcrição.

EFEITOS ANTITUMORAIS DOS CANABINÓIDES NOS TUMORES COLO-RETAIS

O câncer colo-retal é considerado uma das maiores causas de morte por câncer no mundo ocidental (Patsos et al., 2005b). Esta revisão incluiu artigos que pesquisaram alguns tipos histológicos destas malignidades. Em relação à expressão de receptores canabinóides, os receptores CB1 e CB2 foram expressos em todas as linhas de células tumorais colo-retais pesquisadas, com exceção das células CaCo-2, que expressaram essencialmente os receptores CB1 (Ligresti et al., 2003; Joseph et al., 2004; Greenhough et al., 2007). Mecanismos celulares e moleculares foram descritos para os efeitos dos canabinóides nas células tumorais colo-retais, conforme mencionados a seguir.

MECANISMOS CELULARES E RECEPTORES CANABINÓIDES

Ligresti (2003) descreveu que os canabinóides AEA, 2-AG e HU-210 (os três com concentrações micromolares) inibiram o crescimento celular das células tumorais diferenciadas DLD-1 (fenotipicamente menos invasivas). Este efeito foi mediado pelos receptores CB1, embora no caso do HU210, houve um envolvimento adicional dos receptores CB2. Adicionalmente, estes canabinóides inibiram significativamente o crescimento das células indiferenciadas CaCo-2 (fenotipicamente mais invasivas). Vale ressaltar que as células CaCo-2 foram muito mais sensíveis a ação destes canabinóides, quando comparada às células DLD-1. Ainda, o efeito celular verificado nestas células foi mediado pelos receptores CB1, não envolvendo nem apoptose e nem necrose (Ligresti et al., 2003).

No entanto, recentemente Gustafsson (2009b) relatou que os canabinóides AEA e HU-210 promovem morte celular apoptótica nas células CaCo-2 sem o envolvimento dos receptores CB1. Isto porque o tratamento com antagonista dos receptores canabinóides não inibiram os efeitos da AEA e do HU210. Além disso,

o HU211, um enantiômero do HU-210 que não interage como os receptores canabinóides, apresentou efeitos citotóxicos similares ao HU-210. Além da falta de envolvimento dos receptores CB1, aquele estudo mostrou que os canabinóides não tiveram seus efeitos mediados pelos receptores acoplados à proteína G nem pelo receptor vanilóide VR1 (Gustafsson et al., 2009b).

Não se sabe ao certo o porquê das divergências entre os resultados obtidos no estudo de Gustafsson e Ligresti. Embora ambos os estudos tenham utilizado células CaCo-2 e mostrado que as mesmas expressaram receptores canabinóides, é possível que diferentes cepas da mesma linha de células podem apresentar importantes diferenças na expressão de componentes-chave para a resposta em questão. Esta questão está bem estabelecida nas células C6 do glioma, onde seus subclones apresentam diferentes sensibilidades aos efeitos dos canabinóides (Galve-Roperh et al., 2000).

Gustafsson (2009b) também pesquisou o efeito do quimioterápico 5-FU (1-100 μM) nas células CaCo-2 e mostrou que o mesmo, bem como a AEA (0.03-30 μM) e o HU-210 (0.03-3 μM), diminuíram a proliferação das células CaCo-2 de forma concentração-dependente em experimento com duração de 3 dias. No entanto, houve um grande diferença quanto a potência e eficácia destes compostos, favorecendo o HU-210 (mais potente) e a AEA em comparação à 5-FU (Gustafsson et al., 2009).

Em relação às outras células tumorais pesquisadas (HT29 e HCT116), o HU-210 teve maior eficácia na toxicidade das mesmas quando comparada às células CaCo-2. No entanto, o HU-210 (3 μM) apresentou efeito citotóxico sinérgico ao 5-FU (3, 10, 30 μM) apenas nas células CaCo-2. Vale ressaltar que não houve efeito sinérgico entre a AEA e o 5-FU em nenhuma das células estudadas (Gustafsson et al., 2009b).

Assim como Gustafsson (2009b), que descreveu que o efeito citotóxico da AEA, 2-AG e HU-210 não foram mediados pelos receptores canabinóides e VR1 em células CaCo-2, Patsos (2005a) relatou que a AEA induziu morte celular não apoptótica nas células HT29 (em concentrações de 1, 10, 25 μM) e nas células

HVA7/C29 (em concentrações de 10 μM e 25 μM). Este efeito foi mediado, ao menos em parte, pelo metabolismo da COX-2 (vide abaixo).

Atualmente, há um crescente interesse sobre o conhecimento de formas de morte celular não apoptótica, pois a indução de morte celular por estes outros mecanismos pode ser particularmente benéfica naqueles tumores que se tornaram resistentes à indução de apoptose (Okada and Mak, 2004).

No intuito de verificar a mediação dos receptores canabinóides nas células tumorais do cólon, Cianchi (2008) utilizou em seu experimento dois ligantes altamente seletivos para os receptores canabinóides, a fim de reduzir ao máximo qualquer interferência das atividades receptor-independentes previamente relatadas para os canabinóides endógenos e naturais (Patsos et al., 2005a). Neste trabalho, Cianchi realizou estudos *in vivo* (tratamento por 12 dias) e *in vitro* (exposição celular de 48 h), utilizando células tumorais HT29, DLD-1, LoVo, HCT8, SW480, HCA7, HCT15. A ACEA (agonista CB1) e principalmente o CB13 (agonista CB2), ambos em concentrações nanomolares (100 nM), induziram apoptose das células DLD-1 e HT29, sendo estes efeitos mediados pelos receptores CB1 e CB2, respectivamente. Adicionalmente foi verificado que o CB13 diminuiu a viabilidade celular de todas as células pesquisadas. Finalmente, o estudo *in vivo* constatou que o CB13 (2.5 mg/kg/dia) reduziu de forma significativa o crescimento de tumores do cólon já estabelecidos em ratos marcados com células DLD-1 (que expressam maior quantidade de CB2 que as células HT29), quando comparado ao grupo controle (Cianchi et al., 2008). Vale ressaltar, que os achados de Cianchi (2008) foram os pioneiros a relatar a maior importância dos receptores CB2 na indução da apoptose *in vitro* e na diminuição do crescimento tumoral em modelos de câncer de cólon *in vivo*.

Mecanismo de morte celular apoptótico também foi verificado nas células tumorais SW480, HCT-15, HT29 e HCA7 (Greenhough et al., 2007). Neste estudo, o delta-9-THC (2.5-12.5 μM) induziu apoptose e promoveu uma diminuição significativa da viabilidade destas células, de forma concentração-dependente, sendo estes efeitos mediados pelo receptor CB1. No entanto, Santoro (2009) mostrou que o rimonabanto, um antagonista/agonista inverso do receptor CB1,

preveniu a formação de focos de criptas aberrantes (lesões pré-cancerosas) em modelo de ratos com carcinogênese de cólon induzida quimicamente. Adicionalmente, o rimonabanto em concentrações de 0,1 a 20 μM e por 24 e 48 hs, diminuiu a proliferação e aumentou a morte das células DLD-1, CaCo-2 e SW620 de forma concentração (significante acima de 2.5 μM)- e tempo-dependentes, sendo estes efeitos maiores nas células DLD-1 e SW620. Os efeitos antiproliferativos verificados neste estudo envolvem mecanismos de sequestro do ciclo celular na fase G2-M, sem indução de apoptose, sendo que as células DLD-1 exibiram o maior bloqueio nesta fase em relação às outras células. O sequestro do ciclo celular relatado está intimamente ligado à mitose, evidenciado pelo aumento significativo do número de células poliplóides em comparação ao controle (Santoro et al., 2009). O rimonabanto também aumentou de forma significativa as aberrações estruturais do cromossomo, um claro indício de entrada em mitose das células com segregação do DNA (Iliakis et al., 2004). Neste sentido, torna-se claro que a eficácia do rimonabanto em inibir a proliferação celular DLD-1 foi em decorrência da indução de catástrofe mitótica. Resultados similares foram observado nas células CaCo-2 e SW620 (Santoro et al., 2009).

Vale ressaltar que este novo mecanismo de morte celular é extremamente importante do ponto de vista terapêutico. A catástrofe mitótica, também conhecida como morte celular mitótica/proliferativa, é uma forma de morte celular pouco compreendida. Sabe-se que resulta de um prolongado sequestro do crescimento celular durante a mitose e dano extensivo do DNA como consequência de pontos de localização deficientes do ciclo celular (Castedo et al., 2004; Roninson et al., 2001). Formas não apoptóticas de morte celular estão sendo extensivamente estudadas como um alvo potencial para terapias antitumorais. Além disso, vem crescendo a adoção de tratamentos convencionais para o câncer cujo mecanismo de ação se baseia na morte celular por catástrofe mitótica.

Existe uma atenção especial quanto ao desenvolvimento de novas drogas antitumorais e antiangiogênicas. A antraciclina é uma família de compostos pertencentes ao grupo de quinonóides que são produzidos por diferentes cepas de estreptomicina. Estes fármacos exercem não apenas efeitos antibióticos, mas

também antineoplásicos em alguns tipos de tumores (Di Marco et al., 1981). Os membros mais conhecidos desta família são os quimioterápicos doxorubicina e daunorubicina (Di Marco et al., 1981). Embora eficazes, estas substâncias são extremamente tóxicas.

Os canabinóides-quinona foram sintetizados em 1968, mas não haviam sido testados para fins medicinais. Foi somente em 2004 que Kogan (2004), pesquisando o canabidiol-quinona (HU-311), verificou que o mesmo inibiu o crescimento das células colo-retais HT29 *in vitro* (IC₅₀ = 3.125 µM) e adicionalmente diminuiu significativamente o crescimento dos tumores de ratos marcados com estas células *in vivo* (2,5 e 5 mg/kg), quando comparado ao controle (Kogan et al., 2004). Vale ressaltar que o efeito *in vitro* também foi verificado em células de outros tipos tumorais, como as células leucêmicas Jurkat (maior potência; IC₅₀ = 0.2 µM), SNB-19 (glioblastoma), MCF-7 (mama), DU-145 (próstata) e NCI-H-226 (pulmão) (Kogan et al., 2004). Neste sentido, o HU-331 tem um efeito antitumoral amplo. Finalmente, o HU-311 (1,2 e 4,8 µM) induziu morte necrótica das células HT29, bem como das células Raji (linfoma) e Jurkat (leucemia). Este efeito não ocorreu por mecanismos de sequestro do ciclo celular e nem foi mediado pelos receptores canabinóides (Kogan et al., 2007a).

MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR

Ligresti (2003) descreveu que os efeitos antiproliferativos da AEA e 2-AG em células tumorais colo-retais CaCo-2 e DLD-1 foram mediados não somente pelo receptor CB1, mas também via ciclooxigenase-2 (COX-2). Isso porque o inibidor da COX-2 (indometacina) inibiu a proliferação celular das células CaCo-2 indiferenciadas, sendo este efeito antagonizado pelo SR141716 (Ligresti et al., 2003).

A influência da COX-2 foi similarmente constatada nas células tumorais HT29 e HCA7/C29 do carcinoma colo-retal, que expressam níveis de COX-2 moderados e altos, respectivamente (Patsos et al., 2005a). Neste estudo, o

inibidor da COX-2, NS398, inibiu os efeitos de morte celular não apoptótica induzidos pela AEA (10 μ M). Vale ressaltar que as células tumorais SW480, que expressam baixos níveis de COX-2, não sofreram morte celular significativa pela AEA (Patsos et al., 2005a).

O fato da COX-2 estar superexpressa numa alta proporção destes carcinomas (Elder et al., 2002) e também em vários tipos de outros tumores, viabiliza a análise da sensibilidade destas células ao tratamento com canabinóide endógeno. A COX-2 pode estimular a formação de precursores para a produção de prostaglandinas (Dempke et al., 2001). Adicionalmente, ao ser recaptada para dentro da célula, a AEA pode ser metabolizada pelas enzimas da COX em PG-EAs (Patsos et al., 2005a). Patsos (2005a) relatou que o tratamento com AEA, nas células tumorais colo-retais, aumentou a produção da PGE₂/PGE₂-EA (prostaglandinas E₂-Etanolamidas), com consequente morte das células tumorais HT29 e HCA7/C29, desta vez por mecanismo celular apoptótico. O aumento na produção total de PGE₂/PGE₂-EA provavelmente não foi atribuído a um aumento da PGE₂, porque em vez de efeitos inibitórios do crescimento, esta prostaglandina tem efeitos estimulantes do crescimento nas células do carcinoma colo-retal (Qiao et al., 1995; Mutah et al., 2002; Pozzi et al., 2004). Portanto, Pastos (2005a) sugeriu que a AEA induziu morte celular não apoptótica não somente pela ativação de uma única PG-EA. Esta morte celular pode ter sido em decorrência da combinação de metabólitos dependentes da COX-2, como os ácidos 11-hidroxi-eicosatetraenóico e 15-hidroxi-eicosatetraenóico (Kazak et al., 2003), e/ou uma combinação de fatores, incluindo PG-EAs (Patsos et al., 2005a). Vale ressaltar que os efeitos antiproliferativos das prostaglandinas série-D (PGD₂) e de seu produto desidratado 15d-PGJ₂ foram verificadas nas células tumorais JW2 de pele (não melanoma) (Van Dross, 2009) e nas células tumorais humanas do cérvix uterino (Eichele et al., 2009). Nestas células, a COX-2 mediou a metabolização da AEA e da meAEA, respectivamente, promovendo o aumento dessas prostaglandinas (Van Dross, 2009; Eichele et al., 2009). É possível que estas prostaglandinas também possam atuar neste modelo tumoral.

A ação antiproliferativa da AEA nas células tumorais colo-retais, por outro lado, foi aumentada pelos inibidores da captação da AEA, VDM11 e VDM13 (Ligresti et al., 2003), e pelos inibidores da hidrólise da mesma, AA-5-HT (Ligresti et al., 2003) e MAPF (inibidor da FAAH) (Patsos et al., 2005a). Estes achados sugerem que o aumento das quantidades endógenas de AEA significa mais AEA disponível para exercer suas atividades antiproliferativas nestas células tumorais, como a ativação do receptor CB1 (Ligresti et al., 2003) e a sua metabolização, mediada pela COX-2, em prostaglandinas (Patsos et al., 2005a).

No entanto, estudando mecanismos moleculares adicionais, Gustafsson (2009b) mostrou que o efeitos citotóxicos da AEA e do HU-210 nas células CaCo-2 não foram mediados pela ceramida e pela MAPK. Além disso, diferente do que foi relatado por Ligresti (2003), os inibidores da FAAH, COX e LOX não alteraram os efeitos da AEA, sugerindo que os metabólitos da AEA não estão relacionados com os efeitos citotóxicos da AEA (Gustafsson et al., 2009b). Como mecanismo molecular adicional, Gustafsson (2009b) observou que os efeitos citotóxicos dos canabinóides foram diminuídos significativamente pelo α -tocoferol, o que sugere um mecanismo da membrana de transporte lipídico. O α -tocoferol reduziu a toxicidade induzida pelo HU-210, AEA e a toxicidade combinada de HU-210 com 5-FU (Gustafsson et al., 2009b). Adicionalmente, a ação apoptótica dos canabinóides nas linhas de células CaCo-2 envolveu o mecanismo de estresse oxidativo. Embora o L-LAME, um inibidor da síntese do óxido nítrico, não tenha alterado a toxicidade induzida pela combinação do HU-210 e 5-FU, o mesmo inibiu a toxicidade induzida por estas substâncias quando administradas isoladamente (Gustafsson et al., 2009b).

Já foi mostrado que o óxido nítrico tem importante papel na tumorigênese do cólon (Ambs et al., 1998; Cianchi et al., 2003; Lala and Chakraborty, 2001; Nathan and Xie, 1994) e relatos adicionais indicaram que a inibição da síntese do óxido nítrico poderia ser útil como quimiopreventivo no câncer de cólon (Rao et al., 2004). Seria de se esperar, então, que a inibição da síntese do óxido nítrico poderia afetar a proliferação das células tumorais do cólon. No entanto, o efeito atenuante do L-NAME sobre a citotoxicidade induzida pelo HU-210 e pela AEA

neste estudo, aparentemente não é relacionado às suas ações na síntese do óxido nítrico, pois outro inibidor não seletivo da NOS, 7-NI, não apresentou efeito na apoptose induzida pelos canabinóides (Gustafsson et al., 2009b). Portanto, os efeitos do HU-210 e da AEA são decorrentes de outros mecanismos. Outro importante mecanismo molecular dos canabinóides seria os seus efeitos diretos sobre a função mitocondrial (Athanasίου et al., 2007). Neste sentido, os efeitos encontrados com o HU-210 e pela AEA poderiam ser resultantes de uma ação direta na função mitocondrial.

Em relação aos mecanismos subjacentes à morte celular induzida pelos ligantes altamente seletivos ACEA e CB13, Cianchi (2008) descreveu que os mesmos induziram a ativação da caspase 3, um grande indicativo de morte por apoptose. Este mecanismo foi mediado pela acumulação de ceramida *de novo*, já que a fumonisina B1 inibiu os efeitos apoptóticos induzidos pelo ACEA e CB13, principalmente nas células tumorais expostas ao tratamento com CB13 *in vitro*. No mesmo estudo foi constatado um aumento da expressão de ceramida em ratos com tumores tratados com o CB13 em relação ao controle (Cianchi et al., 2008). Estes achados ilustram a importância da mediação da ceramida na atividade antitumoral dos canabinóides nestas células transformadas do cólon. Quanto aos receptores canabinóides que poderiam estar relacionados com este mecanismo molecular, estudos recentes têm mostrado que a ativação tanto dos receptores CB1 quanto dos receptores CB2 pode induzir apoptose através da estimulação da síntese de ceramida *de novo* em vários tumores humanos, como gliomas (Sánchez et al., 2001a; Galve-Roperh et al., 2000; Carracedo et al., 2006a), leucemia (Herrera et al., 2006) e câncer pancreático (Carracedo et al., 2006b).

Alguns estudos experimentais mostraram que a ceramida tem uma função crucial na transmissão de algumas respostas funcionais induzidas pelo TNF α em adipócitos e células neurais (Wiegmann et al., 1994; Xu et al., 1998; Fernandez-Veledo et al., 2006). Isto explica o porquê dos ligantes canabinóides altamente seletivos ACEA e CB13 (principalmente o CB13), além de aumentar a síntese de ceramida *de novo*, também estimulam significativamente a síntese de TNF α nas células DLD-1 e HT29, através da mediação de seus respectivos receptores

canabinóides. Adicionalmente, o CB13 é capaz de aumentar os níveis de TNF α nos tumores tratados quando comparado ao grupo controle. Neste sentido, é possível que o TNF α seja o principal mediador da síntese de ceramida *de novo* pela ativação dos receptores canabinóides nestas células tumorais (Cianchi et al., 2008). Vale ressaltar que vários estudos mostram que o sistema canabinóide pode modular a produção de TNF α em outras linhas celulares, com efeitos tanto supressivos (Fernández-López et al., 2006; Bem-Shabat et al., 2006) quanto estimulantes (Gary-Bobo et al., 2007; Tucci et al., 2006; Derocq et al., 2000; Gertsch et al., 2004), dependendo do tipo de célula investigada.

Os mecanismos apoptóticos de outro canabinóide, o delta-9-THC, foram descritos de forma minuciosa por Greenhough (2007) nas células tumorais SW480, HCT-15 e HT29. Além da mediação do receptor CB1 e da ativação da caspase 3, esta última indicativo de apoptose mitocondrial intrínseca, o delta-9-THC diminuiu a fosforilação de ERK e AKT, além de ativar a proteína pró-apoptótica Bad. Por outro lado, não foram verificadas alterações na fosforilação de p38 MAPK e JNK (Greenhough et al., 2007). Estes achados são particularmente relevantes para o câncer colo-retal, dado que ativações aberrantes de da ERK e AKT ocorrem na maioria dos tumores colo-retais, em decorrência das mutações em componentes da RAS-MAPK e PI3K-AKT (Bos et al., 1987; Davies et al., 2002; Parsons et al., 2005; Samuels et al., 2005).

Vale ressaltar que a Bad também participa do efeito apoptótico do delta-9-THC em células leucêmicas Jurkat (Jia et al., 2006). No entanto, nas células leucêmicas Jurkat, o delta-9-THC desfosforilou a Bad somente no sítio Ser112 (Jia et al., 2006), enquanto que nas células SW480, HCT-15 e HT29 a desfosforilação ocorreu adicionalmente no sítio Ser136 (Greenhough et al., 2007). Além disso, nas células leucêmicas Jurkat, o U0126 (um inibidor da MEK) imitou os efeitos pró-apoptóticos do THC, sugerindo que apenas a inibição do mecanismo RAS-MAPK é envolvido na apoptose das células Jurkat pelo THC (Jia et al., 2006). Já nas células SW480, HCT-15 e HT29, o U0126 não foi capaz de induzir apoptose robusta. No entanto um aumento significativo de apoptose foi verificado com a associação entre U0126 e o LY294002, um inibidor da PI3K-AKT. Neste sentido,

nas células tumorais colo-retais, os efeitos do delta-9-THC são mediados tanto pelo sistema RAS-MAPK quanto pelo sistema PI3K-AKT (Greenhough et al., 2007). Finalmente, o efeito do delta-9-THC difere nas células leucêmicas Jurkat em relação às células tumorais colo-retais, quanto aos receptores canabinóides envolvidos. Jia (2006) relatou igual envolvimento dos receptores CB1 e CB2 na apoptose das células Jurkat induzida pelo THC. Já Greenhough (2007) mostrou que apenas o receptor CB1 foi responsável pela inibição de ambas ERK e AKT na apoptose das células tumorais colo-retais induzidas por este canabinóide, mesmo considerando o fato das células colo-retais expressarem ambos os receptores canabinóides.

O conjunto de evidências acima descritas agrega a hipótese de que os canabinóides atuam por especificidade de tipo de célula tumoral. Adicionalmente, sugerem que a supressão da atividade da Bad é importante nos tumores altamente dependentes da ERK e AKT, sendo que a ativação desta proteína pelo delta-9-THC está diretamente relacionada com os seus efeitos apoptóticos em células tumorais colo-retais.

Quanto aos mecanismos moleculares presentes na morte celular por catástrofe mitótica induzida pelo rimonabanto (Santoro et al., 2009), sabe-se que o mesmo se dá, ao menos em partes, pelo aumento sustentado do complexo ciclina B1/cdk1 e diminuição de ambas as proteínas Aurora B e Chk1 (Santoro et al., 2009). Vale ressaltar que estas proteínas são necessárias para a transição G2/M e segregação cromossômica durante a mitose (Castedo et al., 2002; Castedo et al., 2004; Vagnarelli and Earnshaw, 2004; Vader et al., 2006; Abraham, 2001). A inibição da Aurora B e da quinase Chk1 fosforilada poderia ter interesse particular, haja vista que a supressão seletiva destas proteínas poderia ser uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento do câncer (Yan et al., 2004; Xiao et al., 2005; Hayama et al., 2007). Em relação aos mecanismos moleculares subjacentes à indução de aberrações cromossômicas, foi verificado que o rimonabanto inibiu a ativação da p38 MAPK e reduziu a expressão PARP-1 (Santoro et al., 2009), que são duas proteínas-chave na manutenção da integridade genômica (Süsse et al., 2004; Terzoudi et al., 2005; Reinhardt et al., 2007).

No que diz respeito aos mecanismos subjacentes na morte celular tumoral induzida pelo HU-331, Kogan mostrou que este CBD-quinona agiu pelo mecanismo de inibição catalítica da topoisomerase II, evitando a fragmentação do DNA. Doses baixas de HU-331 (100 nM) foram capazes de inibir a enzima, enquanto que com doses maiores (10-30 μ M) houve uma supressão total da enzima. Vale ressaltar que a topoisomerase II participa da maioria das transações do DNA, como replicação, transcrição, segregação cromossomal, e reunião nucleossomal (Kogan et al., 2007a). No entanto, os efeitos na morte celular não foram mediados pela cascata de caspases, estresse oxidativo e topoisomerase I, bem como não envolveu a modulação dos fatores de sobrevivência celular (Kogan et al., 2007a). A inibição da topoisomerase II já foi relatada para outros agentes quimioterapêuticos como a doxorubicina. A doxorubicina, assim como outras antraquinonas, age através de numerosos mecanismos, como apoptose, geração de ROS, inibição não seletiva de ambas as topoisomerasas (I e II), ativação intracelular de segundos mensageiros, etc. Já o HU-331 apresenta uma atividade altamente específica sobre a indução de morte celular (Kogan et al., 2007a).

Em um estudo comparativo entre o HU-331 e o quimioterápico doxorubicina, Kogan (2007b), foi constatado em modelos tumorais de ratos marcados com células HT29 (côlon) e Raji (linfoma) mostrou que ambas as drogas diminuíram significativamente os tumores em relação ao grupo controle controle (Kogan et al., 2007b). Vale ressaltar que a duração do tratamento foi de dois meses para as células HT29 e três semanas para as células Raji. No entanto, os ratos marcados com células HT29 e tratados com o HU-331 (15 mg/kg/sem) tiveram uma maior diminuição dos tumores quando comparado aos ratos tratados com a doxorubicina (2.5 mg/kg/sem) (Kogan et al., 2007b). Resultados similares foram obtidos para os ratos marcados com células Raji (Kogan et al., 2007b). Finalmente, as concentrações usadas de HU-311 e que induziram atividade antitumoral, apresentaram toxicidade mínima, já que os ratos tratados com a droga além de ganharem peso, não mostraram alterações significativas em exames laboratoriais (ecocardiografia, níveis plasmáticos da troponina cardíaca T e contagem celular sanguínea) (Kogan et al., 2007b). Em contraste, os ratos

tratados com a doxorubicina perderam peso e tiveram alterações significativas na função cardíaca, indicado pelos exames acima descritos. Adicionalmente, houve mielotoxicidade, com diminuição significativa dos leucócitos e das plaquetas (Kogan et al., 2007b).

Seria esperado que o HU-331, sendo uma quinona, induzisse a formação de ROS, substâncias diretamente relacionadas com a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina. No entanto, em análise mais específica (proteína carbonils e MDA) não foram encontradas diferenças no tecido cardíaco dos animais tratados com HU-331, quando comparado ao grupo controle (Kogan et al., 2007b). Estes resultados corroboram os achados de outro estudo que mostrou que o HU-331 induziu morte celular tumoral *in vitro* sem a geração de ROS (Kogan et al., 2007a). Portanto, as evidências acima mencionadas, mostrando que o HU-331 é mais efetivo na diminuição do crescimento tumoral e menos tóxico que o quimioterápico doxorubicina, expõem um grande potencial para o desenvolvimento de uma nova droga contra o câncer.

EFEITO ANTIANGIOGÊNICO

Kogan (2006) descreveu o potente efeito do HU-331 (derivado quinona do canabidiol) na atividade antiangiogênica. Os achados *in vitro* deste estudo, utilizando as células endoteliais da aorta bovina (BAECs) e as células endoteliais vasculares da veia umbilical humana (HUVECs), mostraram que o HU-331 (4.8 μM) inibiu a proliferação celular de forma mais acentuada quando comparado aos canabinóides CBD, delta-8-THC, HU-210. Além disso, foi mais potente que os outros derivados quinonóides, como o HU-336 (delta-8-THC-quinona) e o HU-335 (canabinol-quinona) (todos com concentrações de 0.6-300 μM) (Kogan et al., 2006). Vale salientar que a inibição do crescimento de várias linhas de células tumorais HU-311 foi em decorrência de necrose (Kogan et al., 2007a), enquanto que o efeito antiproliferativo endotelial foi por mecanismo apoptótico (Kogan et al., 2006).

Os achados *ex vivo* deste estudo mostraram que o HU-331 apresentou efeito inibidor da angiogênese nos anéis de aorta de ratos em concentrações nanomolares (300 nM) (Kogan et al., 2006), sendo estas concentrações significativamente inferiores às necessárias para os seus efeitos na maioria das linhas de células tumorais humanas (Kogan et al., 2004).

Finalmente, os achados *in vivo*, em tumores de ratos marcados com células HT29 do carcinoma de cólon, mostraram que o HU-331 reduziu de forma significativa a densidade vascular, quando avaliada por métodos de imunoensaio do CD31. Neste sentido, o HU-331 diminuiu não apenas a angiogênese basal, mas também a tumoral. Finalmente, outro agente antitumoral quinona, a doxorubicina, não afetou significativamente a vascularização do tumor, sugerindo que a ação antiangiogênica do HU-331 é estruturalmente específica (Kogan et al., 2006).

Embora extremamente significativa, a ação antiangiogênica do HU-331, difere dos efeitos antiangiogênicos dos agonistas dos receptores canabinóides. Estes atuam de forma indireta, inibindo as citocinas e conseqüentemente a estimulação de seus respectivos receptores (como o VEGF e VEGFR) que estão envolvidos no controle da angiogênese (Portella et al., 2003; Blázquez et al., 2004). Já o HU-331 e os outros derivados quinonóides tiveram efeitos antiangiogênicos nos ensaios do anel da aorta *ex vivo*, onde fatores de crescimento pró-angiogênicos (VEGF e FGF) foram adicionados (administração exógena) ao meio de cultura. Sendo assim é provável que o efeito do HU-331 seja mediado pela sua ação direta nas células endoteliais. De fato, o HU-331 altera a expressão de vários genes envolvidos nas funções celulares precoces das células endoteliais vasculares. Em experimento com duração de 12 h nas células HUVECs, o HU-331 aumentou a expressão de mRNA da MMP-1, COX-2 e osteoprotegerina, enquanto que diminuiu a expressão de mRNA do monócito quimiotático proteína-1, fator Von Willebrand factor (VWF) e fosfolipase A2 (Kogan et al., 2006). Por outro lado, o HU-331 não afetou significativamente as citocinas pró e anti-angiogênicas nem a expressão de várias proteínas de adesão celular endotelial vascular (Kogan et al., 2006). Estes achados sugerem que o HU-331

inibe a angiogênese pela indução direta de apoptose das células endotéliais vasculares antes mesmo da expressão das citocinas pró/angiogênicas e de seus receptores (Kogan et al., 2006).

Por fim, o fato do HU-331 ter propriedades antitumorais (Kogan et al., 2004), antiangiogênicas (Kogan et al., 2006) e maior seletividade na ação antitumoral em relação à doxorubicina (Kogan et al., 2007b), torna-o uma nova droga potencial no tratamento do câncer. Para tanto, são necessários estudos adicionais a fim de se traçar com maiores detalhes o perfil farmacodinâmico desta droga.

EFEITO ANTIMIGRATÓRIO

Joseph (2004) avaliou o efeito antimigratório da AEA nas células tumorais SW480 e constatou que a mesma, por si só, não teve efeito na migração destas células. Resultado similar foi encontrado por Kishimoto (2003) nas células leucêmicas. No entanto, a AEA (40 nM) e o HU-210 inibiu totalmente a migração das células SW480, quando a migração das mesmas foram induzidas pela norepinefrina. Vale ressaltar que este efeito foi mediado pelo receptor CB1 (Joseph et al., 2004).

Sabe-se que a noradrenalina é um potente indutor de migração de células tumorais (Drell et al., 2003). Em contraste, o GABA, principal neurotransmissor inibitório do cérebro, inibe a atividade migratória induzida pela norepinefrina nas células de carcinoma de mama (Drell et al., 2003) e cólon (Joseph et al., 2002). Este efeito GABAérgico parece ser mediado pelos receptores GABAB, um receptor metabotrópico acoplado a proteína G inibitórias - Gi (Joseph et al., 2004) que, quando ativado, inibe a atividade da adenilciclase (Joseph et al., 2002).

Portanto, é possível que a AEA iniba a migração celular através de mecanismos intracelulares similares àqueles vistos pelo GABA (Joseph et al., 2004). Finalmente, o fato dos efeitos inibitórios da AEA nestas células tumorais serem mediados pelo receptor canabinóide CB1, faz com que os agonistas destes

receptores sejam considerados um alvo terapêutico potencial de ação antimetastática neste modelo tumoral.

CANABINÓIDES, IMUNIDADE E EFEITO BIFÁSICO

Alguns estudos desta revisão (Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001; Blázquez et al., 2003; Blázquez et al., 2004; Carracedo et al., 2006b; Cianchi et al., 2008; Oesch et al., 2009) utilizaram ratos imunodeficientes, que apresentam deficiência de células maduras T e B, para avaliar o efeito da imunidade na ação antitumoral dos canabinóides. Sabe-se que, sob certas circunstâncias, os canabinóides agem como imunossupressores, em decorrência da estimulação de receptores CB2 em células e órgãos imunológicos. Esta ação poderia inibir a imunidade antitumoral (Sánchez et al., 2001).

Zhu (2000) reportou que a injeção de THC durante 4 a 6 semanas em ratos imuno-competentes acelerou o crescimento dos implantes tumorais em dois diferentes modelos de câncer de pulmão em camundongos murino. Esta ação foi em decorrência da estimulação de receptores CB2, que por sua vez inibiu a capacidade dos antígenos presentes nas células tumorais e os das células T para gerar aloreatividade.

No entanto, nos estudos incluídos nesta revisão, não houve influência da imunidade antitumoral do hospedeiro nos experimentos *in vivo*. É possível que esta inibição imunogênica não tenha sido suficiente para minimizar o efeito antitumoral dos canabinóides. Sánchez (2001a), por exemplo, mostrou que o crescimento dos tumores de ratos imunodeficientes com gliomas marcados (inoculação de células C6) foram significativamente menores nos ratos que tiveram injeção intratumoral de JWH-133 (50 µg/dia) que nos ratos do grupo controle. Resultados similares foram encontrados com doses equivalentes de WIN 55,212-2. Adicionalmente, o JWH-133 bloqueou totalmente a proliferação dos tumores em ratos imunodeficientes marcados com células do astrocitoma humano grau IV, efeito este mediado pelo receptor canabinóide CB2 (Sánchez et al., 2001a). Finalmente, Oesch (2009), mostrou que a administração peritumoral do HU-210 (0.2 mg/kg) diminuiu significativamente o crescimento dos tumores de ratos imunodeficientes marcados com células Rh4 (Rabdomiossarcoma) em relação ao controle.

Em decorrência desta divergência de resultados, é possível que os canabinóides exerçam um efeito dual no crescimento tumoral, podendo apresentar tanto ação antiproliferativa direta (Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001; Blázquez et al., 2003; Massi et al., 2004; McAllister et al., 2005), como também, de forma indireta, aumentar o crescimento tumoral através da inibição da imunogenicidade (Zhu, 2000).

Dois mecanismos que levam à estimulação do crescimento celular pelos canabinóides foram descritos. O primeiro, dependente dos receptores CB1 e CB2, envolve a estimulação direta da sinalização PKC-P13K-ERK e a subsequente supra-regulação dos receptores do androgênio e do fator de crescimento do nervo (NGF) (Velasco et al., 2001; Sánchez et al., 2003b). Em relação ao receptor androgênico, no entanto, foi verificado que o delta-9-THC apresentou efeito antiproliferativo nas células MCF-7 bem como nas células MCF7-AR1 (células tumorais de mama com transferência de receptor androgênico) (Von Bueren et al., 2008). Neste estudo, estas células tinham efeito proliferativo induzido pelo β -estradiol (Von Bueren et al., 2008) e foi descrito que o delta-9-THC não apresentou efeito estrogênico nem androgênico neste modelo tumoral (Von Bueren et al., 2008). Já o segundo mecanismo sugere que o efeito mitogênico dos canabinóides pode estar relacionado com a transativação do EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial) e a consequente alteração na expressão do fator de necrose tumoral pela transativação. Este processo parece ser catalizado pela enzima alfa conversora, TACE/ADAM17, levando a estimulação da ERK (Hart et al., 2004). No entanto, este mecanismo não foi verificado em um estudo subsequente, Preet (2008). Naquele estudo, foi descrito que o delta-9-THC não modulou a expressão ou a fosforilação do EGFR nas células do adenocarcinoma de pulmão (não de pequenas células) (Preet et al., 2008).

Fatores como a via de administração (local vs sistêmico), tempo de exposição à droga (período curto vs período prolongado), e a capacidade intrínseca das células tumorais para responder ao canabinóide (ex., presença ou ausência de receptores canabinóides) devem determinar o balanço entre a progressão e a regressão do tumor (Sánchez et al., 2001a).

SELETIVIDADE DOS CANABINÓIDES NA AÇÃO ANTITUMORAL

A maioria dos estudos incluídos mostrou que os canabinóides são capazes de matar as células tumorais de forma seletiva (Sánchez et al., 1998; Galanti et al., 2008; Ellert-Miklaszewska et al., 2005; Duntsch et al., 2006, Carracedo et al., 2006a; Ligresti et al., 2006; Sarnataro et al., 2006; Sarfaraz et al., 2005; Gustafsson et al., 2006; De Morrow et al., 2008). Em contraste ao seu efeito pró-apoptótico e antitumoral nos vários tipos tumorais, os canabinóides protegem as células normais da apoptose (Velasco et al., 2004).

Nesta revisão, apenas quatro estudos descreveram efeitos não seletivos da ação canabinóide (Baek et al., 1998; Powles et al., 2005; Widmer et al., 2008; Lee et al., 2008). No entanto, os resultados obtidos por Widmer (efeito do delta-9-THC nas células U373MG) divergiu daqueles encontrados por Salazar (2009), que mostrou que o delta-9-THC induziu apoptose nestas células de forma seletiva.

Em relação aos mecanismos de sobrevivência celular, temos que a sinalização PI3K/AKT (Velasco et al., 2004; Sarfaraz et al., 2006) é um evento que acontece de forma similar nas células, para que ocorra a estimulação do fator de crescimento e conseqüentemente a sobrevivência celular (Atwal et al., 2000; Schlessinger, 2000; Brunet et al., 2001). Por outro lado, a ERK 1/2 tem um comportamento dual e está envolvida tanto na proliferação celular como no sequestro do ciclo celular (Sarfaraz et al., 2006). O fator determinante do efeito da ativação da ERK 1/2 sobre a morte ou proliferação celular é extremamente complexo. No entanto, sabe-se que a duração do estímulo indutor desta sinalização é crucial na determinação dos efeitos desta cascata (Sarfaraz et al., 2006).

Os canabinóides são capazes de aumentar a ceramida e conseqüentemente produzir apoptose na maioria das células do glioma (Sánchez et al., 1998a; Galve-Roperh et al., 2000; Sánchez et al., 2001a; Recht et al., 2001; Gómez del Pulgar et al., 2002a, Carracedo et al., 2006a), bem como em muitas outras células tumorais, como pâncreas (Carracedo et al., 2006b), fígado (DeMorrow et al., 2007) e colo-retal (Cianchi et al., 2008). No entanto, em

experimentos com células cerebrais, os canabinóides diminuem a ceramida e atenuam os processos de apoptose em astrócitos normais (Gómez del Pulgar et al., 2002b). É possível que este comportamento paradoxal nas células da glia seja decorrente de diferentes capacidades entre as células tumorais e não-tumorais para sintetizar ceramida em resposta aos canabinóides (Velasco et al., 2004). Assim, a ativação do receptor canabinóide nas células do glioma aumenta a síntese da ceramida *de novo* e ativa o processo de apoptose, enquanto em astrócitos normais a síntese da ceramida *de novo* não afeta o processo de apoptose, a despeito da presença de receptores canabinóides funcionais nestas células (Guzmán et al., 2001b; Guzmán, 2003). Neste sentido, os canabinóides podem inibir a Akt via ceramida em células do glioma (Gómez de Pulgar et al., 2002a), enquanto que em astrócitos primários eles ativam a Akt e contrapõem a inibição de Akt induzida pela ceramida (Gómez del Pulgar et al., 2002b). Desta forma, respostas opostas aos canabinóides das células transformadas da glia e das normais podem se basear em características diferenciais dos seus respectivos mecanismos intracelulares e/ou diferenças na funcionalidade dos seus receptores canabinóides (Velasco et al., 2004).

CANABINÓIDES E EFEITOS COLATERAIS

A ativação do receptor CB1 pelos canabinóides é o principal fator responsável pelos efeitos colaterais conhecidos destas substâncias. No entanto, em algumas situações clínicas como a de pacientes com câncer que se submetem a quimioterapia, possíveis efeitos colaterais podem ser considerados toleráveis pelos pacientes.

Estudo conduzido por Guzmán (2006), utilizando delta-9-THC em pacientes com GBM recorrente, mostrou que a administração intratumoral de THC foi segura e não promoveu efeitos colaterais significativos. No entanto, o delta-9-THC não é o agonista canabinóide mais apropriado para futuras estratégias antitumorais, devido a sua alta hidrofobicidade e pela psicoatividade mediada pelo CB1 (Guzmán et al., 2006). Outros agonistas canabinóides, como o WIN 55,212-2 (agonista misto CB1/CB2) (Galve-Roperh et al., 2000), que é menos hidrofóbico, e o JWH-133 (potente agonista seletivo CB2), embora exerçam ação antitumoral em modelos animais, ainda possuem limitações farmacocinéticas e farmacodinâmicas em relação ao delta-9-THC. Neste sentido, embora extremamente interessantes, existe um longo caminho quanto às aplicações clínicas destes outros canabinóides, em decorrência da falta de estudos toxicológicos pré-clínicos (Guzmán et al., 2006).

Vários canabinóides livres de psicoatividade são potencialmente úteis como agentes antitumorais nos gliomas, incluindo o ácido ajulêmico (Recht et al., 2001), o canabidiol (Massi et al., 2004; 2006; 2008; Vaccani et al., 2005) e o JWH-133 (Sánchez et al., 2001a; Blázquez et al., 2003; 2004). Ainda, embora alguns compostos tenham ação psicoativa em doses maiores, como por exemplo o WIN 55,212-2, em decorrência de sua alta eficácia tumoral, são necessárias pequenas doses, que neste caso, são ausentes de efeitos psicoativos. De fato, o WIN 55,212-2 apresentou efeito antitumoral em uma concentração similar a 10% daquela necessária de delta-9-THC (Galve-Roperh et al., 2000).

Muitos experimentos verificaram que os canabinóides que atuam nos receptores CB2 estão livres de psicoatividade. Em relação aos gliomas, ressalta-

se que não são todos os glioblastomas multiformes humanos e linhas de células do glioma que expressam receptores CB2 funcionais (Sánchez et al., 2001a; Cudaback et al., 2003). No entanto, em vários outros tipos tumorais o receptor CB2 além de estar presente, é crucial para a ação antiproliferativa dos canabinóides, como por exemplo, as células PC-3 da próstata pelo JWH-015 (Olea-Herrero et al., 2009a) e as células colo-retais HT29 e DLD-1 pelo CB13 (Cianchi et al., 2008). Os receptores CB2 também mediaram os efeitos antitumorais do CBD nas células tumorais de mama MDA-MB-231 e MDA-MB-436 (McAllister et al., 2007).

Vale ressaltar, que algumas células tumorais, como as células linfoblásticas de Jurkat, expressam essencialmente os receptores CB2. Este fato fornece subsídios científicos para o uso de agonistas específicos de receptores CB2 no tratamento das malignidades do sistema imunológico.

Os dados desta revisão sugerem que tanto o CBD quanto o delta-9-THC podem levar à indução de apoptose nas células leucêmicas. No entanto, os mesmos diferem quanto aos seus mecanismos de ação. Sendo assim, o tratamento combinado de delta-9-THC e CBD poderia aumentar significativamente a eficácia na morte de células tumorais. Embora não existam evidências significativas da eficácia desta associação no tratamento de leucemias e linfomas, relatos preliminares mostraram que a combinação destes fitocannabinóides foi mais bem tolerada que o uso isolado do delta-9-THC (Russo, 2006a). Esta abordagem permitiria o uso de doses maiores de delta-9-THC sem os efeitos colaterais psicoativos indesejados. De fato, foi mostrado que o CBD pode antagonizar as ações psicoativas do delta-9-THC, em decorrência da inibição de sua metabolização a um metabólito ainda mais psicoativo, o 11-hidroxi-THC (Bornheim & Grillo, 1998). Conforme descrito anteriormente, o uso isolado de CBD apresenta um potente efeito antitumoral nas leucemias (McKallip et al., 2006) bem como em outras células tumorais. No entanto, deve ser considerado o fato que os agonistas CB2 podem prejudicar a imunidade antitumoral (Zhu et al., 2000).

Outra estratégia potencial para o tratamento das neoplasias seria aumentar as concentrações do canabinóide AEA. Em alguns tipos de tumores, o uso de

substâncias capazes de aumentar o nível de AEA endógena tem mostrado resultados promissores. Esta estratégia é possível com drogas que inibem a recaptura (Mimeaut et al., 2003; Macarrone et al., 2000; Bifulco et al., 2004; Ligresti et al., 2003) ou então a degradação intracelular (Melck et al., 1999; Nithipatikom et al., 2004; Bifulco et al., 2004; Patsos et al., 2005a) da AEA. Adicionalmente, o uso destas substâncias seria particularmente útil em tecidos tumorais que superexpressam a AEA, o 2-AG ou ambos (Ligresti et al., 2003). Estes recursos poderiam ser utilizados, uma vez que possuem atividade potencializadora, concomitantemente ao uso de agentes antitumorais que se mostrarem efetivos nestes tumores, incluindo canabinóides e também os quimioterápicos clássicos.

Outros tipos de células tumorais especialmente sensíveis à ação da AEA seriam aquelas que superexpressam a COX-2, haja visto que nestas células os efeitos antiproliferativos da AEA são mediados pelo catabolismo da COX-2 em prostaglandinas (Hinz et al., 2004a; Eichele et al., 2009; Patsos et al., 2005a; Van Dross, 2009). Nestes tumores, o uso de inibidores da captação intracelular e da degradação da AEA também apresentaria efeitos potencializadores à AEA. Esses mesmos efeitos também foram verificados em tumores de mama, pela OEA (Bisogno et al., 1998) e pelo PEA (Bisogno et al., 1998; Di Marzo et al., 2001).

Altas concentrações de AEA também podem ser adquiridas teoricamente para propósitos terapêuticos nas neoplasias, embora este endocanabinóide não seja a escolha mais apropriada pela via exógena, considerando a sua meia-vida curta (Contassot et al., 2004a). Pesquisas farmacológicas com análogos estáveis da AEA estão em andamento, com o intuito de desenvolver drogas sintéticas com maior estabilidade para uso clínico em concentrações mais baixas. Dois análogos estáveis da AEA, a metanandamida e a Met-F-AEA, tem mostrado evidências antitumorais em vários tipos de câncer. A metanandamida mostrou-se efetiva, por exemplo, em tumores de próstata (Olea-Herrero et al., 2009), cérvix uterino (Ramer and Hinz, 2008; Eichele et al., 2009), pulmão (Ramer and Hinz, 2008; Eichele et al., 2009) e linfomas (Gustafsson et al., 2008). A Met-F-AEA, por sua vez, foi intensamente estudada em tumores da tireóide (Bifulco et al., 2001;

Portella et al., 2003; Bifulco et al., 2004; Pisanti et al., 2007), mostrando efeitos antiproliferativos, antiangiogênicos e antimetastáticos. Também mostrou efeitos antiproliferativos e antimetastáticos nos tumores de mama (Grimaldi et al., 2006; Laezza et al., 2006; Laezza et al., 2008).

Por fim, o uso concomitante de ceramida aos canabinóides também poderia ser uma estratégia interessante em alguns tipos de tumores, afim de maximizar a eficácia e minimizar os efeitos colaterais de alguns canabinóides. Isto porque a ceramida apresentou atividade semelhante aos canabinóides em alguns modelos tumorais (Galve-Roperh et al., 2000; Gómez Del Pulgar et al., 2002a; Gustafsson et al., 2009a). Vale ressaltar que a associação com ceramida já é utilizada em alguns tratamentos com quimioterápicos convencionais (Morales et al., 2007; Schenck et al., 2007).

A síntese desta revisão mostrou que os canabinóides exerceram atividades antimetastáticas e antiangiogênicas significantes em alguns tipos tumorais, muitas das vezes em doses inferiores (eventualmente nanomolares) àquelas necessárias para a indução de efeitos antiproliferativos. Desta forma, os canabinóides poderiam ser usados terapeuticamente nestes desfechos possivelmente com toxicidade mínima. Neste sentido, eles podem ser considerados como uma excelente opção terapêutica, sobretudo pela escassez de recursos efetivos no tratamento de alguns cânceres pela medicina.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Os dados desta revisão limitam-se pela falta de estudos de eficácia *in vivo* (animais de laboratório) para alguns tipos de canabinóides em outros tipos de tumores. Adicionalmente, a falta de estudos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos *in vivo* impede que no momento possa ser apurada a possibilidade do uso destes compostos em seres humanos. Disto decorre a inexistência de estudos de eficácia em seres humanos com desenho metodologicamente adequado.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

- 1- os canabinóides exerceram seus efeitos antitumorais *in vitro* de forma seletiva na ampla maioria dos estudos, não atingindo as células normais usadas como controle; também houve segurança na administração dos mesmos *in vivo*; em seres humanos, o delta-9-THC, em particular, foi utilizado via intracraniana em pacientes com GBM, tendo havido segurança nesta administração.
- 2- em relação aos efeitos antitumorais propriamente ditos, o canabinóide delta-9-THC apresentou efeitos conforme relatados a seguir:
 - atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6.9, U373, U251, U87, U118, H4, SF126, SF188, SW1088, T98G, Gos3, GBM); neuroblastomas (NB2A, N18TG2); câncer de próstata (PC-3); câncer de mama (EVSA-t, SKBr3, MCF-7, T47-D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-436); câncer de cérvix uterino (HeLa S3); câncer de pulmão (A549, H460, SW1573); câncer de pele (B16, A375, MelJuso); câncer de pâncreas (MiaCaPa2, Panc1, Capan 2, BxPx3); tumores colorretais (SW480, HCT-15, HT29, HCA7); Rabdomiossarcoma (Rh4); leucemias (HL60, CEM, HEL-92, Jurkat, ML2, K562, EL-4, LSA, P815, Molt-4, Sup-T1).
 - evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: gliomas (C6.9, U87, GBM); pulmão (carcinoma Lewis de pulmão, A549, SW1573), pâncreas (MiaCaPa2); leucemias (EL-4).
 - atividade antiangiogênica *in vitro*, verificada nas células tumorais de pulmão (A549, SW1573).
 - evidência antiangiogênica *in vivo*, verificada em tumores de ratos tratados com células tumorais do glioma (C6) e em biópsias de pacientes com GBM tratados com delta-9-THC

- atividade inibitória da invasão celular tumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6.9, U87, SW1088, T98G, U118); mama (MDA-MB-231); cérvix uterino (HeLa, C33A); pulmão (A549, SW1573); observada também nas células vasculares endoteliais.
 - evidência inibitória da invasão celular tumoral *in vivo*, verificada em biópsias de tumores de ratos marcados com células C6.9 e em biópsias de pacientes com GBM tratados com delta-9-THC.
 - evidência inibitória dos nódulos de metástases *in vivo*, verificada em colônias tumorais pulmonares de ratos marcados com células tumorais de pulmão (A549).
- 3- o canabinóide 11-OH-delta-9-THC apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais do cérvix uterino (HeLa S3).
- 4- o canabinóide delta-8-THC apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:
- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6, U, 87); cérvix uterino (HeLa S3).
 - evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: gliomas (U87); pulmão (Lewis).
- 5- o canabinóide CBN apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:
- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais do cervix uterino (HeLa S3) e de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-436)
 - evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais de pulmão (Lewis).
- 6- o canabinóide CBG apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-436) e do carcinoma epitelial oral (CB).

7- o canabinóide CBD apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (U87, U373); câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB436); timoma (EL-4), carcinoma epitelial oral (CB); leucemias (HL60, Jurkat, EL-4, Molt-4).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: gliomas (U87); câncer de mama (MDA-MB-231); leucemias (EL-4); tireóide (KiMol).
- atividade inibitória da invasão celular tumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (U87); mama (MDA-MB-231).
- evidência antimetastática *in vivo*, verificada pela diminuição das metástases de pulmão decorrentes de tumor primário de mama (MDA-MB-231) e de tireóide (KiMol).

8- o canabinóide CBD-DMH apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células leucêmicas (HL60).

9- o canabinóide WIN 55,212-2 apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6.9, U87, U251, SF126, SF188); próstata (PC-3, LNCaP); mama (MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468); pele (PDV.C57, HaCa4); pele (B16, A375, MelJuso); fígado (HepG2); Sarcoma de Kaposi (KS-IMM); leucemias (Jurkat, Molt-4, Sup-T1, EL-4, LSA, P815); linfomas (Rec1, L144, L102, L718, L1547, L1676, JVM-2, Jeko); também observada nas HUVECs
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: gliomas (C6.9, GBM); mama (MDA-MB-231); pele (PDV.C57, B16); pâncreas (MiaCaPa2).
- atividade antiangiogênica *in vitro*, verificada nas células tumorais do glioma (C6).

- evidência antiangiogênica *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: pele (PDV.C57, B16) e gliomas (C6).
- atividade inibitória da migração celular tumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: próstata (PC-3, DU-145), mama (MDA-MB-231), cérvix uterino (SW756); observada também nas células vasculares endoteliais.
- evidência antimetastática *in vivo*, verificada pela diminuição das metástases de pulmão decorrentes de tumor primário de mama (MDA-MB-231); diminuição das metástases de fígado e pulmão decorrentes de tumor primário de pele (B16); diminuição das metástases em órgãos próximos e distantes ao pâncreas, decorrentes de tumor primário de pâncreas (MiaPaCa2).

10-o canabinóide JWH-133 apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: mama (MDA-MB-231, MDA-MB-468); pele (PDV.C57, HaCa4); leucemias (Jurkat).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: gliomas (C6, C6.9, GBM); mama (MDA-MB-231); pele (PDV.C57, B16); pâncreas (MiaCaPa2).
- atividade antiangiogênica *in vitro*, verificada nas células tumorais dos gliomas (C6, GBM).
- evidência antiangiogênica *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com as seguintes células tumorais: pele (PDV.C57, B16); gliomas (C6, GBM).
- atividade inibitória da migração celular tumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais do glioma (C6, GBM); observada também nas células da vasculatura endotelial.
- evidência inibitória da migração celular tumoral *in vivo*, verificada nas células tumorais dos gliomas (C6.9, GBM).

- evidência antimetastática *in vivo*, verificada pela diminuição das metástases de pulmão decorrentes dos seguintes tumores primários: mama (MDA-MB-231), pele (B16).

11- o canabinóide JWH-015 apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6); próstata (DU-145, PC-3, LNCaP); pâncreas (MiaCaPa2); leucemias (Jurkat, Molt-4).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais de próstata (PC-3).

12- o canabinóide HU-210 apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (U373), próstata (DU-145), mama (MCF-7, EFM-19, T47D); pulmão (H460), pele (PDV.C57, HaCa4); colo-retais (CaCo-2, DLD-1, HT29, HCT116); Rabdmiossarcoma (Rh4, Rh8), leucemias (Jurkat, Molt-4, Sup-T1, EL-4, LSA, P815).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do rabdmiossarcoma (Rh4).

13- o canabinol-quinona apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: linfoma (Raji); leucemia (Jurkat); glioblastoma (SNB-19); mama (MCF-7); próstata (DU-145); cólon (HT29); observada também nas BAECs e HUVECs.

14- o delta-8-THC-quinona apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: linfoma (Raji); leucemia (Jurkat); glioblastoma (SNB-19); mama (MCF-7); próstata (DU-145); cólon (HT29); observada também nas BAECs e HUVECs.

15- o canabinóide HU-331 (canabidiol-quinona) apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: linfoma (Raji); leucemia (Jurkat); glioblastoma (SNB-19); mama (MCF-7); próstata (DU-145); cólon (HT29); observada também nas BAECs e HUVECs.
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do cólon (HT29) e do linfoma B (Raji).
- atividade antiangiogênica *ex vivo*, verificada no anel aórtico de ratos.
- evidência antiangiogênica *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do cólon (HT29).

16- o canabinóide CP 55,940 apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: glioma (C6), feocromocitoma (PC-12), mama (MDA-MB-231, MDA-MB-436)

17- o canabinóide KM-233 apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais do glioma humano (U87, U373).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do glioma (U87).

18- o canabinóide AJA apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais dos gliomas (C6, U87).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do glioma (U87).

19- o ligante canabinóide ACEA apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais do pâncreas (MiaPaCa2) e colo-retais (DLD-1, HT29).

20- o ligante canabinóide CB13 apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais colo-retais (DLD-1, HT29, LoVo, HCT8, SW480, HCA7, HCT15).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais colo-retais (DLD-1).

21- O antagonista/agonista inverso do receptor CB1, rimonabando, apresentou efeitos antitumorais, conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: mama (MDA-MB-231, MCF-7, T47D); colo-retais (DLD-1, CaCo-2, SW620).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais de mama (MDA-MB-231).

22- o canabinóide AEA apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6, U87, U251, H4); neuroblastoma (CHP100), SH-SY5Y, LAN-5), feocromocitoma (PC-12), próstata (DU-145, PC-3, PNCaP); mama (MCF-7, EFM-19, T47D); cérvix uterino (HeLa, Caski, C299); pulmão (H460); pele (JWF2); origem hepática (HepG2, Mz-ChA-1, HuH-28, HuCC-T1, SG231); colo-retais (CaCo-2, DLD-1, HT29, HCA7/C29); osteossarcoma (MG63); carcinoma gástrico (HGC-27, MKN-28, MKN-74); leucemias (Jurkat, Molt-4, Sup-T1, EL-4, LSA, P815); linfomas (DAUKI, U937, Rec-1, L144, L102).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do colangiocarcinoma (Mz-ChA-1).

- atividade antiangiogênica *in vitro*, verificada nas células tumorais do glioma (C6).
- evidência evidência antiangiogênica *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais do colangiocarcinoma (Mz-ChA-1) e do glioma (C6).
- atividade inibitória da invasão celular tumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais dos gliomas (C6.9, U87, U118, SW1088, T98G).

23- o canabinóide arvanil (análogo AEA) apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais da tireóide (KiMol) e leucêmicas (Jurkat).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais da tireóide (KiMol).

24- o canabinóide meAEA apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6, H4); próstata (DU-145, PC-3, LNCaP); mama (MCF-7, EFM-19, T47D); cérvix uterino (HeLa, C33A); pulmão (A549); linfomas (L718, L1547, L1676, Rec-1, Jeko, Jwm-2, MEC1, MEC2).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais dos linfomas (Jeko-1).
- atividade inibitória da invasão celular tumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: próstata (PC-3, DU-145); cérvix uterino (HeLa, C33A); pulmão (A549).

25- o canabinóide Met-F-AEA apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: mama (MDA-MB-231, TSA-E1, T47D); tireóide (KiMol, TK-6, MPTK-6); rabdomiossarcoma (Rh4).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais da tireóide (KiMol).
- atividade antiangiogênica *in vitro*, verificada nas células tumorais de tireóide (KiMol, TK-6, MPTK-6) e nas células endoteliais (PAE e HUVECs).
- evidência antiangiogênica *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais da tireóide (KiMol).
- atividade inibitória da migração celular tumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais de mama (MDA-MB-231, TSA-E1).
- evidência antimetastática *in vivo*, verificada pela diminuição das metástases de pulmão decorrentes dos seguintes tumores primários: mama (TSA-1); tireóide (3LL).

26- o canabinóide 2-AG apresentou efeitos antitumorais conforme relatados a seguir:

- atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas seguintes células tumorais: gliomas (C6); próstata (DU-145); mama (MCF-7, EFM-19, T47D); tireóide (KiMol), colo-retais (CaCo-2, DLD-1).
- evidência antitumoral *in vivo*, verificada em tumores de ratos marcados com células tumorais da tireóide (KiMol).
- atividade inibitória da migração celular tumoral *in vitro*, verificada em células tumorais do cérvix uterino (SW756).

27- o canabinóide 2-AG endógeno (e não exógeno) apresentou atividade inibitória da invasão celular tumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais de próstata (PC-3, DU-145).

- 28- a noladina éter (análogo 2-AG) apresentou atividade inibitória da invasão celular tumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais de próstata (PC-3, DU-145).
- 29- o canabinóide SEA apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais do glioma (C6).
- 30- o canabinóide PEA apresentou atividade antitumoral *in vitro*, verificada nas células tumorais de pele (JWF2).

IMPLICAÇÕES PARA A PESQUISA

7- IMPLICAÇÕES PARA A PESQUISA

Os dados deste estudo fornecem subsídios encorajadores para que se realizem pesquisas sobre os perfis farmacodinâmicos e toxicológicos de vários canabinóides avaliados nesta revisão, pois estes novos dados abririam a possibilidade para que os mesmos possam ser testados em seres humanos para a avaliação dos seus efeitos antitumorais.

No entanto, ensaios clínicos randomizados com o delta-9-THC em associação com os quimioterápicos convencionais já poderiam ser realizados para a avaliação de eficácia do mesmo. O delta-9-THC foi amplamente estudado em vários estudos pré-clínicos e demonstrou evidência antitumoral *in vivo* em vários modelos de tumores. Adicionalmente, o uso deste canabinóide em humanos já foi liberado pelo FDA para uso como antiemético em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia, bem como para uso estimulante de apetite em pacientes anoréticos com AIDS. Segurança na administração via intratumoral do mesmo também foi relatada em pacientes com GBM. Guzmán (2006), que realizou o único estudo piloto em pacientes com GBM recorrente, considerou, em seu estudo, que o próximo passo para a avaliação do delta-9-THC em humanos poderia ser em pacientes com GBM recentemente diagnosticados e virgens de tratamento. No entanto, seria mais prudente e ético realizar estudos com este canabinóide em associação a outros quimioterápicos, pois o seu estudo não forneceu evidências de eficácia antitumoral nos pacientes avaliados. Novas vias de administração além da intratumoral, no caso dos gliomas, também deveriam ser avaliadas, bem como a associação a outros canabinóides, como o canabidiol.

O canabidiol, no caso, também poderia ser pesquisado em ensaios clínicos randomizados em associação com quimioterápicos, pois mostrou-se eficaz na terapêutica antitumoral em vários modelos de tumor *in vivo*. Além do mais, tem demonstrado segurança em diversos ensaios clínicos em humanos na avaliação de outros desfechos. Adicionalmente, tem aprovação para uso medicinal em humanos em associação ao delta-9-THC, na proporção 1:1 (Sativex), para alívio

dos sintomas de náusea e vômitos em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia.

O nabilone, por sua vez, também é um canabinóide liberado pelo FDA para uso como antiemético em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. Estudos *in vitro* e *in vivo* deveriam ser realizados para avaliação de seus efeitos antitumorais.

O HU-331, de forma interessante, mostrou atividade antitumoral em várias linhas de células tumorais e foi mais eficaz que a doxorubicina em tumores coloreticais *in vivo*. Além disso, diferente deste quimioterápico, não apresentou efeito cardiotoxíco e mielotóxico nos ratos avaliados. Pesquisas farmacodinâmicas devem ser realizadas para que este canabinóide, promissor na terapêutica antitumoral, venha a ser testado em seres humanos.

IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA

8- IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA

Existe a possibilidade de uso de canabinóides como um recurso terapêutico antitumoral, de forma isolada ou em associação com quimioterápicos convencionais. No entanto, ensaios clínicos envolvendo estes agentes, em particular o delta-9-THC e o CBD, devem ser realizados para a adequada avaliação da eficácia antitumoral dos mesmos em humanos. No caso de outros canabinóides, fazem-se necessárias pesquisas toxicológicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas prévias para que os mesmos possam vir a ser futuramente testados e avaliados quanto à sua eficácia em seres humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams IB, Ryan W, Singer M, Thomas BF, Compton DR, Razdan RK, Martin BR. Evaluation of cannabinoid receptor binding and *in vivo* activities for anandamide analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:1172-1181.

Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* 1996;91:1585-1614.

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 2001;15:2177-96.

Adjallé R, Plouin PF, Pacak K, Lehnert H. Treatment of malignant pheochromocytoma. *Horm Metab Res* 2009;41(9):687-96.

Aguado T, Palazuelos J, Monory K, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells. *The Journal of Neuroscience* 2006;26(5):1551-1561.

Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, et al. Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:219-225.

Alpini G, Prall RT, LaRusso NF. *The Liver: Biology and Pathology*. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia 2001;421-435.

Ambs S, Merriam WC, Bennett WP, Felley-Bosco E, Ogunfusika MO, Oser SM, Klein S, Shields PG, Billiar TR, Harris CC. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. *Cancer Res* 1998;58:334-341.

Arancia G, Donelli G. *Pharmacol Res* 1991;24:205-217.

Are C, Shaba AR. Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Am Surg Oncol* 2006;13:453-464.

Armstrong CJ, *World databases in medicine*. London, UK: Bowker-Saur; 1993.

Atallah D, Marsaud V, Radanyi C, Kornprobst M, Rouzier R, Elias D, Renoir JM. *Int J Hyperthermia* 2004;20:405-419.

Athanasiou A, Clarke AB, Turner AE, Kumaran NM, Vakilpour S, Smith PA, Bagiokou D, Bradshaw TD, Westwell AD, Fang L, Lobo DN, Constantinescu Cs, Calabrese V, Loesch A, Alexander SP, Clothier RH, Kendall DA, Bates TE. Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364:131-137.

Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR. The TrkB-Shc Site Signals Neuronal Survival and Local Axon Growth via MEK and PI3-Kinase. *Neuron* 2000;27(2):265-277.

Baek SH, Kim YO, Swag JS, Choi KE, Jung WY, Han DS. Boron Trifluoride Etherate on Silica-A Modified Lewis Acid Reagent (VII). Antitumor Activity fo Cannabigerol Against Human Oral Epitheloid Carcinoma Cells. *Arch Pharm Res* 1998;21(3):353-356.

Bahnson R. Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2007;178:1148.

Bharti AC, Shukla S, Mahata S, Hedau S, Das BC. Anti-human papillomavirus therapeutics: facts % future. *Indian J Med Res* 2009;130(3):296-310.

Bari M, Battista N, Fezza G, Finazzi-Agrò A, Macarrone M. Lipid Rafts Control Signaling of Type-1 Cannabinoid Receptors in Neuronal Cells. Implications for Anandamide-Induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280(13):12212-12220.

Bari M, Spagnuolo P, Fezza F, Oddi S, Pasquariello N, Finnazi-Agrò A, Macarrone M. Effect of Lipid Rafts on Cb2 Receptor Signalling and 2-Arachidonoyl-Glycerol Metabolism in Human Immune Cells. *J Immunol* 2006a;177:4971-4980.

Bari M, Battista N, Fezza F, Gasperi V, Macarrone M. New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem* 2006b;6(3):257-68.

Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6910-24.

Bartek J, Lukas J. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 2001;490:117-122.

Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. More stories on Th17 cells. *Cell Res* 2009;19:399-411.

Basu GD, Pathangery LB, Tinger TL, Gendler SJ, Makherjee P. Mechanisms underlying the growth inhibitory effects of the cyclo-oxygenase-2 inhibitor celecoxib in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7:R422-R435.

Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, et al. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001;7:827-832.

Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A, Testa JR. Activation of AKT kinases in câncer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 2005;94:29-86.

Belletti B, Ferraro P, Arra C, Baldassarre G, Bruni P, Staibano S, De Rosa F, Salvatore G, Fusco A, Persico MG, et al. Modulation of *in vivo* growth of thyroid tumor-derived cell lines by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene. *Oncogene* 1999;18:4860-4869.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997;277:1094-1097.

Ben-Shabat S, Hanus LO, Katzavian G, et al. New cannabidiol derivatives: synthesis, binding to cannabinoid receptor, and evaluation of their anti-inflammatory activity. *J Med Chem* 2006;49:1113-7.

Benowitz NL. Pheochromocytoma. *Adv Intern Med* 1990; 35: 195-220.

3. Hall AS, Ball SG. Phaeochromocytoma. *Neth J Med* 1993; 43(Suppl 1): S29-S38.

Bifulco M, Laezza C, Portella M, Vitale P, Orlando L, De Petrocellis L, Di Marzo V. Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene dependent tumor growth. *FASEB J* 2001;15(14):2745-2747.

Bifulco M, Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nat Med* 2002;8(6):547-550.

Bifulco M, Laezza C, Valenti M, Alessia L, Giuseppe P, Di Marzo V. A new strategy to block tumor growth by inhibiting endocannabinoid inactivation. *FASEB J* 2004;18(13):1606-8.

Bifulco M, Laezza C, Pisanti S & Gazerro P. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *British Journal of Pharmacology* 2006;148(2):123-135.

Bifulco M, Laezza C, Gazerro P, Pentimalli F. Endocannabinoids as emerging suppressors of angiogenesis and tumor invasion (review). *Oncol Rep* 2007;17(4): 813-6.

Bino T, Chari-Bitron A, Shahar A. Biochemical effects and morphological changes in rat liver mitochondria exposed to 1-tetrahydrocannabinol. *Biochim Biophys Acta* 1972;288:195-202.

Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J*. 1997;322:671-677.

Bisogno T, Katayama K, Melck D, Ueda N, De Petrocellis L, Yamamoto S, Di Marzo V. Biosynthesis and degradation of bioactive fatty acid amides in human breast cancer and rat pheochromocytoma cells. Implications for cell proliferation and differentiation. *Eur J Biochem* 1998;254:634-642.

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo B. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 2001a;134:845-852.

Bisogno T, Macarrone M, De Petrocellis L, Jarrahian A, Finazzi-Agrò, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 2001b;268:1982-1989.

Bisogno T, Ligresti A, Di Marzo V. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81(2):224-238.

Biswas KK, Sarker KP, Abeyama K, Kawahara K, Iino S, Ostubo Y, Saigo K, Izumi H, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Yamaji K, Endo R, Suzuki K, Imaizumi H, Maruyama I. Membrane Cholesterol but Not Putative Receptors Mediates Anandamide-Induced Hepatocyte Apoptosis. *Hepatology* 2003;38:1167-1177.

Blázquez C, Casanova L, Planas A, del Pulgar TG, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Aragonês J, Huffman JW, Jorcano JL & Guzmán M. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J* 2003;17(3):529-31.

Blázquez C, González-Feria L, Álvarez L, Haro A, Casanova ML & Guzmán M. Cannabinoids Inhibit the Vascular Endothelial Growth Factor pathway in Gliomas. *Cancer Research* 2004;64:5617-5623.

Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M, Guzmán M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J* 2006;20:E2199-E2208.

Blázquez C, Carracedo A, Salazar M, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M. Down-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in gliomas: a new marker of cannabinoid antitumoral activity? *Neuropharmacology* 2008a;54:235-243

Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M. Cannabinoids Inhibit Glioma Cell Invasion by Down-regulating Matrix Metalloproteinase-2 Expression. *Cancer Res* 2008b;68(6):1945-1952.

Blevins RD, Smith DP. Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on cultured HELA cell growth and development. *Growth* 1980;44:133-138.

Bolontrade MF, et. al. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis* 1998;19:2107-2113.

Bonnie RJ, Whitebread CH. *The Marijuana conviction: a history of marijuana prohibition in the United States*. University Press of Virginia. Charlot, Va: The Lindesmith Center, 1974.

Bornheim LM, Grillo MP. Characterization of cytochrome P450 3A inactivation by cannabidiol: possible involvement of cannabidiol-hydroxyquinone as a P450 inactivator. *Chem Res Toxicol* 1998;11:1209-1216.

Bosier B, Lambert DM, Hermans E. Reciprocal influences of CB1 cannabinoid receptor agonists on ERK and JNK signalling in N1E-115 cells. *FEBS Letters* 2008;582:3861-3867.

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-7.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995; 312:637-641.

Brandt S, Heller H, Schuster KD, Grote J. Tamoxifen induces suppression of cell viability and apoptosis in the human hepatoblastoma cell line HepG2 via down-regulation of telomerase activity. *Liver Int* 2004;24:46-54.

Breivogel CS, Selley DE, Childers SR. Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating [³⁵S]GTPγS binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. *J Biol Chem* 1998;273:16865-16873.

Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 2001;60:155-163.

Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. *Curr Opin Neurobiol* 2001;11(3):297-305.

Burns CP. *Cancer Investig* 1988;6:439-451.

Bussolino F, Mantovani A, Pérsico G. Molecular mechanism of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997;22:251-256.

Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev Mol Med* 2009;11:e3

Cai Y, Zhang T, Nawa T, Aso T, Tanaka M, Oshiro S, Ichijo H, Kitajima S. Homocysteine-responsive ATF3 gene expression in human vascular endothelial cells: activation of c-Jun NH2-terminal kinase and promoter responsive element. *Blood* 2000;96:2140-2148.

Caffarel MM, Sarrió D, Palacios J, Guzmán M, Sánchez C. Delta-9-Tetrahydrocannabinol Inhibits Cell Cycle Progression in Human Breast Cancer Cells through Cdc2 Regulation. *Cancer Res* 2006;66(13):6615-6621.

Caffarel MM, Moreno-Bueno G, Cerutti C, Palacios J, Guzmán M, Mechta-Grigoriou F, Sánchez C. JunD is involved in the antiproliferative effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on human breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27:5033-5044.

Calignano A, La Rana G, Giulfrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature (London)* 1998;394:277-281.

Carlini EA. The good and the bad effects of (-) trans-delta-tetrahydrocannabinol (delta-9-THC) on humans. *Toxicol* 2004;44:461-467.

Carlini EA, Cunha JM. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol* 1981;21:417S-427S.

Carlini EA, Leite JR, Tannhauser M, Berardi AC. Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol* 1973;25(8):664-5.

Carlini EA, Mechoulam R, Lander N. Anticonvulsant activity of four oxygenated cannabidiol derivatives. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1975;12(1):1-15.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-257.

Carracedo A, Geelen MJ, Diez M, Hanada K, Guzmán M, Velasco G. Ceramide sensitizes astrocytes to oxidative stress: protective role of cannabinoids. *Biochem J* 2004;380:435-440.

Carracedo A, Lorente m, Egia A, Blázquez C, Garcia S, Giroux V, Malicet C, Villuendas R, Gironella M, González-Feria L, Piris MA, Iovanna JL, Guzmán M, Velasco G. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 2006a;9:301-312.

Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G, Iovanna JI. Cannabinoids Induce Apoptosis of Pancreatic Tumor Cells via Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes. *Cancer Res* 2006b;66(13):6748-6755.

Carter GT, Ugalde V. Medical marijuana: emerging applications for the management of neurologic disorders. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2004;15(4):943-54.

Casanova ML, Larcher F, Casanova B, Murillas R, Fernández-Aceñero MJ, Villanueva C, Martínez-Palacio J, Ullrich A, Conti CJ, Jorcano JL. A critical role for *ras*-mediated, EGFR-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2002;62:3402-3407.

Casanova ML, Blázquez C, Martínez-Palacio J, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzmán M. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis *in vivo* by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest* 2003;111:43-50.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2002;9:1287-93.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004;23:2825-37.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997;389:816-824.

Cattaneo M, Fontanella E, Canton C, Delia D, Biunno I. SELIL affects human pancreatic cancer cell cycle and invasiveness through modulation on PTEN and genes related to cell-matrix interactions. *Neoplasia* 2005;7:1030-1038.

CBTRUS (2005). Statistical Report: Primary Brain Tumors in the United States, 1998-2002.

Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR. Hippocampal neurotoxicity of delta9-tetrahydrocannabinol. *J Neurosci* 1998;18:5322-5332.

Chan VY, Chan Mw, Leung WK, et al. Intestinal trefoil factor promotes invasion in non-tumorigenic Rat-2 fibroblast cell. *Regul Pept* 2005;127:87-94.

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 1998;281:1860-1863.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.

Chen CW, Lee ST, Wu WT, Fu WM, Ho FM, Lin WW. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol* 2003;140:1077-1087.

Chen P, Hu S, Yao J, Moore SA, Spector AA, Fang X. Induction of cyclooxygenase-2 by anandamide in cerebral microvascular endothelium. *Microvasc Res* 2005;69:28-35.

Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Schiavone N, Vannacci A, Nistri S, Sardi I, Baroni G, Marzocca C, Perna F, Mazzanti R, Bechi P, Masini E. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: correlation with tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2003;162:793-801.

Cianchi F, Papucci L, Schiavone N, Lulli M, Magnelli L, Vinci MC, Messerini L, Manera C, Ronconi E, Romagnani P, Donnini M, Perigli G, Trallori G, Tanganelli E, Cappaccioli S, Masini E. Cannabinoid Receptor Activation Induces Apoptosis through Tumor Necrosis Factor α – Mediated Ceramide De novo Synthesis in Colon Cancer Cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(23):7691-7700.

Chen YC, Shen SC, Tsai SH. Prostaglandin D(2) and J(2) induce apoptosis in human leukemia cells via activation of the caspase 3 cascade and production of reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2005;1743:291-304.

Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HRC. Novel functions of TIMPs in cell signalling. *Cancer Metastasis Reviews* 2006;25:99-113.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 2005a;115:813-824.

Chudnovsky Y, Adams AE, Robbins PB, Lin Q, Khavari PA. Use of human tissue to assess the oncogenic activity of melanoma-associated mutations. *Nat Genet* 2005b;37:745-749.

Clevenger CV, Sillman AL, Hanley-Hyde J, Pystowsky MB. Requirement for prolactin during cell cycle regulated gene expression in cloned T-lymphocytes. *Endocrinology* 1992;130:3216-3222.

Clevenger CV, Chanag WP, Ngo W, Pasha TL, Montore KT, Tomaszewski JE. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol* 1995;146:695-705.

Colin D M, Boschi-Pinto C, Lopez AD, Murray CJL (2001). Cancer incidence, mortality and survival by site for 14 regions of the world. Global Programme on Evidence for Health Policy Discussion Paper No. 13 (World Health Organization). <http://www.who.int/entity/healthinfo/paper13.pdf>.

Consroe P, Benedito MA, Leite JR, Carlini EA, Mechoulam R. Effects of cannabidiol on behavioral seizures caused by convulsant drugs or current in mice. *Eur J Pharmacol* 1982;83(3-4):293-8.

Contassot E, Wilmotte R, Tenan M, Belkouch MC, Schnüriger V, Tribolet N, Bourkhardt K, Dietrich PY. Arachidonylethanolamide Induces Apoptosis of Human Glioma Cells through Vanilloid Receptor-1. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2004a;63(9):956-963.

Contassot E, Tenan M, Schnüriger V, Pelte MF, Dietrich PY. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecologic Oncology* 2004b;93:182-188.

Costa B. On the pharmacological properties of Delta9-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem Biodivers* 2007;4(8):1664-77.

Costello JF, Berger MS, Huang H-JS, Cavenee WK. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 1996;56:2405-10.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;384:83-87.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V. Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 2006;139(4):1405-15.

Cucherat M. *Meta-analyse des essais therapeutiques*. Paris: Masson; 1997.

Cudaback E, Elias M, Rostomily R, Stella N. Cannabinoid CB2 receptors in malignant brain tumors. Program N° 751.20. Abstract Viewer / Itinerary Planner. Society for Neuroscience 2003.

Cudaback E, Stella N. Targeting Astrocytomas and Invading Immune Cells with Cannabinoids: A Promising Therapeutic Avenue. *Mol Neurobiol* 2007;36(1):36-44.

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R. Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 1980;21:175-185.

Curran NM, Griffin BD, O'Toole D, Brady KJ, Fitzgerald SN, Moynagh PN. The synthetic cannabinoid R(+)-WIN 55,212-2 inhibits the interleukin-1 signaling pathway in human astrocytes in a cannabinoid receptor-independent manner. *J Biol Chem* 2005;280(43):35797-35806.

Dai C, Celestino JC, Okada Y, Louis DN, Fuller GN, Holland EC. PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes *in vivo*. *Genes Dev* 2001;15:1913-1925.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949-54.

Davis ML, Ronesi J, Lovinger DM. A Predominant Role for Inhibition of the Adenylate Cyclase/Protein Kinase A Pathway in ERK Activation by Cannabinoid Receptor 1 in N1E-115 Neuroblastoma Cells. *J Biol Chem* 2003;278(49):48973-48980.

Davis GE, Senger DR. Endothelial extracellular matrix: Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res* 2005;97:1093-1107.

Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schror K. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by iloprost in human vascular smooth muscle cell. Role of transcription factor CREB and ICER. *Biochem Pharmacol* 2003;65:979-988.

Decaudin D. Mantle cell lymphoma: a biological and therapeutic paradigm. *Leuk Lymphoma* 2002;43:773-781.

DeFeo-Jones D, Barnett SF, Fu S, Hancock PJ, Haskell KM, Leander KR, et al. Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. *Mol Cancer Ther* 2005;4:271-279.

De Lago E, Gustafsson SB, Fernández-Ruiz J, Nilsson J, Jacobsson SOP, Fowler CJ. Acyl-based anandamide uptake inhibitors cause rapid toxicity to C6 glioma cells at pharmacologically relevant concentrations. *Journal of Neurochemistry* 2006;99:677-688.

DeMorrow S, Glaser S, Francis H, Venter J, Vaculin B, Vaculin S. Opposing Action of Endocannabinoids on Cholangiocarcinoma Growth. Recruitment of Fas and Fas Ligand to Lipid Rafts. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:13095-13113.

DeMorrow S, Francis H, Gaudio E, Venter J, Franchitto A, Kopriva S, Onori P, Mancinelli R, Frampton G, Coufal M, Mitchell B, Vaculin B, Alpini G. The endocannabinoid anandamide inhibits cholangiocarcinoma growth via activation of the noncanonical Wnt signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:G1150-G1158.

De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Pharmacology* 1998;95:8375-8380.

De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 2000;483:52-56.

De Petrocellis L, Bisogno T, Macarrone M, Davis JB, Finazzi-Agro A, Di Marzo V. The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem* 2001;276:12856-12863.

De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2002;16:297-302.

Del Giudice E, Rinaldi L, Passarotto M, Facchinetti F, D'Arrigo A, Guiotto A, Carbonare MD, Battistin L, Leon A. Cannabidiol, unlike synthetic cannabinoids, triggers activation of RBL-2H3 mast cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2007;81:1512-1522.

Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:411-417.

Denk A, Wirth T, Baumann B. NF- κ B transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:303-20.

Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 2005;24:2909-2915.

Desprez PY, Lin CQ, Thomasset N, Sympton CJ, Bissell MJ, Campisi J. A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1. *Mol Cell Biol* 1998;18:4577-88.

Derkinderen P, Toutant M, Burgaya F, Le Bert M, Siciliano JC, de Franciscis V, Gelman M, Girault JA. Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* 1996;273:1719-1722.

Derkinderen P, Enslin H & Girault JA. The ERK/MAP-kinases cascade in the nervous system. *NeuroReport* 1999;10:R24-R34.

Derkinderen P, Valjent E, Darcel F, Damier P, Girault JA. Cannabis and cannabinoids receptors: from pathophysiology to therapeutic options. *Rev Neurol* 2004;160(6-7):639-649.

Derocq J-M, Jbilo O, Bouaboula M, et al. Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. *J Biol Chem* 2000;275:15621-8.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews* 2006;25:9-34.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;258:1946-1949.

Dickason-Chesterfield AK, Kidd SR, Moore SA, Schaus JM, Liu B, Nomikos GG, Felder CC. Pharmacological characterization of endocannabinoid transport and fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26(4-6):407-23.

Di Marco A, Cassinelli G, Arcamone F. The Discovery of Daunorubicin. *Cancer Treat Rep* 1981;65(4):3-8.

Di Marzo V. Endocannabinoids and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochem Biophys Acta* 1998a;1392:153-175.

Di Marzo V, Bisogno T, Melck D, Ross R, Brockie H, Stevenson L, Pertwee B, De Petrocellis L. Interactions between synthetic vanilloids and the endogenous cannabinoid system. *FEBS Lett* 1998b;436:449-454.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide. *Nature* 1994;372:686-691.

Di Marzo V, Melck D, De Petrocellis L, Bisogno T. Cannabimimetic fatty acid derivatives in cancer and inflammation. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2000;61:43-61.

Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L. Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J* 2001;358:249-255.

Ding H, Han C, Zhun J, Chen CS, D'Ambrosio SM. Celecoxib derivatives induce apoptosis via the disruption of mitochondrial membrane potential and activation of caspase 9. *Int J Cancer* 2005;113:803-810.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10819-10824 (Erratum in 99, 13961)

Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* 2003;300:1574-1577.

Duntsch C, Divi MK, Jones T, Zhou Q, Krishnamurthy M, Boehm P, Wood G, Sills A & Moore II BM. Safety and efficacy of a novel cannabinoid chemotherapeutic, KM-233, for the treatment of high-grade glioma. *Journal of Neuro-Oncology* 2006;77:143-152.

Drell TL 4th, Joseph J, Lang K, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003;80:63-70.

Drysdale AJ, Ryan D, Pertwee RG, Platt B. Cannabidiol-induced intracellular calcium elevations in hippocampal cells. *Neuropharmacology* 2006;50:621-631.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12:2245-62.

Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003;3:859-868.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer* 2002;2:161-174.

Eichele K, Weinzierl U, Ramer R, Brune K, Hinz B. R(+)-Methanandamide Elicits a Cyclooxygenase-2-Dependent Mitochondrial Apoptosis Signalling Pathway in Human Neuroglioma Cells. *Pharmaceutical Research* 2006;23(1):90-94.

Eichele K, Ramer R, Hinz B. Decisive role of cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase in chemotherapeutics-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2008;27:3032-3044.

Eichele K, Ramer R, Hinz B. R(+)-Methanandamide-Induced Apoptosis of Human Cervical Carcinoma Cells Involves a Cyclooxygenase-2-Dependent Pathway. *Pharmaceutical Research* 2009;26:346-355.

Ek S, Hogerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CA. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. *Cancer Res* 2002;62:4398-4405.

Elder DJ, Baker JA, Banu NA, et al. Human colorectal adenomas demonstrate a size-dependent increase in epithelial cyclooxygenase-2 expression. *J Pathol* 2002;198:428-34.

Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L. Cannabinoids down-regulate P13K/Akt and Erk signaling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. *Cellular Signalling* 2005;17:25-37.

End DW, Thoursen K, Dewey WL & Carchman RA. A Comparative Study of the Disposition of (-)-delta9-Tetrahydrocannabinol in Neuroblastoma and Glioma Cells in Tissue Culture: Relation to Cellular Impairment. *Molecular Pharmacology* 1977;13:864-871.

Endsley MP, Aggarwal N, Isbell MA, Wheelock CE, Hammock BD, Falck JR, Campbell WR, Nithipatikom K. *Int J Cancer* 2007;121:984-991.

Engels FK, de Jong FA, Mathijssen RH, Erkens JA, Herings RM, Verweij J. Medicinal cannabis in oncology. *Eur J Cancer* 2007;43(18):2638-44.

Erlandsson N, Baumann B, Rössler OG, Kaufmann K, Giehl KM, Wirth T, Thiel G. Lack of correlation between NF- κ B activation and induction of programmed cell death in PC12 pheochromocytoma cells treated with 6-hydroxydopamine or the cannabinoid receptor 1-agonist CP55,940. *Biochem Pharmacol* 2002;64:487-495.

Esposito G, Izzo AA, Di Rosa M, Iuvone T. Selective cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase protein expression in C6 rat glioma cells. *Journal of Neurochemistry* 2001;78:835-841.

Esposito G, Ligresti A, Izzo AA, Bisogno T, Ruvot M, Di Rosa M, Di Marzo V, Iuvone T. The endocannabinoid system protects rat glioma cells against HIV-1 tat protein-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2002;277(52):50348-50354.

Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and MAP kinase and NF- κ B involvement. *Neurosci* 2006;399:91-95.

Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3376-80.

Faiçal S, Shiota D. Feocromocitoma: atualização diagnóstica e terapêutica. *Ver Assoc Med Bras* 1997;43(3):237-344.

Fankhauser, M. History of Cannabis in Western Medicine. In: Grotenhermen, F., Russo, E. – *Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*. 1^o ed., New York, p. 37-51, 2002.

Farooq A, Chaturvedi G, Mujtaba S, et al. Solution structure of ERK2 binding domain of MAPK phosphatase MKP-3: structural insights into MKP-3 activation by ERK2. *Mol Cell* 2001;7:387-399.

Felder C, Mitchell R. Comparison of the signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *ASPET* 1995;48:443-450.

Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:179-200.

Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:34-45.

Fernández-López D, Martínez-Orgado J, Nuñez E, et al. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 is an *in vitro* model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res* 2006;60:169-73.

Fernandez-Ruiz JJ, Munoz RM, Romero J, Villanua MA, Makriyannis A, Ramos J. Time course of the effects of different cannabimimetics on prolactin and gonadotrophin secretion: Evidence for the presence of CB₁ receptors in hypothalamic structures and their involvement in the effects of cannabimimetics. *Biochem Pharmacol* 1997;53:1919-1927.

Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JÁ, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2006;28(1):39-45.

Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon R, Ramos J, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:83-92.

Fernandez-Veledo S, Hernandez R, Teruel T, et al. Ceramide mediates TNF- α -induced insulin resistance on GLUT4 gene expression in Brown adipocytes. *Arch Physiol Biochem* 2006;112:13-22.

Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* 2005a;69(3):11-16.

Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005b;438:967-974.

Flygare J, Gustafsson K, Kimby E, Christensson B, Sander B. Cannabinoid receptor ligands mediate growth inhibition and cell death in mantle cell lymphoma. *FEBS Letters* 2005;579:6885-6889.

Frame MC. Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *Journal of Cell Science* 2004;420:629-635.

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

Fride E, Barg J, Levy R, et al. Low doses of anandamides inhibit pharmacological effects of delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:699-707.

Fogli S, Nieri P, Chicca A, Adinolfi B, Mariotti V, Iacopetti P, Breschi MC, Pellegrini S. Cannabinoid derivatives induce cell death in pancreatic MIA PaCa-2 cells via a receptor-independent mechanism. *BEBS Letters* 2006;580:1733-1739.

Fong S, Itahana Y, Sumida T, et al. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:13543-8.

Fong S, Debs RJ, Desprez PY. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med* 2004;10:387-92.

Fonseca FR, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol & Alcoholism* 2005;40(1):2-14.

Fowler CJ, Jonsson KO, Andersson A, Juntunen J, Järvinen T, Vandevoorde S, Lambert DM, Jerman JC, Smart D. Inhibition of C6 glioma cell proliferation by anandamide, 1-arachidonoylglycerol, and by a water soluble phosphate ester of anandamide: variability in response and involvement of arachidonic acid. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:757-767.

Fuh G, Wells JA. Prolactin Receptor Antagonists That Inhibit the Growth of Breast Cancer Cell Lines. *J Biol Chem* 1995;270:13133-13137.

Fulda S. The PI3K/AKT/mTOR pathway as therapeutic target in neuroblastoma. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(6):729-37.

Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, Matsuno S, Horii A. Potential tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in pancreatic cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1807-1815.

Fusco A, Pinto A, Tramontano D, Tajana G, Vecchio G, Tsuchida N. Block in the expression of differentiation markers of rat thyroid epithelial cells by transformation with kirsten murine sarcoma virus. *Cancer Res* 1982;42:618-626.

Galanti G, Fisher T, Kventsel I, Shoham J, Gallily R, Mechoulam R, Lavie G, Amariglio N, Rechavi G, Toren A. 9-Tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression by downregulation of E2F1 in human glioblastoma multiforme cells. *Acta Oncologica* 2008;47(6):1062-1070.

Gallily R, Even-Chen T, Katzavian G, Lehamann D, Dagan A, Mechoulam R. γ -Irradiation Enhances Apoptosis Induced by Cannabidiol, a Non-psycotropic Cannabinoid, in Cultured HL-60 Myeloblastic Leukemia Cells. *Leukemia & Lymphoma* 2003;44:1767-1773.

Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Del Pulgar TG, Izquierdo M & Guzmán M. Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine* 2000;6(3):313-319.

Galve-Roperh I, Rueda D, del Pugar TG, Velasco G, Guzmán M. Mechanism of Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation by the CB1 Cannabinoid Receptor. *Mol Pharmacol* 2002;62:1385-1392.

Gardner B, Zhu LX, Sharma S, Taqshkin DP, Dubinett SM. Methanandamide increases COX-2 expression and tumor growth in murine lung cancer. *FASEB J* 2003;17(4):2157-9.

Garle MJ, Knight A, Downing AT, Jassi KKL, Clothier RH, Fry JR. Stimulation of dichlorofluorescein oxidation by capsaicin and analogues in RAW 264 monocyte/macrophages: lack of involvement of the vanilloid receptor. *Biochem Pharmacol* 2009;59:563-72.

Gary-Bobo M, Elachouri G, Gallas JF, et al. Rimonabant reduces obesity-associated hepatic steatosis and features of metabolic syndrome in obese Zucker fa/fa rats. *Hepatology* 2007;46:122-9.

Gathan S, Larner S, Kinoshita Y, Hetman M, Patel L, Xia Z, Youle RJ, Morrison RS. P38 MAPK mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol* 2000;150:335-347.

Gerlo EAM, Sevens C. Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: diagnostic value in 19 cases. *Clin Chem* 1994; 40 (2): 250-6.

Gherzi D, Wilcken N, Simes RJ. A systematic review of taxane-containing regimens for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2005;93:293-301.

Gertsch J, Scoop R, Kuenzle U, et al. Echinacea alkylamides modulate TNF- α gene expression via cannabinoid receptor CB2 and multiple signal transduction pathways. *FEBS Lett* 2004;577:563-9.

Ginsburg E, Vonderhaar BK. Prolactin Synthesis and Secretion by Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 1995;55:2591-2595.

Giuliano M, Calvaruso G, Pellerito O, Portanova P, Carlisi D, Vento R, Tesoriere G. Anandamide-induce apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway. *Int J Mol Med* 2006;17:811-819.

Giuliano M, Pellerito O, Portanova P, Calvaruso G, Santulli A, De Blasio A, Vento R, Tesoriere G. Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: Involvement of the transcription factor PPAR γ . *Biochimie* 2009;91:457-465.

Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, Richter C. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria: importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem* 1999;274:6080-6084.

Glass G. Primary, secondary and metanalysis of research. *Educational Researcher*. 1976; 5:3-8.

Graham ES, Ball N, Scotter EL, Narayan P, Dragunow M, Glass M. Induction of Krox-24 by endogenous cannabinoid type 1 receptors in Neuro2A cells is mediated by the MEK-ERK MAPK pathway and is suppressed by the phosphatidylinositol 4-kinase pathway. *J Biol Chem* 2006;281(39):29085-29095.

Griffin G, Tao Q, Abood ME. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:886-894.

Grimaldi C, Pisanti S, Laezza C, Malfitano AM, Santoro A, Vitale M, Caruso MG, Notarnicola M, Iacuzzo I, Portella G, Di Marzo V, Bifulco M. Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Experimental Cell Research* 2006;312:363-373.

Grotenhermen F. Effects of Cannabis and the Cannabinoids. In: Grotenhermen, F., Russo, E. – *Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*. 1^a ed., New York, p. 55-65, 2002.

Gokoh M, Kishimoto S, Oka S, Metani Y, Sugiura T. 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, enhances the adhesion of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett* 2005;579(28):6473-8.

Golech SA, McCarron RM, Chen Y, Bembry J, Lenz F, Mechoulam R, et al. Human brain endothelium: coexpression and function of vanilloid and endocannabinoid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;132:87-92.

Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem* 2000;347:369-373.

Gómez del Pulgar T, Velasco G, Sánchez C, Haro A, Guzmán M. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem J* 2002a;363:183-188.

Gómez del Pulgar T, de Ceballos ML, Guzmán M, Velasco G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2002b;277:36527-36533.

Goncharov I, Weiner L & Vogel Z. Delta9-Tetrahydrocannabinol Increases C6 Glioma Cell Death Produced By Oxidative Stress. *Neuroscience* 2005;134:567-574.

Goparaju SK, Ueda N, Yamaguchi H, Yamamoto S. TITULO. *Febs Lett* 1998;422:69-73.

Gotoh Y & Cooper JA. Reactive oxygen species- and dimerization-induced activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in tumor necrosis factor-alpha signal transduction. *J Biol Chem* 1998;273:17477-17482.

Goukassian D, Diez-Juan A, Asahara T, Schratzberger P, Silver M, Murayama T, Isner JM, Andres V. Overexpression of p27(Kip1) by doxycycline-regulated adenoviral vectors inhibits endothelial cell proliferation and migration and impairs angiogenesis. *FASEB J* 2001;15:1877-1885.

Granberg M, Fowler CJ, Jacobsson SOP. Effects of the cannabimimetic fatty acid derivatives 2-arachidonoylglycerol, anandamide, palmitoylethanolamide and methanandamide upon IgE-dependent antigen-induced β -hexosaminidase, serotonin and TNF α release from rat RBL-2H3 basophilic leukaemia cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001;364:66-73.

Greenhough A, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. The cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces BAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2007;121:2172-2180.

Gustafsson K, Christensson B, Sander B, Flygare J. Cannabinoid Receptor-Mediated Apoptosis Induced by R(+)-Methanandamide and Win55,212-2 Is Associated with Ceramide Accumulation and p38 Activation in Mantle Cell Lymphoma. *Molecular Pharmacology* 2006;70:1612-1620.

Gustafsson K, Wang X, Severa D, Eriksson M, Kimby E, Merup M, Christensson B, Flygare J, Sander B. Expression of cannabinoid receptors type 1 and type 2 in non-Hodgkin lymphoma: Growth inhibition by receptor activation. *Int J Cancer* 2008;123:1025-1033.

Gustafsson K, Sander B, Bielawski J, Hannun YA, Flygare J. Potentiation of Cannabinoid-Induced Cytotoxicity in Mantle Cell Lymphoma through Modulation of Ceramide Metabolism. *Mol Cancer Res* 2009a;7(7):1086-1098.

Gustafsson SB, Lindgren T, Jonsson M, Jacobsson SOP. Cannabinoid receptor-independent cytotoxic effects of cannabinoids in human colorectal cells: synergism with 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009b;63:691-701.

Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. Control of the cell survival/death decision by cannabinoids. *J Mol Med* 2001a;78:613-625.

Guzmán M, Galve-Roperh I, Sánchez C. Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci* 2001b;22:19-22.

Guzmán M, Sánchez C, Galve-Roperh I. Cannabinoids and cell fate. *Pharmacology & Therapeutics* 2002;95:175-184.

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

Guzmán M, Duarte MJ, Blázquez C, Ravina J, Rosa MC, Galve-Roperh I, Sánchez C, Velasco G & González-Feria L. A pilot clinical study of delta-9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *British Journal of Cancer* 2006;95:197-203.

Griffin G, Atkinson PJ, Showalter VM, Martin BR, Abood ME. Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:553-560.

Gupta K, Kshirsagar S, Li W, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signalling. *Exp Cell Res* 1999;247:495-504.

Hall W. The respiratory risks of cannabis smoking. 1998;93:1461-1463.

Hallak JE, Machado-de-Souza JP, Crippa JA, Sanchez RF, Trzesniak C, Chaves C, Bernardo SA, Regalo SC, Zuardi AW. Performance of schizophrenic patients in the Stroop Color Word Test and electrodermal responsiveness after acute administration of cannabidiol (CBD). *Rev Bras Psiquiatr* 2010;32(1):56-61.

Howlett AC, Pertwee RG. in *Cannabinoid Receptors* (Academic, San Diego) 1995;167-204.

Huang J, Frischer JS, Serur A, et al. Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:7785-90.

Han S, Roman J. Peroxisome proliferator-activated receptor γ : a novel target for cancer therapeutics. *Anticancer Drugs* 2007;18:237-244.

Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 2002;277:25847-50.

Hauck CR, Sieg DJ, Hsia DA, Loftus JC, Gaarde WA, Monia BP, et al. Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells. *Cancer Res* 2001;61:7079-7090.

Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2:E65-E67.

Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: a multitarget agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 2008;7:1020-1035.

Hart S, Fisher OM, Ullrich A. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 2004;64:1943-1950.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-1828.

Hashibe M, Ford DE, Zhang ZF. Marijuana smoking and head and neck cancer. *J Clin Pharmacol* 2002;42:103S-107S.

Hawighorst T, et al. Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis: a novel host anti-tumor defense mechanism. *EMBO J* 2001;20:2631-2640.

Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, Hirata D, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y. Phosphorylation and activation of cell division cycle associated 8 by aurora kinase B plays a significant role in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 2007;67:4113-22.

Herlong JL, Scott TR. Positioning prostanoids of the D and J series in the immunopathogenic scheme. *Immunol Lett* 2006;102:121-131.

Hermann H, De Petrocellis L, Bisogno T, Schiano Moriello A, Lutz B, Di Marzo V. Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:607-16.

Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, Guzmán M, Velasco G. p38 MAPK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells. *FEBS Letters* 2005;579:5084-5088.

Herrera B, Carracedo A, Diez-Zaera M, del Pulgar TG, Guzmán M, Velasco G. The CB2 cannabinoid receptor signals apoptosis via ceramide-dependent activation on the mitochondrial intrinsic pathway. *Experimental Cell Research* 2006;312:2121-2131.

Hetian L, Ping A, Shumei S, Xiaoying L, Luowen H, Jian W, Lin M, Meisheng L, Junshan Y, Chengchao S. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J Biol Chem* 2002;277:43137-43142.

Hinz B, Brune K, Pahl A. Cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes is modulated by cyclic AMP, prostaglandin E2 and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:790-6.

Hinz B, Ramer R, Eichele K, Weinzierl U, Brune K. Up-Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression Is Involved in R(+)-Methanandamide-Induced Apoptotic Death of Human Neuroglioma Cells. *Mol Pharmacol* 2004a;66:1643-1651.

Hinz B, Ramer Rm Eichele K, Weinzierl U, Brune K. R(+)-Methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in H4 human neuroglioma cells: possible involvement of membrane lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004b;324:621-626.

Hipskind RA, Baccarini M, Nordheim A. Transient activation of RAF-1, MEK, ERK2 coincides kinetically with ternary complex factor phosphorylation and immediate-early gene promoter activity *in vivo*. *Mol Cell Biol* 1994;14:6219-31.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-8.

Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356-5362.

Holland EC, Celetino J, Dai C, Schaefer L, Azuaya RE, Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 2000;25:55-57.

Hornebeck W, Lambert E, Petitfrère E, Bernard P. Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 2005;87:377-383.

Howe AK, Aplin AE, Juliano RL. Anchorage-dependent ERK signaling-mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:30-5.

Howe AK. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692:159-74.

Howlett AC, Flemming RM. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 1984;26:532-8.

Howlett AC. Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 1985;27:429-436.

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

Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 2007;14:1576-1582.

Hsu Y, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X (L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3668-3672.

Hsu SS, Huang CJ, Cheng HH, Chou CT, Lee HY, Wang JL, Chen IS, Liu SI, Lu YC, Chang HT, Huang JK, Chen JS, Jan CR. Anandamide-induced Ca²⁺ elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death via apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicology* 2007;231:21-29.

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Kijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MEKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997;275:90-94.

Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, Wu W, Guan J, Terzoudi G, Pantelias G. Mechanisms of DNA double strand breast repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* 2004;104:14-20.

Islam TC, Asplund AC, Lindvall JM, Nygren L, Liden J, Kimby E, Christensson B, Smith CIE, Sander B. High level of cannabinoid receptor 1, absence of regulator of G protein signalling 13 and differential expression of Cyclin D1 in mantle cell lymphoma. *Leukemia* 2003;17:1880-1890.

Izzo AA, Aviello G, Petrosino S, Orlando P, Marsicano G, Lutz B, Borrelli F, Capasso R, Nigam S, Capasso F, Di Marzo V. Increased endocannabinoid levels reduce the development of precancerous lesion in the mouse colon. *J Mol Med* 2008;86(1):89-98.

Izzo AA, Camilleri M. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer. *Pharmacol Res* 2009;60:117-125.

Jacks T, Weinberg RA. Cell cycle control and its watchman. *Nature (Lond)* 1996;381:643-644.

Jacobsson SO, Rongard E, Stridh M, Tiger G, Fowler CJ. Serum-dependent effects of tamoxifen and cannabinoids upon C6 glioma cell viability. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1807-1813.

Jacobsson SOP, Wallin T & Fowler CJ. Inhibition of Rat C6 Glioma Cell Proliferation by Endogenous and Synthetic Cannabinoids. Relative Involvement of Cannabinoid and Vanilloid Receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001;299:951-959.

Jadad A, Moore A, Carrol D, Jenkinson C, Reynolds DJM, Gavaghan DJ, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Controlled Clinical Trials*. 1996;17:1-12.

Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, et al. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14136-14141.

Jemal A, Murray T, Samuela A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2003;53:5-26.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2006;56:106-30.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.

Jeong HJ, Kim SJ Moon PD, Kim NH, Kim JS, Park RK, et al. Antiapoptotic mechanism of cannabinoid receptor 2 agonist on cisplatin-induced apoptosis in the HEI-OC1 auditory cell line. *Journal of Neuroscience Research* 2007;85:896-905.

Jia W, Hegde VL, Singh NP, Sisco D, Grant S, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta9-Tetrahydrocannabinol-Induced Apoptosis in Jurkat Leukemia T Cells is Regulated by Translocation of Bad to Mitochondria. *Mol Cancer Res* 2006;4(8):549-562.

Ji J, Wang XW. New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009;8(18):1686-93.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, p38 protein kinases. *Sciences* 2002;298:1911-2.

Jones CJ, Kipling D, Morris M, Hepburn P, Skinner J, Bounacer A, Wyllie FS, Ivan M, Bartek J, Wynford-Thomas D, et al. Evidence for a telomere-independent "clock" limiting RAS oncogene-driven proliferation of human thyroid epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:5690-5699.

Jones DH, Reid JL, Hamilton CA *et al.* The biochemical diagnosis, localization and follow up of pheochromocytoma: the role of plasma and urinary catecholamine measurements. *Q J Med* 1980; 195: 341-61.

Jonsson KO, Anderson A, Jacobsson SOP, Vandevoorde S, Lambert KM, Fowler CJ. AM404 e VDM 11 non-specifically inhibit C6 glioma cell proliferation at concentrations used to block the cellular accumulation of the endocannabinoid anandamide. *Arch Toxicol* 2003;77:201-207.

Jordà MA, Verbakel SE, Valk PJM, Vankan-Berkhoudt YV, Macarrone M, Finazzi-Agrò A, Löwenberg B, Belwel R. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood* 2002;99(8):2788-2793.

Jordà MA, Rayman N, Tas M, Verbakel SE, Battista N, van Lom K, Löwenberg B, Macarrone M, Delwel R. The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood* 2004;104(2):526-534.

Joseph J, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen F. The neurotransmitter gamma-aminobutyric acid is an inhibitory regulator for the migration of SW 480 colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2002;62:6467-6469.

Joseph J, Niggemann B, Zaenker KS, Entschladen. Anandamide is an endogenous inhibitor for the migration of tumor cells and T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:723-728.

Jost M, Kari C, Rodeck U. The EGF receptor-an essential regulator on multiple epidermal functions. *Eur J dermatol* 2000;10:505-510.

Juo P, Kuo CJ, Reynolds SE, Konz RF, Raingeaud J, Davis RJ, Biemann HP, Blenis J. Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway requires ICE/CED3 family proteases. *Mol Cell Biol* 1997;17:24-35.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Devaraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4997-5002.

Kaelin WG. *Bioassays* 1999;21:950-958.

Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002;3:221-7.

Karniol IG, Carlini EA. Pharmacological interactions between cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia* 1973;33(1):53-70.

Karniol IG, Shirakawa I, Kasinski N, Pfeferman A, Carlini EA. Cannabidiol interferes with the effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in man. *Eur J Pharmacol* 1974;28:172-177.

Karniol IG. Cannabis sativa and derivados. In: Seibel SD, Toscano JR A, editor(s). Dependência de Drogas. 1° edition. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000:131-42.

Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14:3-15.

Kasten MM, Giordano A. pRb and the Cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 1998;5:132-140.

Kauffmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256:42-49.

Kazak KR, Prusakiewicz JJ, Rowlinson SW, et al. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid anandamide. *Biochemistry* 2003;42:9041-90.

Kawabe T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2004;3:513-9.

Kerbek R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2002;2:727-739.

Keren O, Sarne Y. Multiple mechanisms of CB1 cannabinoid receptors regulation. *Brain Res* 2003;980:197-205.

Kim, H-G, Kassis J, Souto JC, Turner T, Wells A. EGF receptor signaling in prostate morphogenesis and tumorigenesis. *Histol Histopathol* 1999;14:1175-1182.

Kim J, Yang P, Suraokar M, Sabichi AL, Llansa D, Mendoza G, Subbarayan V, Logothetis CJ, Newman RA, Lippman SM, Menter DG. Suppression of prostate tumor cell growth by stromal cell prostaglandin D synthase-derived products. *Cancer Res* 2005;65:6189-6198.

Kim KY, Kim SS, Cheon HG. Differential anti-proliferative actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2006;72:530-540.

King KL, Cidlowski JA. *Annu Rev Physiol* 1998;60:601-617.

Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K, Sugiura T. 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003;278:24469-24475.

Khokha R, Waterhouse P, Yagel S, et al. Antisense RNA-induced reduction in murine TIMP levels confers oncogenicity on Swiss 3T3 cells. *Science* 1989;24:3947-3950.

Khokha R, Zimmer MJ, Graham CH, Lala PK, Waterhouse P. Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1017-1022.

Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavence WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:215-225.

Kobayashi H, Takemura Y, Ohnuma T. Relationship between tumor cell density and drug concentration and the cytotoxic effects of doxorubicin or vincristine: mechanism of inoculum effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992;31:6-10.

Kogan NM, Rabinowitz R, Levi P, Gibson D, Sandor P, Schlesinger M, Mechoulam R. Synthesis and Antitumor Activity of Quinonoid Derivatives of Cannabinoids. *J Med Chem* 2004;47:3800-3806.

Kogan NM. Cannabinoids and cancer. *Mini Rev Med Chem* 2005;5(10):941-52.

Kogan NM, Blázquez C, Alvarez L, Gallity R, Schlesinger M, Guzmán M, Mechoulam R. A Cannabinoid Quinone Inhibits Angiogenesis by Targeting Vascular Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 2006;70:51-59.

Kogan NM, Schlesinger M, Priel E, Rabinowitz R, Berenshtein E, Chevion M, Mechoulam R. HU-331, a novel cannabinoid-based anticancer topoisomerase II inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2007a;6(1):173-183.

Kogan NM, Schlesinger M, Peters M, Marincheva G, Beerli R, Mechoulam R. A Cannabinoid Anticancer Quinone, HU-331, Is More Potent and Less Cardiotoxic Than Doxorubicin: A Comparative *in vivo* Study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007b;322:646-653.

Koivisto P, Kolmer M, Visakorpi T, Kallioniemi OP. Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer. *Am J Pathol* 1998;152:1-9.

Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* 2000;184:285-300.

Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 2002;110:3-8.

Kolesnick R, Altieri D, Fucks Z. A CER-Tain role for ceramide in taxane-induced cell death. *Cancer Cell* 2007;11:473-475.

Kondo M, Shibata T, Kumagai T, et al. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2): The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7367-7372.

Konishi A, Shimizu S, Hirota J, et al. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 2003;114:673-688.

Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 1999;59:1693-700s.

Kouroku Y, et al. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 2007;14:230-239.

Kraft B, Kress HG. Cannabinoids and the immune system. *Of men, mice and cells. Schmerz* 2004;18(3):203-10.

Kremenevskaja N, von Wasielewski R, Rao AS, Schoff C, Anderson T, Brabant G. Wnt-5a has tumor suppression activity in thyroid carcinoma. *Oncogene* 2005;24:2144-2154.

Krishnan A, Nair SA, Pillai MR. Biology of PPAR gamma in cancer: a critical review on existing lacunae. *Current Mol Med* 2007;7:532-540.

Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.

Kroesen BJ, Pettus B, Luberto C, Busman M, Sietsma H, de Leji L, Hannun YA. Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via *de novo* generated C16-ceramide and involves mitochondria. *J Biol Chem* 2001;276:13606-13614.

Kyritsis AP, Zhang B, Zhang W, Xiao M, Takeshima H, Bondy ML, et al. Mutations of the p16 gene in gliomas. *Oncogene* 1996;12:63-7.

Laezza C, Pisanti S, Crescenzi E, Bifulco M. Anandamide inhibits Cdk2 and activates Chk1 leading to cell cycle arrest in human breast cancer cells. *FEBS Letters* 2006;580:6076-6082.

Laezza C, Pisanti S, Malfitano AM, Bifulco M. The anandamide analog, Met-F-AEA, controls human breast cancer cell migration via the RHOA/RHO kinase signalling pathway. *Endocrine-Related Cancer* 2008;15:965-974.

Lalani EN, Laniado ME, Abel PD. Molecular and cellular biology of prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1997;16:29-66.

Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol* 2001;2:149-156.

Lamb DJ, Weigel NI, Marcelli M. Androgen receptors and their biology. *Vitam Horm* 2001;62:199-230.

Lambert DM, DiPaolo FG, Sonveaux P, Kanyonyo M, Govaerts SJ, Hermans E, Bueb J, Delzenne NM, Tschirhart EJ. Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochim Biophys Acta* 1999;1440:266-274.

Lam PMW, Hainsworth AH,, Smith GD, Owen DE, Davies J, Lambert DG. Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases $[Ca^{2+}]_i$, initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. *Journal of Neurochemistry* 2007;102:801-811.

Lansberg L, Young JB. Catecholamines and the adrenal medulla. *In: Wilson JD, Foster DW (eds): Textbook of endocrinology, 8th ed.* Philadelphia: WB Saunders 1993: 621-705.

Lavieu G, et al. Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision? *Autophagy* 2007;3:45-47.

Lee YM, Uhm KO, Lee ES, Knon J, Park SH, Kim HS. AM251 suppresses the viability of HepG2 cells through the AMPK (AMP-activated protein kinase)-JNK (c-Jun N-terminal kinase)-ATF3 (activating transcription factor 3) pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008a;370:641-645.

Lee CY, Wey SP, Liao MH, Hsu WL, Wu HY, Jan TR. A comparative study on cannabidiol-induced apoptosis in murine thymocytes and EL-4 thymoma cells. *International Immunopharmacology* 2008b;8:732-740.

Leite JR, Carlini EA, Lander N, Mechoulam R. Anticonvulsant effects of the (-) and (+)isomers of cannabidiol and their dimethylheptyl homologs. *Pharmacology* 1982;24(3):141-6.

Lemberger L. Potencial Therapeutic Usefulness of Marijuana. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1980;20:151-72.

Li SP, Junttila MR, Han J, Kahan VM, Westermarck J. p38 Mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1,2. *Cancer Res* 2003;63:3473-3477.

Li D, Xie K, Wolf R, Abgbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004;363:1049-57.

Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN. Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppression in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 2003;4:349-360.

Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'Argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V. Possible Endocannabinoid Control of Colorectal Cancer Growth. *Gastroenterology* 2003;125:677-687.

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

Limmer BL. Nonmelanoma skin cancer: today's epidemic. *Tex Med* 2001;97:56-58.

Lin CQ, Singh J, Murata K, et al. A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:1332-40.

Ling MT, Wang X, Zhang X, Wong YC. The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation* 2006;74:481-7.

Liu L, Szallasi A, Simon SA. A non-pungent resiniferatoxin analogue, phorbol 12-phenylacetate 13 acetate 20-homovanillate, reveals vanilloid receptor subtypes on rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 1998;84:569-81.

Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000;346:835-840.

Liu WM, Stimson LA, Joel SP. The *in vitro* activity of the tyrosine kinase inhibitor ST1571 in BCR-ABL positive CML cells: synergistic interactions with anti-leukaemic agents. *Brit J Cancer* 2002;86:1472-1478.

Liu WM, Scott KA, Shamash J, Joel S, Powles TB. Enhancing the *in vitro* cytotoxicity activity of Delta9-tetrahydrocannabinol in leukemia cells through a combinatorial approach. *Leukemia & Lymphoma* 2008;49(9):1800-1809.

Lombard C, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Targeting cannabinoid receptors to treat leukemia: Role of cross-talk between extrinsic and intrinsic pathways in delta9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced apoptosis of Jurkat cells. *Leukemia Research* 2005;29:915-922.

Lopes HF, Silva HB, Bortolloto LA *et al.* Feocromocitoma. Peculiaridades diagnósticas e terapêuticas. *Arq Bras Cardiol* 1992; 59(5) : 395-400.

Luca T, Di Benedetto G, Scuderi MR, Palumbo M, Clementi S, Bernardini R, Cantarella G. The CB1/CB2 receptor agonist WIN-55,212-2 reduces viability of human Kaposi's sarcoma cell *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 2009;616:16-21.

Lu Z, Jing G, Blume-Jensen P, Hunter T. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21:4016-4031.

Luetteke NC, et al. TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 1993;73:263-278.

Luetteke NC, et al. The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 1994;8:399-413.

Macarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegenthart JFG, Finazzi Agrò A. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 1998;273(48):32332-32339.

Macarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 2000;275(41):31938-31945.

Maccarrone M & Finnazzi-Agrò A. Endocannabinoids and their actions. *Vitam Horm* 2002a;65:225-255.

Macarrone M, Pauselli R, Di Rienzo M, Finazzi-Agró A. Binding, degradation and apoptotic activity of stearoylethanolamide in rat C6 glioma cells. *Biochem J* 2002b;366:137-144.

Macarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A < Finazzi-Agrò A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2003;278(36):33896-33903.

Maciel RMB, Biscolla RPM. Diagnostico e tratamento do cancer de tiroide. In: Vilar L (editor). *Endocrinologia Clinica*. 3a ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2006. p. 240-52.

Machado N. O discurso penal e a lei de drogas. Em: Gonçalves O.D., eds. *Só socialmente...* Rio de Janeiro: Relume Dumará, 89-98, 1992.

Machado Rocha FC, Stefano SC, Haiek, RC, Oliveira LM, Silveira, DX. Therapeutic use of *Cannabis sativa* on chemotherapy-induced nausea and vomiting among cancer patients. *European Journal of Cancer Care* 2008;17(5):431-43.

Macho A, Blázquez MV, Navas P, Muñoz E. Induction of apoptosis by vanilloid compounds does not require *de novo* gene transcription and activator protein 1 activity. *Cell Growth Differ* 1998;9:277-286.

Macho A, Calzado MA, Muñoz Blanco J, Gomez Diaz C, Gajate C, Mollinedo F, Navas P, Muñoz E. Selective induction of apoptosis by capsaicin in transformed cells: the role of reactive oxygen species and calcium. *Cell Death Differ* 1999;6:155-165.

Macho A, Lucena C, Calzado MA, Blanco M, Donnay I, Appendino G, Muñoz E. Phorboid 20-homo-vanillates induce apoptosis through a VR1-independent mechanism. *Chem Biol* 2000;7:483-492.

Macho A, Lucena C, Sancho R, Daddario N, Minassi A, Muñoz E, Appendino G. Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *Eur J Nutr* 2003;42:2-9.

Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Neurobiology* 1992;89:3825-3829.

Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPSJ* 2006;8:298-306.

MacLeod RJ, Hayes M, Pacheco I. Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G403-G411.

Macri E, Loda M. Role of p27 in Prostate Carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:337-344.

Mallet PE, Beninger RJ. The endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide impairs memory in rats. *Behavioral Pharmacology* 1996;7:276-284.

Malumbres M, Barbacid M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 2005;30:630-41.

Marshall CJ. Taking the Rap. *Nature* 1998;392:553-554.

Martyn KD, Frederick LM, von Loehneysen K, Dinauer MC, Knaus UG. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared with other NAD(P)H oxidases. *Cell Signal* 2006;18:69-82.

Masciullo V, Khalili K, Giordano A. *Int J Oncol* 2000;17:897-902.

Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP & Parolaro D. Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004;308:838-845.

Massi P, Vaccani A, Bianchessi S, Costa B, Macchi P & Parolaro D. The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2006;63:2057-2066.

Massi P, Valenti M, Vaccani A, Gasperi V, Perletti G, Marras E, Fezza F, Macarrone M & Parolaro D. 5-Lipoxygenase and anandamide hydrolase (FAAH) mediate the antitumor activity of cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid. *Journal of Neurochemistry* 2008;104:1091-1100.

Matas D, Juknat A, Pietr M, klin Y, Vogel Z. Anandamide protects from low serum-induced apoptosis via its degradation to ethanolamide. *J Biol Chem* 2007;282(11):7885-7892.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein M, Young A, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;346:561-564.

Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF, Camandola S. Roles of nuclear factor kB in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 2000;74:443-56.

Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995;9:935-944.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:741-752.

Maher EA, Furnari BF, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WJ, DePinho RA. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 2001;15:1311-1333.

Mahoney JM, Harris RA. Effect of 9-tetrahydrocannabinol on mitochondrial processes. *Biochem Pharmacol* 1972;21:1217-1226.

Manev H, Uz T, Sugaya K, Qu T. Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in na aging brain. *FASEB J* 2000;14:1464-1469.

Marinelli S, Pascucci T, Bernardi G, Puglisi-Allegra S, Mercuri NB. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens.

Neuropsychopharmacology 2005;30:864-870.

Marsicano G, Moosmann B, Hermann H, Lutz B, Behl C. Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: Role of the cannabinoid receptor CB1. J Neurochem 2002;80:448-56.

Matsushima R, Harada N, Webster NJ, Tsutsumi YM, Nakaya Y. Effects of TRB3 on insulin and nutrient-stimulated hepatic p70 S6 kinase activity. J Biol Chem 2006;281:29719-29729.

Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 1999; 341:1165-1173.

Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo. Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. FEBS Letters 1995;377:82-86.

Mayumi-Matsuda K, Kojima S, Suzuki H, Sakada T. Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. Biochem Biophys Res Commun 1999;258:260-4.

McAllister SD, Christian RT, Horowitz MP, Garcia A, Desprez PY. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. Mol Cancer Ther 2007;6(11):2921-2927.

McAllister SD, Chan C, Taft RJ, Luu T, Abood ME, Moore DH, Aldape K & Yount G. Cannabinoids selectively inhibit proliferation and induce death of cultured human glioblastoma multiforme cells. *Journal of Neuro-Oncology* 2005;74:31-40.

McDonald ER, El-Deiry WS. *Int J Oncol* 2000;16:871-886.

McIntosh HH, Song C, Howlett AC. CB1 cannabinoid receptor: cellular regulation and distribution in N18TG2 neuroblastoma cells. *Mol Brain Res* 1998;53:163-173.

McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* 2002;100:627-634.

McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Delta-9-Tetrahydrocannabinol enhances breast cancer growth and metastasis by suppression of the antitumor immune response. *The Journal of Immunology* 2005;174:3281-3289.

McKallip RJ, Jia W, Schlomer J, Warren JW, Nagarkatti PS, Nagardatti M. Cannabinoid-induced apoptosis in human leukemia cells: a novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharmacol* 2006;70:897-908.

McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal adhesion kinase in cancer: a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* 2005;5:505-515.

Mecherji YB, Ben Jemaa A, Mezigh C, Fralle B, Ben Rais N, Paniagua R, Royuela M, Oueslati R. The profile of prostate epithelial cytokines and its impact on sera prostate-specific antigen levels. *Inflammation* 2009;32:202-210.

Mechoulam R, Carlini EA. Towards drugs derived from cannabis. *Naturwissenschaften* 1978;65:174-179.

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. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;50:83-90.

Mechoulam R, Panikashvili D & Shohami E. Cannabinoids and brain injury: therapeutics implications. *Trends Mol Med* 2002;8:58-61.

Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* 2001;20:2378-2389.

Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzmán M, Di Marzo V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Letters* 1999;463:235-240.

Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, Di Marzo V. Suppression of Nerve Growth Factor Trk Receptors and Prolactin Receptors by Endocannabinoids Leads to Inhibition of Human Breast and Prostate Cancer Cell Proliferation. *Endocrinology* 2000;141:118-126.

Mesri M, Moralez-Ruiz M, Ackermann EJ, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* 2001;158:1757-65.

Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3655-3660.

Michalski CW, Oti FE, Erkan M, Sauliunaite D, Bergmann F, Pather P, Batkai S, Müller MW, Giese NA, Friess H, Kleeff J. Cannabinoids in pancreatic cancer: correlation with survival and pain. *Int J Cancer* 2008;122:742-750.

Mimeault M, Pommery N, Wattez N, Bailly C, Hénichart JP. Anti-Proliferative and Apoptotic Effects of Anandamide in Human Prostatic Cancer Cell Lines: Implication of Epidermal Growth Factor Receptor Down-Regulation and Ceramide Production. *The Prostate* 2003;56:1-12.

Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005;436:518-24.

Miyagi E, Katoh R, Li X, Lu S, Susuki K, Maeda S, Shibuya M, Kawaoi A. Thyroid stimulation hormone downregulates vascular endothelial growth factor expression in FRTL-5 cells. *Thyroid* 2001;11:539-543.

Miyato H, Kitayama J, Yamashita H, Souma D, Asakage M, Yamada J, Nagawa H. Pharmacological Synergism Between Cannabinoids and Paclitaxel in Gastric Cancer Cell Lines. *Journal of Surgical Research* 2009;155:40-47.

Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, Fukushima M, Nonomura M, Nasao M, et al. Significance of thymidylate synthase activity in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1453-60.

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

Molinari M. Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif* 2000;33:261-274.

Monbouli JV, Schaeffer G, Holzmann S, Kostner GM, Graier WF. Anandamide-induced mobilization of cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1999;126:1593-1600.

Montine TJ & Morrow JD. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2005;166:1283-1289.

Mon MJ, Haas AE, Stein JL, Stein GS. Influence of psychoactive and nonpsychoactive cannabinoids on cell proliferation and macromolecular biosynthesis in human cells. *Biochemical Pharmacology* 1981;30:31-43.

Morales A, Lee H, Goni FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis* 2007;12:923-939.

Morgan SE, Kastan MB. *Adv Cancer Res* 1997;71:1-25.

Mormina ME, Thakur S, Molleman A, Whelan CJ, Baydoun AR. Cannabinoid signalling in TNF-alpha induced IL-8 release. *Eur J Pharmacol* 2006;540(1-3):183-90.

Morris L, Allen EK, Thangue NBL. TITULO. *Nat Cell Biol* 2000;2:232-239.

Morrison DK, Cutler RE. TITULO. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:174-179.

Morh S, McCormick TS & Lapetina EG. Macrophages resistant to endogenously generated nitric oxide-mediated apoptosis are hypersensitive to exogenously added nitric oxide donors: Dichotomous apoptotic response independent of caspase 3 and reversal by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD 098059. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5045-5050.

Movsesyan VA, Stoica BA, Yakoviev AG, Knoblach SM, Kea IV PM, Cernak I, Vink R, Faden AI. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways. *Cell Death Differ* 2004;11:1121-1132.

Mulrow CD, Oxman AD. (1997) (Eds.) *Cochrane Collaboration Handbook*. Available in The Cochrane Library [database on disk and CDROM] The Cochrane Collaboration; Oxford: Updated software. Updated quarterly. Available from: BMJ Publishing Group, London.

Munson AE, Harris LS, Friedman MA, Dewey WL, Carchman RA. Antineoplastic activity of cannabinoids. *J Natl Cancer Inst* 1975;55:597-602.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;365:61-65.

Murillas R, Larcher F, Conti CJ, Santos M, Jorcano JL. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *EMBO J* 1995;14:5216-5223.

Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG & Furshpan EJ. Inhibition of the p42/p44 MAP Kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11975-11980.

Mutah M, Watanabe K, Kitamura T, et al. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 2002;62:28-32.

Na HK, Surh YJ. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1381-1391.

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, et al. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 1999;19:2987-95.

Nakayama K, Negahama H, Minamishima YA, et al. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 2004;6:661-72.

Nakada M, Nakada S, Demuth T, et al. Molecular targets of glioma invasion. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:458-78.

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78:915-918.

Nevins JR, Leone G, DeGregori J, Jakoi L. Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control. *J Cell Physiol* 1997;173:233-236.

Nithipatikom K, Endsley MP, Isbell MA, Falck JR, Iwamoto Y, Hillard CJ, Campbell WB. 2-Arachidonoylglycerol: A Novel Inhibitor of Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Invasion. *Cancer Research* 2004;64:8826-8830.

Nithipatikom K, Endsley MP, Isbell MA, Wheelock CE, Hammock BD, Campbell WB. A new class of inhibitors of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis and invasion of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2005;332:1028-1033.

Nomura T, Nakagawa M, Fujita Y, Hanada T, Mimata H, Nomura Y. Clinical signification of thymidylate synthase expression in bladder cancer. *Int J Urol* 2002;9:368-76.

Oesch S, Walter D, Wachtel M, Pretre K, Salazar M, Guzmán M, Velasco G, Schäfer BW. Cannabinoid receptor 1 is a potent drug target for treatment of translocation-positive rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther* 2009;8(7):1838-1845.

Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipide in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:604-616.

Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. TRB5, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* 2005;24:1243-55.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Rev Cancer* 2004;4:592-603.

Oka S, Ikeda S, Kishimoto S, Gokon M, Yanagimoto S, Waku K, Sugiura T. 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophils leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology* 2004;76:1002-1009.

Olea-Herrero N, Vara D, Malagarei-Cazenave S, Diaz-Laviada I. Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: Involvement of CB2. *British Journal of Cancer* 2009a;101:940-950.

Olea-Herrero N, Vara D, Malagarie-Cazenave S, Diaz-Laviada I. The cannabinoid R(+)-methanandamide induces IL-6 secretion by prostate cancer PC3 cells. *Journal of Immunotoxicology* 2009b;6(4):249-256.

Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005;435:677-681.

Ott M, Zhivotovsky B, Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2007;14(7):1243-7.

Oukka M. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Ann Rheum Dis* 2008;67(S3):26-29.

Overall CM, Kleinfeld O. Tumour microenvironment – opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:227-239.

Own T, Yoshino H, Yoshimatsu K, Nagasu T. *Curr Med Chem* 2000;8:1487-1503.

Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992;11:961-71.

Pagotto U, Marsicano G, Fezza F, Theodoropoulou M, Grubler Y, Stalla J, Arzberger T, Milone A, Losa M, Di Marzo V, et al. Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2687-2696.

Park MJ, Lee JY, Kwak HJ, et al. Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: role of nuclear factor kappaB and reactive oxygen species. *J Cell Biochem* 2005a;95:955-969.

Park HJ, Lee HJ, Min HY, et al. Inhibitory effects of a benz(f)indole-4,9-dione analog on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. *Eur J Pharmacol* 2005b;527:31-36.

Park JR, Eggert A, Caron H. 2008. Neuroblastoma: Biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am* **55**: 97-120.

Parolaro D, Massi P, Rubino T, Monti E. Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2002;66(2&3):319-332.

Parolaro D, Massi P. Cannabinoids as potential new therapy for the treatment of gliomas. *Expert Rev Neurother* 2008;81(1):37-49.

Parsons Dw, Wang TL, Samuels Y, Bardelli A, Cummins JM, DeLong L, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Wison JK, Markowitz S, Kinzler Kw, et al. Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 2005;436:792.

Pasquariello N, Catanzaro G, Marzano V, Amadio D, Barcaroli D, Oddi S, Federici G, Urbani A, Finazzi-Agrò A, Macarrone M. Characterization of the Endocannabinoid System in Human Neuronal Cells and Proteomic Analysis of Anandamide-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284(43):29413-29426.

Patel SP, Katyare SS. Insulin-status-dependent modulation of FoF1-ATPase activity in rat liver mitochondria. *Lipids* 2006;41:695-703.

Patsos HA, Hicks DJ, Dobson RRH, Greenhough A, Woodman N, Lane Jd, Williams AC, Paraskeva C. The endogenous cannabinoid, anandamide, induces cell death in colorectal carcinoma cells: a possible role for cyclooxygenase 2. *Gut* 2005a;54:1741-1750.

Patsos HA, Hicks DJ, Greenhough A, Williams AC, Paraskeva C. Cannabinoids and cancer: potential colorectal cancer therapy. *Biochem Soc Trans* 2005b;33:712-4.

Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 1999;287:821-828.

Pearson AD, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D, European Neuroblastoma Study Group, Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG formerly United Kingdom Children's Cancer Study Group). High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: A randomised trial. *Lancet Oncol* 2008;9:247-256.

Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, et al. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:10703-10717.

Pertwee R.G. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids. In: Balfour DJK, eds. *Psychotropic drugs of abuse*. N. York: Pergamon Press, 355-429, 1990.

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

Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999;6:635-664.

Pertwee RG. Sites and Mechanisms of Action. In: Grotenhermen, F., Russo, E. – Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential. 1^a ed., New York, p. 55-65, 2002.

Pertwee RG. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 2005;76:1307-1324.

Peters M, Kogan NM. HU-331: a cannabinoid quinone, with uncommon cytotoxic properties and low toxicity. *Exper Opin Investig Drugs* 2007;16(9):1405-13.

Piomelli D, Giufreda A, Calignano A, Fonseca FR. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *TIPS* 2000;21:218-224.

Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:873-878.

Pisanti S, Borselli C, Oliviero O, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation in its tumor-suppressor efficacy. *Journal of Cell Physiology* 2006;211:495-503.

Pisanti S, Borselle C, Oliviero O, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. Antiangiogenic Activity of the Endocannabinoid Anandamide: Correlation to its Tumor-Suppressor Efficacy. *J Cell Physiol* 2007;211:495-503.

Pisanti S, Malfitano AM, Grimaldi C, Santoro A, Gazzero P, Laezza C, Bifulco B. Use of cannabinoid receptor agonists in cancer therapy as palliative and curative agents. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;23:117-131.

Portella G, Laezza C, Laccetti P, De Petrocellis L, Di Marzo V, Bifulco M. Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J* 2003;17(12):1771-1773.

Porter AC & Felder CC. The endocannabinoid nervous system. Unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 2001;90:45-60.

Powles T, te Poele R, Shamash J, Chaplin T, Propper D, Joel S, Oliver T, Liu WM. Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood* 2005;105:1214-1221.

Pozzi A, Yan X, Macias-Perez I, et al. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation. *J Biol Chem* 2004;279:29797-804.

Preet A, Ganju RK, Groopman JE. Delta9-Tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration *in vitro* as well as its growth and metastasis *in vivo*. *Oncogene* 2008;27:339-346.

Pumiglia KM & Decker SJ. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:448-452.

Qamri Z, Preet A, Nasser MW, Bass CE, Leone G, Barsky SH, Ganju RK. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2009;8(11):3117-3129.

Pushkarev VM, Kovzun OI, Tronko MD. Antineoplastic and Apoptotic Effects of Cannabinoids. N-Acylethanolamines: Protectors or Killers? *Exp Oncol* 2008;30:6-21.

Quiao L, Kozoni V, Tsiolias GJ, et al. Selected eicosanoids increase the proliferation role of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes *in vivo*. *Biochem Biophys Acta* 1995;1258:215-23.

Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, Ahn NG, Kerbel RS. Oncogenes and Tumor Angiogenesis: Differential Modes of Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulation in ras-transformed Epithelial Cells and Fibroblasts. *Cancer Res* 2000;60:490-498.

Ramer R, Brune K, Pahl A, Hinz B. R(+)-Methanandamide induces cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells via a non-cannabinoid receptor-mediated mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;286:1144-1152.

Ramer R, Weinzierl U, Schwind B, Brune K, Hinz B. Ceramide is involved in R(+)-methanandamide-induced cyclooxygenase-2 expression in human neuroglioma cells. *Mol Pharmacol* 2003;64:1189-1198.

Ramer R, Eichele K, Hinz B. Upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 confers the anti-invasive action of cisplatin on human cancer cells. *Oncogene* 2007;26:5822-5827.

Ramer R, Hinz B. Inhibition of Cancer Cell Invasion by Cannabinoids via Increased Expression of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:59-69.

Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003;3:489-501.

Rao CV. Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutat Res* 2004;555:107-119.

Rao GK, Kaminski NE. Induction of intracellular calcium elevation by delta9-tetrahydrocannabinol in T cells involves TRPC1 channels. *Journal of Leukocyte Biology* 2006;79:202-213.

Recht LD, Salmons R, Rosetti R, Jang T, Pipia G, Kubiowski T, Karim P, Ross AH, Zurier R, Litofsky NS, Burstein S. Antitumor effects of ajulemic acid (CT3), a synthetic non-psychoactive cannabinoid. *Biochemical Pharmacology* 2001;62:755-763.

Reddy RM, Yeow WS, Chua A, Nguyen DM, Baras A, Ziauddin MF, Shamimi-Noori SM, Maxhimer JB, Schrupp DS, Nguyen DM. Rapid and profound potentiation of Apo2L/TRAIL-mediated cytotoxicity and apoptosis in thoracic cancer cells by the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A: the essential role of the mitochondria-mediated caspase activation cascade. *Apoptosis* 2007;12:55-71.

Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, McLaughlin ME, Jacks T. Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nat Genet* 2000;26:109-113.

Reinhardt CH, Aslanian AS, Lees JA, Yaffe MB. P53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 2007;11:175-89.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al, eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2008. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.

Robson P. Human studies of cannabinoids and medicinal cannabis. *Handb Exp Pharmacol* 2005;168:719-56.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Cordeu L, Vilas-Zornoza A, San Jose-Eneriz E, Garate L, Castillejo JA, Martin V, Prosper F, Heiniger A, Torres A, Agirre X. WNT5A, a putative tumour suppressor of lymphoid malignancies, is inactivated by aberrant methylation in acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2007;43:2736-2746.

Roninson IB, Broude EV, Chang B. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Update* 2001;4:303-13.

Rosch S, Ramer R, Brune K, Hinz B. Prostaglandin E2 induces cyclooxygenase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1171-1178.

Ros J, Clària J, To-Figueiras J, Planagumà A, Cejudo-Martín P, Fernández-Varo G, Martín-Ruiz R, Arroyo V, Rivera F, Rodes J, Jiménez W. Endogenous cannabinoids: a new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:85-93.

Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br J Pharmacol* 2003;140:790–801.

Rossig L, Hermann C, Haendeler J, Assmus B, Zeiher AM, Dimmeler S. Angiotensin II-induced up-regulation of MAP Kinase phosphatase-3 mRNA levels mediated endothelial cell apoptosis. *Basic Res Cardiol* 2002;97:1-8.

Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1998;273:10232-10239.

Rouzer CA, Ghebreselasie K, Marnett LJ. Chemical stability of 2-arachidonoylglycerol under biological conditions. *Chem Phys Lipids* 2002;119:69-82.

Romero J, Garcia L, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. *Neuroendocrinol Letts* 1994;16:159-164.

Rowley JT, Rowley PT. Tetrahydrocannabinol Inhibits Adenil Cyclase in Human Leukemia Cells. *Life Sciences* 1990;46:217-222.

Rudolph MI, Boza Y, Yefi R, Luza S, Andrews E, Penissi A, Garrido P, Rojas IG. The Influence of Mast Cell Mediators on Migration of SW756 Cervical Carcinoma Cells. *J Pharmacol Sci* 2008;106:208-218.

Rueda D, Navarro B, Martinez-Serrano A, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell defferentiation through attenuation of the Raf1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem* 2002;277:46645-46650.

Ruh MF, Taylor JA, Howlett AC, Welshons WV. Failure of cannabinoid compounds to stimulate estrogen receptors. *Biochem Pharmacol* 1997;53:35-41.

Ruiz L, Miguel A, Diaz-Laviada I. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett* 1999;458:400-404.

Russo E. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses* 2006a;458:400-404.

Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses* 2006b;66(2):234-46.

Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007;152:1092-1101.

Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, Garcia S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 2009;119:1359-1372.

Samuels Y, Diaz LA, Jr Schmidt-Kittler O, Cummins JM, DeLong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Mutant PI3K3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005;7:561-73.

Sánchez C, Velasco G, Guzmán M. Delta9-tetrahydrocannabinol stimulates glucose utilization in C6 glioma cells. *Brain Res* 1997a;767:64-71.

Sánchez C, Galve-Roperh I, Canova C, Brachet P, Guzmán M. Delta9-Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 1998a;436:6-10.

Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes. *Mol Pharmacol* 1998b;54:834-843.

Sánchez C, Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramón y Cajal S & Guzmán M. Inhibition of Glioma Growth *in Vivo* by Selective Activation of the CB2 Cannabinoid Receptor. *Cancer Research* 2001a;61:5784-5789.

Sánchez C, Rueda D, Segui B, et al. The CB1 cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol* 2001b;59:955-9.

Sánchez MG, Ruiz-Llorente L, Sánchez AM, Diaz-Laviada I. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signalling* 2003a;15:851-9.

Sánchez MG, Sánchez AM, Ruiz-Llorente L, Diaz-Laviada I. Enhancement of androgen receptor expression induced by (R)-methanandamide in prostate LNCaP cells. *FEBS Lett* 2003b;555:561-566.

Sanchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:311-321.

Sancho R, de la Vega L, Appendino G, Di Marzo V, Macho A, Muñoz E. The CB1/VR1 agonist arvanil induces apoptosis through and FAAD/caspase-8-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology* 2003;140:1035-1044.

Sandhu C, Slingerland J. *Cancer Detect Prev* 2000;24:107-118.

Santoro A, Pisanti S, Grimaldi C, Izzo AA, Borrelli F, Proto MC, Malfitano AM, Gazzo P, Laezza C, Bifulco M. Rimonabant inhibits human colon cancer cell growth and reduces the formation of precancerous lesions in the mouse colon. *Int J Cancer* 2009;125:996-1003.

Sarafian TA, Kouyoumjian S, Khoshaghdeh F, Tachkin DP, Roth MD. Delta9-Tetrahydrocannabinol disrupts mitochondrial function and cell energetic. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002a;284:L298-L306.

Sarafian TA, Kouyoumjian S, Tashkin D, Roth MD. Synergistic cytotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol and butylated hydroxyanisole. *Toxicology Letters* 2002b;133:171-179.

Saraste A, Pulkki K. *Cardiovasc Res* 2000;45:528-537.

Sarfraz S, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Cannabinoid Receptor as a Novel Target for the Treatment of Prostate Cancer. *Cancer Res* 2005;65(5):1635-1641.

Sarfraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H. Cannabinoid Receptor Agonist-induced Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells LNCaP Proceeds through Sustained Activation of ERK1/2 Leading to G1 Cell Cycle Arrest. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:39480-39491.

Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I. Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Letters* 2000;472:39-44.

Sarker KP, Biswas KK, Yamakuchi M, Lee KY, Hahiguchi T, Kracht M, Kitajima I, Maruyama I. ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death *J Neurochem* 2003a;85:50-61.

Sarker KP, Maruyama I. Anandamide induces cell death independently of cannabinoid receptors or vanilloid receptor 1: possible involvement of lipid rafts. *Cell Mol Life Sci* 2003b;60:1200-1208.

Sarnataro D, Grimaldi C, Pisanti S, Gazzero P, Laezza C, Zurzolo C, Bifulco M. Plasma membrane and lysosomal localization of CB1 cannabinoid receptor are dependent on lipid rafts and regulated by anandamide in human breast cancer cells. *FEBS Lett* 2005;579(28):6343-9.

Sarnataro D, Pisanti S, Santoro A, Gazzero P, Malfitano AM, Laezza C, Bifulco M. The Cannabinoid CB1 Receptor Antagonist Rimonabant (SR141716) Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation through a Lipid Raft-Mediated Mechanism. *Molecular Pharmacology* 2006;70:1298-1306.

Saunders CI, Kunde DA, Crawford CA, Geraghty DP. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* 2007;44:1429-1435.

Savinainen JR, Järvinen T, Laine K, Laitinen J. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB1 receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br J Pharmacol* 2001;134:664-72.

Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. 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* 1999;64:193-198.

Saxena S, Banerjee M, Shirumalla RK, Ray A. Ceramide kinase: a potential anti-inflammatory target? *Curr Opin Invest Drugs* 2008;9:455-462.

Scheid MP, Duronio V. Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/Akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7439-44.

Schenck M, Carpinteiro A, Grassme H, Lang F, Gulbins E. Ceramide: physiological and pathological aspects. *Arch Biochem Biophys* 2007;462:171-175.

Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 2000;103(2):211-225.

Schlumberger MJ, Filetti S, Hay ID. Nontoxic goiter and thyroid neoplasia. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS (editors). *Williams Textbook of Endocrinology*. 10th ed. New York: Elsevier, 2003. p.457-90.

Schmidt EE, Ichimura K, Reifenberger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 1994;54:6321-4.

Schmidt PC, Wold LE, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. Anandamide and other N-acyl ethanolamines in human tumors. *Lipids* 2002;37:907-912.

Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF- κ B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med* 1999;5:554-9.

Schultz LB, Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol* 1999;11:429-34.

Simon WE, Pahnke VG, Holzel F. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:1243-1249.

Sherman S. Thyroid carcinoma. *Lancet* 2003;361:501-11.

Sherr CJ. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell* 1994;79:551-555.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274:1672-1677.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-1512.

Sheskin T, Hanus L, Slager J, Vogel Z, Mechoulam R. Structural requirements for binding of anandamide-type compounds to the brain cannabinoid receptor. *J med Chem* 1997;40:659-667.

Shi Y, Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, Parhar RS, Al-Makhalafi Z, Al-Mohanna FA. Cannabinoid 2 receptor induction by IL-12 and its potencial as a therapeutic target for the treatment of anaplastic carcinoma. *Cancer Gene Therapy* 2008;15:101-107.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999;399:483-487.

Shintani Y, Ohta M, Hirabayashi H, Tanaka H, Iuchi K, Nakagawa K, et al. New prognostic indicator for non-small-cell lung cancer, quantitation of thymidylate synthase by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 2003;104:790-5.

Shiu RPC, Iwasiov BM. Prolactin-inducible proteins in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1985;260:11307-11313.

Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends Biochem Sci* 2004;29:486-494.

Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:989-999.

Singh SV, Srivastava SK, Choi S, Lew KL, Antosiewicz J, Xiao D, Zeng Y, Watkins SC, Johnson CS, Trump DL, et al. Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells as initiated by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2005;280:19911-19924.

Sing J, Budhiraja S. Therapeutic potential of cannabinoid receptors ligands: current status. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28(3):177-83.

Sirica AE. *Hepatology* 2005;41:5-15.

Smart D, Jerman JC. Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. *Trends Pharmacol* 2000;21:134.

Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 2000;129:227-230.

Smith PB, Welch SP, Martin BR. Interactions between delta 9-tetrahydrocannabinol and kappa opioids in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;268:1381-87.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW. Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK *in vivo*. *J Biol Chem* 1999;274:2893-8.

Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 2003;3:247-258.

Southall MD, Li T, Ghairbova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:217-222.

Spiegel S, Milstien S. Critical role of acylglycerol kinase in epidermal growth factor-induced mitogenesis of prostate cancer cells. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 6):1362-5.

Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2008a;26:57-79.

Spolski R, Leonard WJ. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 2008b;20:295-301.

Sprague J, Harrison C, Rowbotham DJ, Smart D, Lambert DG. Temperature-dependent activation of recombinant rat vanilloid VR1 receptors expressed in HEK293 cells by capsaicin and anandamide. *Eur J Pharmacol* 2001;423:121-125.

Stark GR, Taylor WR. Analysing the G2-M checkpoint. *Methods Mol Biol* 2004;280:51-82.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997;388:773-778.

Stockier M, Wilcken NR, Ghersi D, Simes RJ. Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2000;26:151-68.

Strasser A, Connor LO, Dixit VM. *Annu Rev Biochem* 2000;69:217-245.

Subbaramaiah K, Chung W, Dannenberg A. Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. evidence for involvement of extracellular signal-regulated kinase/c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1998;273:32943-32949.

Sugimoto T, Takeyama A, Xiao C, Takano-Yamamoto T, Ichikawa H. Electron microscopic demonstration of nick end-labeled DNA fragments during capsaicin-induced apoptosis of trigeminal primary neurons in neonatal rats. *Brain Res* 1999;818:147-152.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;215:89-97.

Sun Y, Alexander SP, Garle MJ, Gibson CL, Hewitt K, Murphy SP, Kendall DA, Bennett AJ. Cannabinoid activation of PPAR α ; a novel neuroprotective mechanism. *Br J Pharmacol* 2007;152:734-743.

Süsse S, Scholz CJ, Burkle A, Wiesmüller L. Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res* 2004;32:669-80.

Svensson AC, Johansson M, Persson E, Carchenilla MSC, Jacobsson SOP. Expression of functional CB1 cannabinoid receptors in retinoic acid-differentiated P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurosci Res* 2006;83:1128-1140.

Swanton C, et al. Regulators of mitotic arrest and ceramide metabolism are determinants of sensitivity to paclitaxel and other chemotherapeutic drugs. *Cancer Cell* 2007;11:498-512.

Taya Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci* 1997;22:14-17.

Taloczy Z, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:190-195.

Tepper AD, de Vries E, van Blitterswijk WJ, Borst J. Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage induced apoptosis. *J Clin Invest* 1999;103:971-978.

Terzoudi GI, Manola KN, Pantelias GE, Iliakis G. Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in Ataxia Telengectasia cells. *Cancer Res* 2005;65:11292-6.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365:687-701.

Troppmair J, Bruder JT, Munoz H, et al. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation by oncogenes, serum, and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate requires Raf and is necessary for transformation. *J Biol Chem* 1994;269:7030-5.

Tucci SA, Halford JC, Harrold JA, et al. Therapeutic potential of targeting the endocannabinoids: implications for the treatment of obesity, metabolic syndrome, drug abuse and smoking cessation. *Curr Med Chem* 2006;13:2669-80.

Tucker AN, Friedman MA. Effects of cannabinoids on L1210 murine leukemia. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1977;17(4):703-714.

Tritton TR, Hickman JA. TITULO. *Cancer Cells* 1990;2:95-105.

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203-212.

Untergasser G, Rumpold H, Hermamm M, Dirnhofer S, Jilg G, Berger P. Proliferative disorders of the aging human prostate: involvement of protein hormones and their receptors. *Exp Gerontol* 1999;34:275-287.

Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D. Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 2005;144:1032-1036.

Vader G, Medema RH, Lens SMA. The chromosomal passenger complex: guiding Aurora B through mitosis. *J Cell Biol* 2006;173:833-7

Vagnarelli P, Earnshaw W. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* 2004;113:211-22.

Vajkoczy P, Farhadi M, Gaumann A, et al. Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF receptor-2, and angiopoietin-2. *J Clin Investig* 2002;109:777-85.

Valle JR, Lapa AJ, Barros GG. Pharmacological activity of cannabis according to the sex of the plant. *J Pharm Pharmacol* 1968;20(10):798-9.

Vanags DM, Larsson P, Feltenmark S, Jakobsson PJ, Orrenius S, Claesson HE, Aguilar-Santelises M. TITULO. Cell Death Differ 1997;4:479-486.

Van Dross RT. Metabolism of Anandamide by COX-2 is Necessary for Endocannabinoid-Induced Cell Death in Tumorigenic Keratinocytes. Molecular Carcinogenesis 2009;48:724-732.

Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. J Biol Chem 2004;279:34643-34654.

Velasco L, Ruiz L, Sánchez MG, Diaz-Laviada I. Delta(9)-Tetrahydrocannabinol increases nerve growth factor production by prostate PC-3 cells. Involvement of CB1 cannabinoid receptor and Raf-1. Eur J Biochem 2001;268:531-535.

Velasco G, Galve-Roperh I, Sánchez C, Blázquez C, Guzmán M. Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? Neuropharmacology 2004;47:315-323.

Velasco G, Carracedo A, Blázquez C, Lorente M, Aguado T, Haro A, Sánchez C, Galve-Roperh I, Guzmán M. Cannabinoids and Gliomas. Mol Neurobiol 2007;36(1):60-67.

Veldhuis WB, van der Stelt M, Wadman MW, et al. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against *in vivo* excitotoxicity in the rat: Role of vanilloid receptors and lipoxygenases. J Neurosci 2003;23:4127-33.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif 2003;36:165-175.

Vidinský B, Gál P, Mojzis J. Different views on the association between cannabinoids and cancer. *Cas Lek Cesk* 2006;145(6):453-7.

Vieira JE, Abreu IC, Valle JR. On the pharmacology of the hemp seed oil. *Med Pharmacol Exp Int J Exp Med* 1967;16(3):219-224.

Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G, et al. upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11:1569-1579.

Viglietto G, Romano A, Manzo G, Chiappetta G, Paoletti I, Califano D, Galati MG, Mauriello V, Bruni P, Lago CT, et al. Upregulation of the angiogenic factors PIGF, VEGF and their receptors (Flt-1, Flk-1/KDR) by TSH in cultured thyrocytes and in the thyroid gland of thiouracil-fed rats suggest a TSH-dependent paracrine mechanism for goiter hypervascularization. *Oncogen* 1997;15:2687-2698.

Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschilis P, Bellacosa A, Fusco A, Santero M. Cytoplasmic relocalization and inhibition of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136-1144.

Vignot S, Besse B, de la Motte Rouge T, Massard C, Spano JP, Karila L. Cannabis and cancer. *Bull Cancer* 2006;93(2):163-70.

Von Bueren AO, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Delta(9)-tetrahydrocannabinol Inhibits 17 β -Estradiol-induced Proliferation and Fails to Activate Androgen and Estrogen Receptors in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Research* 2008;28:85-90.

Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 1997;390:518-521.

Wagner JA, Varga K, Jarai Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 1999;33:429-34.

Wagner LM, Danks MK. New therapeutic targets for the treatment of high-risk neuroblastoma. *J Cell Biochem* 2009;107(1):46-57.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K & Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 2003;23:1398-1405.

Walsh D, Nelson KA, Mahmoud, FA. Established and potential therapeutic applications of cannabinoids in oncology. *Support Care Cancer*. 2003;11:137-143.

Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. Down-regulation of prostate-specific antigen expression by finasteride through inhibition of complex formation between androgen receptor and steroid receptor-binding consensus in the promoter of the PSA gene in LNCaP cells. *Cancer Res* 1997;57:714-9.

Wang JF, Milosveski V, Schramek C, Fong GH, Becks GP, Hill DJ. Presence and possible role of vascular endothelial growth factor in thyroid cell growth and function. *J Endocrinol* 1998;157:5-12.

Ward C, Dransfield I, Murray J, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. Prostaglandin D2 and its metabolites induce caspase-dependent granulocyte apoptosis that is mediated via inhibition of kappa B alpha degradation using a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-independent mechanism. *J Immunol* 2002;168:6232-6243.

Weidenfeld J, Feldman S, Mechoulam R. Effect of the Brain Constituent Anandamide, a Cannabinoid Receptor Agonist, on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in the Rat. *Neuroendocrinology* 1994;59:110-112.

Weigmann K, Schütze S, Machledt R, et al. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 1994;78:1005-15.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81:323-330.

Wenger T, Toth B, Martin BR. Effects of anandamide (endogen cannabinoid) on anterior pituitary hormone secretion in adult ovariectomized rats. *Life Sci* 1995;56:2057-2063.

Wenger T, Jamali KA, Juaneda C, Leonardelli J, Tramu G. Arachidonyl Ethanolamide (Anandamide) Activates the Parvocellular Part of Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:724-728.

Werneburg NW, Guicciardi ME, Bronk SF, Kauffmann SH, Gores GJ. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activates a lysosomal pathway of apoptosis that is regulated by Bcl-2 proteins. *J Biol Chem* 2007;282:28960-28970.

Widmer M, Hanemann CO, Zajicek J. High Concentrations of Cannabinoids Activate Apoptosis in Human U373MG Glioma Cells. *Journal of Neuroscience Research* 2008;86:3212-3220.

Wilcken NR, Gebiski VJ, Pike R, Keech AC. Putting results of a clinical trial into perspective. *Med J AUst* 2007;186:368-70.

Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med* 2004;10:145-7.

Willett CG, Czito BG, Bendell JC, Ryan DP. Locally advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:4538-4544.

Winnicka MM, Zbucki RL, Dadan J, Sawicki B, Hryniewicz A, Kosiorek P, Bialuk I, Puchalski Z. An immunohistochemical study of the thyroid parafollicular (C) cells in rats treated with cannabinoids – preliminary investigations. *Folia Morphol* 2003;62(4):419-421.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139:1281-1292.

World Health Organization (WHO). Cannabis: a health perspective and research agenda. Geneva: WHO, 1997.

WHO, 2003. Expert Committee on Drug Dependence. WHO Technical Report Series 915, Thirty-third Report, Geneva, Switzerland.

Würtz SO, Schrohl AS, Moller-Sorensen N, Lademann U, Chirstensen IJ, Mouridsen H, Brüner N. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2005;12:215-227.

Yancopoulos GD, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-248.

Yan T, Desai AB, Jaccoberger JW, Sramkoski RM, Loh T, Kinsella TJ. CHK1 and CHK2 are differentially involved in mismatch repair-mediated 6-thioguanine-induced cell cycle checkpoint responses. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1147-57.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. TITULO. *Cell* 1995;2:285-291.

Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanism and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001;37:S3-S8.

Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005;8:86-94.

Ying J, Li H, Chen YW, Srivastava G, Gao Z, Tao Q. WNT5A is epigenetically silenced in hematologic malignancies and inhibits leukemia cell growth as a tumor suppressor. *Blood* 2007;110:4130-4132.

Ying J, Li H, Yu J, Ng KM, Poon FF, Wong SC, Chan AT, Sung JJ, Tao Q. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:55-61.

Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan, J. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 1997;272:19943-19950.

Yip-Schneider MT, Barnard DS, Billings SD, Cheng L, Heilman DK, Lin A, Marshall SJ, Crowell PL, Marshall MS, Sweeney CJ. Cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2000;21:139-146.

York RD et al. Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 1998;392:622-626.

Yousefi S, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006;8:1124-1132.

Yujuri T, Ware M, Widman C, Oyer R, Russell D, Chan E, et al. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7272-7277.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Sciences* 1995;270:1326-31.

Xiao Z, Chen Z, Gunasekera AH, Sowin TJ, Rosenberg SH, Fesik S, Zhang H. Chk1 mediates S and G2 arrest through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging events. *J Biol Chem* 2003;278:21767-21773.

Xiao Z, Xue J, Semizarov D, Sowin TJ, Rosenberg SH, Zhang H. Novel indication for cancer therapy: Chk1 inhibition sensitizes tumor cells to antimetabolites. *Int J Cancer* 2005;115:528-38.

Xu J, Yeh CH, Chen S, et al. Involvement of *de novo* ceramide biosynthesis in tumor necrosis factor- α /cycloheximide-induced cerebral endothelial cell death. *J Biol Chem* 1998;273:16521-6.

Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C, London E. TITULO. *J Biol Chem* 2001;276:33540-33546.

Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J, Fan W, Li Q, Wang Q, Zhong D, Miao X. Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2006;171:31-38.

Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, et al. Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis. *Lab Invest* 2000;80:837-49.

Zanella MT, Faiçal S. Hiperfunção da medula adrenal - Feocromocitoma. *In* Ramos OL, Rothschild HA (eds): *Atualização terapêutica*, 16^a ed. São Paulo, Artes Médicas, 1993; 447-8.

Zarubin T, Han J. Activation and signalling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15:11-18.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996;87(4):619-28.

Zhai L, Chaturvedi D, Cumberledge S. Drosophila Wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *J Biol Chem* 2004;273:33220-33227.

Zhang X, Wang JF, Kunos G, Groopman JE. Cannabinoid modulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection and transformation. *Cancer Res* 2007;67(15):7230-7.

Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14795-14800.

Zhao S, Yang YN, Song JG. Ceramide induces caspase-dependent and-independent apoptosis in A-431 cells. *J Cell Physiol* 2004;199:47-56.

Zhong WB, Liang YC, Wang CY, Chang TC, Lee WS. Lovastatin suppresses invasiveness of anaplastic thyroid cancer cells by inhibiting Rho geranylgeranylation and RhoA/ROCK signaling. *Endocrine-Related Cancer* 2005;12:615-629.

Zhou BB, Bartek J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 2004;4:216-225.

Zhu LX, Sharma S, Stolina M, Gardner B, Roth MD, Tashkin DP, Dubinett SM. Delta-9-Tetrahydrocannabinol inhibits antitumor immunity by a CB2 receptor-mediated, cytokine-dependent pathway. *J Immunol* 2000;165:373-380.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Sweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000;192:1001-1014.

Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E, Karniol IG. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta-9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology* 1982;76:245-250.

Zuardi AW, Rodrigues JA, Cunha JM. Effects of cannabidiol in animal models predictive of antipsychotic activity. *Psychopharmacology* 1991;104(2):260-4.

Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Pinto JP, Chagas MH, Rodrigues GG, Dursun SM, Tumas V. Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol* 2009;23(8):979-83.

Zygmunt PM, Peterson J, Anderson DA, Chuang H-H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 1999;400:452-457.

ABSTRACT

10- ABSTRACT

Objective: To evaluate, through a systematic review of the literature, the antitumoral effects of cannabinoids on any type of cancer, involving both human beings and animal samples, as well as cultured tumor cells. **Method:** Research included the following electronic databases: PUBMED, EMBASE, LILACS and "The Cochrane Collaboration Controlled Trials Register. All published studies involving the antitumoral effects (cellular and molecular mechanisms) of cannabinoids were considered for this review. Thus, not only clinical trials (randomized or not) but experimental studies (both *in vivo* and *in vitro*) were taken into account. The bibliography search strategy included all publications of each of these databases until December 31, 2009. The scrutiny of all the references from the relevant articles for this review (which included review articles) was also performed, in order to select items that could not have been captured by the chosen electronic search strategy. **Results:** From 3,920 initially identified articles, 117 fulfilled the inclusion criteria for this review. All the studies included in this systematic review were experimental (*in vivo* and/or *in vitro*), except for a pilot clinical trial phase I/II involving humans. In all experimental studies included, cannabinoids exerted antitumoral activity *in vitro* and/or antitumoral evidence *in vivo* in several models of tumor cells and tumors, respectively. The antitumor activity included: antiproliferative effects (cell cycle arrest), decreased viability and cell death by toxicity, apoptosis, necrosis, autophagy, as well as antiangiogenic and antimigratory effects. Antitumoral evidence included: reduction in tumor size, antiangiogenic, and antimetastatic effects. Additionally, most of the studies described that the cannabinoids exercised selective antitumoral action in several distinct tumor models. Furthermore, normal cells used as controls were not affected. The safety factor in the cannabinoids' administration has also been demonstrated *in vivo* in rats with tumors which were marked with tumor cells. The sole study in humans demonstrated safety in intratumoral administration of delta-9-THC in patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Conclusions:** The various cannabinoids tested in multiple tumor models showed antitumoral effects both *in vitro* and *in vivo*. These findings indicate that cannabinoids are promising

compounds for the treatment of cancer. However, methodologically well conducted research on humans through clinical trials has yet to be performed in order to evaluate their effectiveness. This is the case of delta-9-THC and cannabidiol, which have been tested and approved for use in humans in other clinical conditions. In the case of other cannabinoids, however, further pharmacokinetic as well as pharmacodynamic and toxicological studies are required before their being tested in humans.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

11. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. São Paulo; 2005.