

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS -

FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Efeitos do canabinóide oleiletanolamida e seu derivado sintético em células de melanoma

Priscila Antiqueira dos Santos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto e co-orientação do Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery do Instituto de Ciências Biológicas.

RIO GRANDE, SETEMBRO DE 2013.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pois acredito que sem a permissão e ajuda Dele não podemos fazer nada. Afinal, o que seria de nós sem fé, não é mesmo?

Aos meus pais (Valmor e Alice), minha tia (Ana) minhas irmãs (Daniela e Angélica), meu namorado (Hadrisson) e a toda minha família que me apoiaram para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À professora Ana Paula de Souza Votto, minha orientadora, pela paciência e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão, e também pela confiança que depositou em mim aceitando me orientar em uma corrida contra o tempo, com apenas 9 meses restantes para a conclusão do Mestrado. Correria! Sinto-me feliz por ter feito esta escolha e por ter dado tão certo! Sinto-me feliz por ter encontrado nela mais que uma orientadora, por ter encontrado nela uma amiga.

Ao professor Luiz Eduardo Maia Nery, meu co-orientador, que aceitou também participar dessa corrida contra o tempo me dando total apoio e suporte, e, acima de tudo, confiando e acreditando que seria possível a realização deste trabalho. E pela sua amizade.

A todos os professores do curso de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

À Daza, por estar sempre dando uma ajudinha e uma opinião durante todo o processo, pelas conversas, pela amizade.

À professora Gilma, por contribuir tanto conosco sempre, por ser uma excelente pessoa, tanto profissional como pessoalmente. Por ter sempre uma visão ampla dos projetos e trabalhos, e conseguir enxergar beleza em tudo que se faz. Por

ter um coração enorme, por apoiar a todos e por podermos sentir nela a vontade de ver cada uma de nós crescer e nossas estrelinhas brilharem!

Ao pessoal do Laboratório de Cultura Celular da FURG, e aos demais, que fazem parte do dia-a-dia, pelo maravilhoso ambiente de trabalho.

Ao Márcio, por manter nosso laboratório organizado e pelas conversas engraçadas.

Ao pessoal da salinha 2, que proporciona um ambiente agradável, momentos de descontração e apoio nos momentos tensos!

Aos meus colegas e amigos que trago da graduação, Geny, Fernanda, Roberta, Marcelo, Simone e Marcela pelas conversas, descontração, apoio, ajuda ou por dizerem aquelas palavrinhas que a gente precisa ouvir às vezes. Também por escutar quando a gente precisa desabafar!

Às amigadas que eu fiz na pós, Anahy, Milene, Regina, Bruna, Tábata, Maiara, Michele, Renatinha, Vinicius, Laís, Cássia (e me perdoem se eu esqueci alguém, não briguem comigo!)

À Maria, pela simpatia e carinho, e pelos chazinhos feitos especialmente pra mim!

À Glauce, que eu incomodei diversas vezes, pela 'supervisão' constante no laboratório de Citologia.

À minha banca, que aceitou o trabalho com pouco tempo de antecedência, e se dispôs a contribuir com este trabalho!

Aos meus amigos em colegas em geral, pois certamente cada um teve sua participação especial na minha estrada até aqui!

ÍNDICE

RESUMO GERAL	5
INTRODUÇÃO GERAL	6
OBJETIVOS	12
<i>Objetivo Geral</i>	12
<i>Objetivos específicos</i>	12
Artigo	13
Abstract	14
Introduction	15
Materials and Methods	17
<i>Cell culture</i>	17
<i>Synthesis of Compounds</i>	17
<i>Cells and treatments with oleoyl ethanolamide (OEA) and oleic pyrazoline (OPZ)</i>	18
<i>Cellular viability</i>	19
<i>Quantitative analysis of apoptosis and necrosis</i>	20
<i>Assessment of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) formation</i>	20
<i>α-tocopherol</i>	21
<i>Statistical analysis</i>	21
Results	21
<i>OEA</i>	21
<i>OPZ</i>	22
<i>ROS</i>	23
<i>Apoptosis and Necrosis</i>	24
<i>α - tocoferol</i>	25
Discussion	26
Acknowledgements	28
References	28
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

RESUMO GERAL

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer da pele de pior prognóstico. Assim, a prevenção e a detecção precoce são as medidas de maior sucesso contra esta patologia, já que os tratamentos disponíveis são escassos e, quando em estágio avançado da doença, pouco eficientes. Logo, é importante encontrar tratamentos alternativos mais eficazes. Entre as diferentes substâncias em estudo para uso como quimioterápicos, se destacam as substâncias canabinóides que podem apresentar um perfil de segurança, por seus receptores serem expressos em locais específicos, como na pele, principalmente em células de melanoma. Outro grupo de compostos que podem exercer efeitos importantes sobre os organismos são os pirazolínicos trialometilados, que foram relatados por ter uma ampla gama de aplicações na farmacologia. Ainda, diversos estudos demonstraram que os canabinóides e os compostos pirazolínicos trialometilados podem exercer os seus efeitos através da geração de ROS. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o envolvimento da produção de ROS nos efeitos do endocanabinóide oleiletanolamida (OEA) e do seu análogo pirazolínico denominado pirazolina oléica (OPZ) em células de melanoma da linhagem B16F10. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado. As concentrações de OEA e OPZ utilizadas foram 50, 125, 250, 375 e 500 μM , e os grupos controles receberam os mesmos veículos utilizados para solubilizar os compostos em cada situação experimental. Foram realizados testes de viabilidade celular utilizando o ensaio colorimétrico de MTT, e avaliação de apoptose e necrose por microscopia de fluorescência. A geração intracelular de ROS foi avaliada por fluorimetria. Além disso, α -tocoferol foi utilizado como padrão antioxidante para avaliar o envolvimento de ROS na resposta celular. Os resultados obtidos mostraram diminuição na viabilidade celular, com indução de apoptose e necrose, e aumento da geração de ROS com a utilização da OEA. Já a OPZ causou aumento na proliferação celular e diminuição de ROS. Além disso, os efeitos do OEA na viabilidade celular foram diminuídos com a inibição na geração de ROS por α -tocoferol. Assim, é possível sugerir o envolvimento da geração de ROS no efeito da OEA nas células da linhagem B16F10.

Palavras chave: viabilidade celular, apoptose, linhagem celular B16F10, oleil etanolamida, pirazolina oleica, espécies reativas de oxigênio.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, o câncer é um dos maiores causadores de mortes no Brasil e no mundo. No Brasil, esta patologia representa a segunda maior causa de óbito na população humana adulta (Revista da Associação Médica Brasileira, 2004). O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado (tumorogênese) e disseminação de células anormais e pode ser causado por fatores externos - tabaco, organismos infecciosos, produtos químicos, radiação - e fatores internos - mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem no metabolismo. Esses fatores podem agir isolados, em conjunto ou em sequência na iniciação ou promoção da carcinogênese (American Cancer Society, 2011). No Brasil, o câncer da pele é o tipo de câncer mais frequente, representando 25% do total de casos. Entre esses, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas, sendo, porém o mais grave, por ter uma alta capacidade de metástase (INCA, 2013), e por este motivo é considerado também o maior causador de mortes por câncer da pele no mundo (Thompson et al., 2005, Garbe e Leiter, 2009). O melanoma cutâneo é um tipo de câncer da pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina) e tem predominância em adultos caucasianos. Atualmente a prevenção e a detecção precoce são as medidas de maior sucesso contra esse tipo de câncer, já que os tratamentos disponíveis são bastante escassos, sendo os tratamentos quimioterápicos atuais pouco eficientes (Blázquez et al., 2006). Sendo assim, é de extrema importância encontrar substâncias e tratamentos mais eficazes que impeçam ou diminuam a proliferação do melanoma, principalmente em seus estágios mais avançados.

Dentre as diferentes substâncias em estudo para uso como quimioterápico se destacam as substâncias canabinóides (Velasco et al 2012). Os canabinóides são substâncias lipídicas originalmente identificadas na planta *Cannabis sativa* com efeitos psicoativos. Aproximadamente 70 substâncias canabinóides já foram identificadas a partir do extrato dessa planta, mas dentre elas a mais abundante e considerada como representativa do grupo é a $\Delta(9)$ -tetraidrocanabinol (THC) (Pertwee, 2008).

Entre as aplicações terapêuticas típicas sugeridas para o THC, estão a redução de inflamação, asma e alguns tipos de dor crônica e estimulação do apetite em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia (Mechoulam, 1986). Além disso, a

possibilidade de que as substâncias como o THC possam ser utilizados como fármacos anti-tumorais tem sido explorada há muito tempo (White et al., 1976). Partindo deste conhecimento, é razoável supor que os fármacos obtidos a partir de derivados de ácidos graxos canabinóides - ou que tenham capacidade de mimetizá-los - possam ser utilizados para a cura ou alívio de tais condições patológicas.

Desde a identificação dessas substâncias nas décadas de 60 e 70, várias substâncias análogas têm sido sintetizadas e utilizadas como fármacos com vários efeitos medicinais (Honório et al., 2006). Estas substâncias sintéticas exercem seus efeitos por mimetizar substâncias endógenas (Pacher et al., 2006).

A descoberta de duas substâncias canabinóides produzidas endogenamente, agora denominadas endocanabinóides, a anandamida (ou araquidonoil etanolamida [AEA] e sn-2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Pertwee, 2010; Mechoulam, 1995; Mechoulam, 2002) abriu uma nova linha de investigação científica a qual explicou, pelo menos em parte, o modo de ação dos canabinóides em geral e conduziu à identificação de outras substâncias endógenas derivadas de ácidos graxos saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas, como as derivadas de *N*-acil etanolamidas (NAEs), como a palmitoil etanolamida (PEA) e oleil etanolamida (OEA).

Tem sido verificado que estas substâncias canabinóides, sejam as de origem vegetal, sintéticas ou endógenas, podem exercer seus efeitos celulares através de ligações com receptores específicos canabinóides tipo 1 e 2 (CB₁ e CB₂) (Blásquez et al 2006). Esses receptores canabinóides foram identificados e localizados no Sistema Nervoso Central, tendo como principal fator contribuinte para essa descoberta, os análogos do $\Delta(9)$ -tetraidrocanabinol (Devane et al., 1988). Os canabinóides podem também exercer seus efeitos interagindo com receptores não específicos, como por exemplo, o receptor de potencial transiente vanilóide 1 (TRPV1) (Demuth e Molleman, 2006). É possível ainda, que os efeitos ocorram devido a sua solubilidade lipídica, através de associações diretas com enzimas do ambiente de membrana, principalmente com microdomínios de membrana ricos em colesterol, denominados de jangadas lipídicas ("lipid rafts") (Grimaldi e Capasso 2012). Estas servem para concentrar e organizar proteínas sinalizadoras que por sua vez, regulam o comportamento celular. Alguns estudos indicam que jangadas lipídicas transmitem sinais letais de endocanabinóides em células tumorais (Scuderi et al., 2011). Os

receptores canabinóides são reconhecidos como componentes vitais do sistema, através do qual os canabinóides e endocanabinóides geralmente, mas não exclusivamente, exercem os seus efeitos.

Segundo alguns autores palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA) não exercem seus efeitos através de ligação com os receptores canabinóides específicos CB₁ e CB₂ (Schmid e Berdyshev, 2002). Por este motivo, em alguns trabalhos PEA e OEA são consideradas atualmente como “endocanabinóides-like” (Fonseca et al., 2013) e de acordo com Pertwee et al. (2010) a OEA ativa os receptores TRPV1, que podem vir a ser considerados como receptor CB₃ no futuro.

A potencial aplicação das substâncias canabinóides como fármacos antitumorais baseia-se nos efeitos de diminuição na proliferação e sobrevivência celular (Bifulco et al., 2006; Sarfaraz et al., 2008), bem como por terem uma capacidade de inibir o crescimento e a angiogênese de alguns tipos de xenoinxertos de tumores em alguns modelos animais (Guzmán, 2003). Segundo Blázquez et al., (2006), células de melanoma expressam ativamente receptores canabinóides (CB₁ e CB₂), e a ativação desses receptores inibe o crescimento de células de melanoma *in vivo* e *in vitro*. Isso ocorre, ao menos em parte, pelo fato dos canabinóides pararem o ciclo celular na transição entre G1-S por meio da inibição da proteína Akt e hipofosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), impedindo o ciclo de se completar, logo, inibindo o crescimento e proliferação celulares. Ainda, foi sugerido recentemente que o aumento dos níveis de endocanabinóides e o bloqueio de sua degradação diminuem a viabilidade de células tumorais (Hamtiaux et al., 2012). Além disso, o grande interesse no uso de substâncias canabinóides como quimioterápicos também se baseia no fato deles apresentarem um perfil de segurança, não produzindo os efeitos citotóxicos generalizados dos quimioterápicos tradicionais, pelo fato de seus receptores serem expressos em locais específicos, como na pele, principalmente em células de melanoma (Guzmán, 2003). Endocanabinóides não são armazenados nas células como neurotransmissores clássicos, mas são rapidamente formados a partir de fosfolipídios de membrana quando necessário. O aumento da síntese endógena, o catabolismo de vários ligantes dentro de células e tecidos e o aumento das expressões de diferentes receptores parecem ser importantes para sinalização das cascatas pelas diferentes quinases. Essa sinalização resulta em efeitos pró-autofágicos, pró-

apoptóticos, anti-proliferativos ou anti-apoptóticos, e esses efeitos têm sido observados em alguns tecidos e células de câncer (Cudaback et al., 2010).

Porém, para que a utilização dos compostos canabionóides, e até mesmo a síntese de novos compostos canabinóides com maior eficácia como quimioterápicos seja realmente efetivada, o aumento do conhecimento acerca do seu mecanismo de ação na pele precisa ocorrer. Agentes antitumorais geralmente tendem a inibir o crescimento de células tumorais através da promoção de apoptose (Cudaback et al., 2010). Os mecanismos pelos quais os canabinóides induzem a apoptose não estão completamente conhecidos atualmente. Foram sugeridos diversos mecanismos que podem ser alterados por alguns fatores tais como diferenças nos tipos celulares, expressão do receptor, concentrações de agonistas disponíveis, entre outros, resultando em ativação de diferentes vias de sinalização (Salazar et al., 2009 ; Vara et al., 2011).

Já está relatada na literatura alguma relação entre receptores canabinóides e estresse oxidativo. Segundo Bifulco et al. (2008), a interação de canabinóides com receptores TRPV provoca ativação de mais de um mecanismo celular, como por exemplo, a ativação da via de apoptose mitocondrial, que ocorre juntamente com o aumento nos níveis de ROS, e conseqüente aumento nos níveis de estresse oxidativo. Também Carracedo et al. (2006) demonstraram que o tratamento de células pancreáticas tumorais com um canabinóide específico aumentou a expressão dos genes ATF-4 e TRB3 relacionados ao estresse oxidativo, entre outras vias, resultando em apoptose. Ainda, diversos estudos demonstraram que os canabinóides podem exercer os seus efeitos anti-proliferativos e induzir a morte celular dependente de ROS. A anandamida, por exemplo, levou ao aumento da produção de ROS em células tumorais (Massi et al., 2003; Sarker et al., 2003). Ainda, Jacobsson et al. (2001) demonstraram que os efeitos anti-proliferativos da anandamida e 2 - AG em células de glioma podem ser totalmente inibidos pelo antioxidante α -tocoferol (Jacobsson et al., 2001).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desbalanço da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e das defesas antioxidantes que venha a causar um dano no organismo, como, por exemplo, o aumento da taxa de superóxido e

geração de peróxido de hidrogênio ou também pela diminuição dos níveis de antioxidantes (Droge, 2002).

O efeito dos canabinóides na geração de EROs ou no sistema de defesa antioxidantes é controverso. Por vezes danos celulares induzidos por ROS são favorecidos pelos canabinóides, enquanto outras vezes observa-se um efeito protetor exercido pelos canabinóides para estes danos induzidos por ROS. Foi sugerido que esses efeitos opostos podem ser dependentes da concentração disponível de canabinóides. O papel dos receptores CB nos efeitos pró ou antioxidantes também não está claro, e tanto os efeitos dependentes como os independentes de receptores foram relatados por variar de acordo com diferentes tipos de canabinóides em um estudo sobre a oxidação de HDL no sangue (Zolese et al., 2005).

Entre os compostos que podem exercer efeitos importantes sobre os organismos através da geração de ROS estão também os compostos pirazolínicos trialometilados. Estes compostos foram relatados por ter uma ampla gama de aplicações na farmacologia, por suas propriedades antimicrobianas, analgésicas antinociceptivas, estimulatórias da secreção intestinal, antidepressivas, anticonvulsivantes, antipiréticas, anti-inflamatórias e hipofágicas (Nenajdenko e Balenkova, 2011; Sauzem et al., 2008).

O análogo canabinoíde pirazolínico utilizado neste trabalho é resultante da hibridização entre uma estrutura dita privilegiada (núcleo pirazolínico trifluormetilado) e a cadeia graxa de um composto endocanabinoíde derivado de ácidos graxos denominados *N*-aciletanolamidas (NAEs), a oleiletanolamida, (OEA) (Figura 1 e 2). Este novo composto foi denominado pirazolina oléica (OPZ) (Figura 3).

Diante do exposto acima, é relevante estudar o efeito da OEA bem como do seu análogo sintético (OPZ) nas células de melanoma afim de buscar elucidar a possível participação do estresse oxidativo na ação destas moléculas.

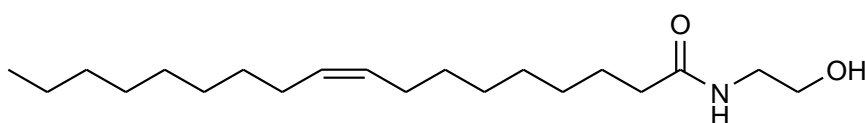


Figura 1. Estrutura molecular do endocanabinoíde oleiletanolamida (OEA).

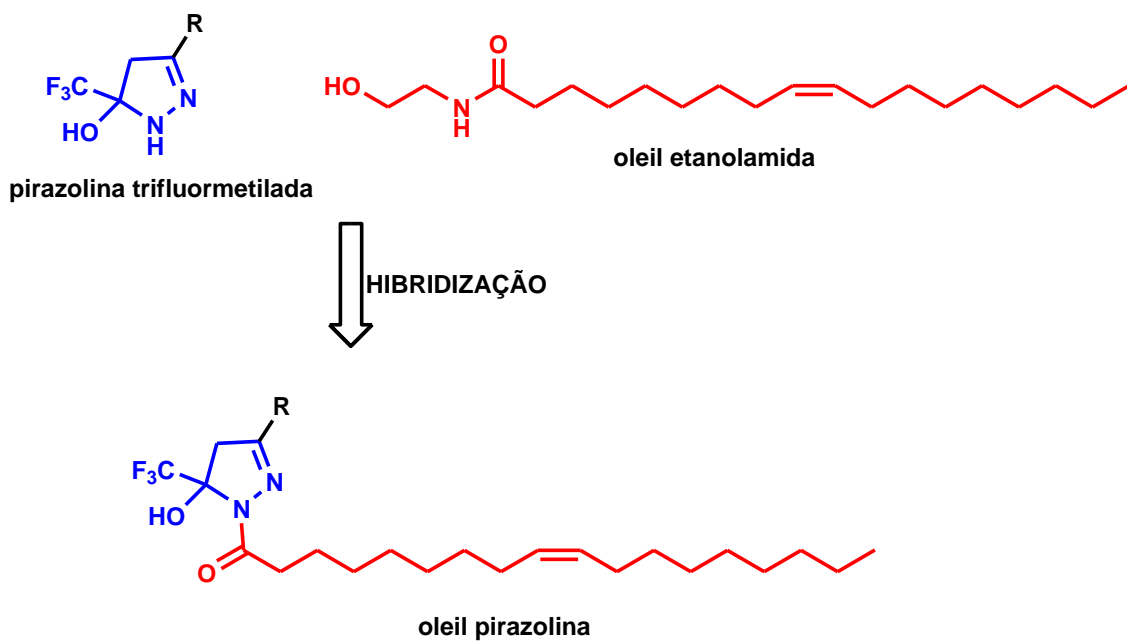


Figura 2. Desenho molecular dos análogos canabinóides pirazonilicos.

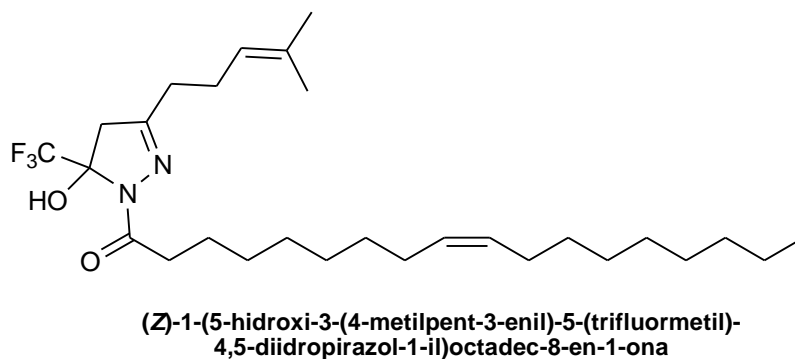


Figura 3. Análogo canabinóide pirazolínico sintético utilizado neste trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar o envolvimento da produção de ROS nos efeitos do endocanabinóide oleiletanolamida (OEA) e do análogo pirazonílico (OPZ) em células de melanoma.

Objetivos específicos

1. Investigar o efeito do composto pirazolínico sintético análogo de endocanabinóides (OPZ) na viabilidade celular, comparando com os efeitos do OEA;
2. Investigar se OEA e OPZ induzem o aumento de ROS nas células de melanoma;
3. Investigar se existe a dependência da geração de ROS para os efeitos na viabilidade celular em células de melanoma tratadas com OEA E OPZ.

Artigo a ser submetido à Revista Melanoma Research

**Involvement of reactive oxygen species in the oleoyl ethanolamide effects
and its synthetic derivative in melanoma cells**

Short title: Involvement of ROS in the OEA effects

Priscila Antiqueira-Santos^{1,2}, Daiane S. Santos³, Carolina L. Hack³, Marcelo G. M. D'Oca³, Luciana A. Piovesan³, Luiz Eduardo M. Nery^{1,2}, Ana Paula S. Votto^{1,2}

1 Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil

2 Laboratório de Cultura Celular, Instituto de Ciências Biológicas, FURG, Rio Grande, RS, Brazil

3 Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Escola de Química e Alimentos, FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Corresponding author: Ana Paula de Souza Votto

Phone/Fax: +55 53 32935192/ + 55 53 32336848

E –mail adress: anavotto@yahoo.com.br

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Zip Code: 96203-900

Rio Grande, RS, Brazil

Conflicts of interest: the authors declare no conflict of interest

Abstract

The objective of this work was to evaluate the involvement of ROS production in the effects of the endocannabinoid oleoyl ethanolamide (OEA) and its pirazolinic analogue denominated pyrazoline oleic (OPZ) in B16F10 melanoma cell line. The cells were maintained in DMEM medium supplemented with fetal bovine serum (10%), and antibiotic and antimycotic (1%). The OEA and OPZ concentrations used were 50, 125, 250, 375 and 500 μ M. It was evaluated cell viability using the MTT colorimetric assay, and apoptosis and necrosis by fluorescent microscopy. The generation of intracellular ROS was evaluated by fluorimetry. In addition, α -tocopherol antioxidant was used to evaluate the involvement of ROS in the cellular response. The results showed a decrease in cell viability, induction of apoptosis and necrosis, and increased generation of ROS by the use of the OEA. Already OPZ caused increased cell proliferation and decreased ROS. Moreover, the effects of OEA cell viability was decreased by inhibiting the generation of ROS by α -tocopherol. Thus, it is possible to suggest the involvement of ROS generation in the effect of OEA in the cell line B16F10. Considering the great need to find new substances that can fight melanoma and the lack of greater elucidation of the mechanisms of action of cannabinoids and their analogues this work provides new important information that stimulate new studies.

Keywords: cell viability, apoptosis, B16F10 cell line, oleic pyrazoline, oxidative stress.

Introduction

The search for more effective substances and treatments that prevent or reduce the melanoma proliferation, even in advanced stages, is still extremely important.

Among several substances studied for use as chemotherapeutic, the cannabinoid substances are highlighted (Velasco et al 2012). These are lipid substances originally identified in the plant *Cannabis sativa* with psychoactive effects, being the most abundant and considered representative of the group $\Delta(9)$ - tetrahydrocannabinol (THC) (Pertwee, 2008).

The THC has several therapeutic applications, including reduction of inflammation, asthma and some sort of chronic pain, besides appetite stimulation in cancer patients undergoing chemotherapy (Mechoulam, 1986). Based on this knowledge, it's reasonable to propose that drug obtained from cannabinoid fatty acid derivate – or those who have ability to mimic them – might be applied to cure or relief of pathological conditions.

Discovery of two cannabinoid substances endogenously produced, anandamide (or arachidonoyl ethanolamide [AEA]) and sn-2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Pertwee, 2010; Mechoulam, 1995; Mechoulam, 2002) opened a new scientific research that contributed to identify another endogenous substances derivate from fatty acid as the oleoyl ethanolamide (OEA), that is derivate of N-acyl ethanolamides (NAEs).

According to Bifulco et al. (2006) and Sarfaraz et al. (2008), cannabinoid substances have a potential application as antitumor drugs that cause decrease in cell survival and proliferation. Moreover antitumor agents tend to inhibit the tumor growth through apoptosis promotion on tumor cells (Cudaback et al., 2010). In accordance with Blázquez et al. (2006), melanoma cells express cannabinoid receptors (CB₁ e CB₂), and its activation inhibits the melanoma cells growth *in vivo* and *in vitro*.

It has already been related in the literature the relation between cannabinoid receptors and oxidative stress. In the study made for Bifulco et al. (2008), the cannabinoid interaction with transient receptor potential vanilloid (TRPV) promotes

the activation of more than one cell mechanism, among which, mitochondrial apoptosis pathway activation, that occurs at the same time the ROS generation increase and consequently increased oxidative stress. Carracedo et al. (2006), also showed the treatment on pancreatic tumor cells using a specific cannabinoid increased gene ATF-4 and TRB3 which are related with oxidative stress, among other pathways, leading to apoptosis. Furthermore, several studies demonstrated that cannabinoids can realize its antiproliferative effects and induce cell death dependent of ROS. The anandamide, for example, leads to an increased ROS generation in tumor cells (Massi et al., 2003; Sarker et al., 2003). Jacobsson *et al.* (2001) demonstrated the anandamide antiproliferative effects and 2-AG in glioma cells whose can be completely inhibit by antioxidant α -tocoferol.

However, the role of cannabinoids on regulation of oxidative stress remains controversial. Sometimes, the cell death induced by ROS is supported by cannabinoids, while in other situation a protective effect by cannabinoids against induced death by ROS can be visualized. The role of receptors CB on prooxidant and antioxidant effects is unclear and both the effects receptors-dependent and -independent were related by varying in according with different cannabinoids (Zolese et al., 2005).

Among the compounds that can have significant effects on the organisms by the generation of ROS there is also the trihalometilated pyrazolinic compounds. These compounds were reported to have a wide range of applications in the pharmaceutical industry, by its antimicrobial, antinociceptive, analgesic, stimulatory intestinal secretion, antidepressant, anticonvulsive, antipyretic, anti-inflammatory and hypofagic properties (Nenajdenko e Balenkova, 2011; Sauzem et al., 2008). In this study, we used a pyrazolinic cannabinoid analogue resulting from hybridization between a structure considered privileged (pyrazolinic trifluoromethylated nucleus) and fatty chain from an endocannabinoid compound derived from fatty acid called N-acylethanolamides (NAEs), - the oleoyl ethanolamide (OEA) - in order to study the involvement of ROS production in the effects of the endocannabinoid oleoyl ethanolamide (OEA) and its pyrazonilic analogue called oleic pyrazoline (OPZ) in melanoma cells.

Materials and Methods

Cell culture

The murine melanoma cell line, B16F10, was obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank. B16F10 cell line was maintained in DMEM medium, supplemented with sodium bicarbonate (0.2 g/L), L-glutamine (0.3 g/L), Hepes (3 g/L), 10% fetal bovine serum, 1% antibiotic and antimycotic, in cell culture flasks at 37 °C.

Synthesis of Compounds

The compounds were synthesized by the Kolbe Organic Synthesis Laboratory, from FURG, based on those methods already described in the literature. To obtain the oleoyl ethanolamida (OEA) was performed esterification of oleic acid to obtain methyl oleate, which was then subjected to aminolysis reaction with ethanolamine to obtain the OEA (Lopes et al., 2010) (Fig. 1 a).

The synthesis of pyrazoline analogue to OEA was performed according to Beck et al. (2012). In a first step was made a reaction hydrazinolysis from methyl oleate to obtain the oleic hydrazide, which was then subjected to reaction cyclocondensation with (Z)-1,1,1-trifluoro-4-methoxy-8-metilnone-3,7-dien-2-one (enone) to obtain the new analogue (Z)-1-(5-hydroxy-3-(4-methylpent-3-enyl)-5-(trifluoromethyl)-4,5-dihidropirazol-1-il)octadec-9-en-1-one (oleic pyrazoline – OPZ) (Fig. 1 b).

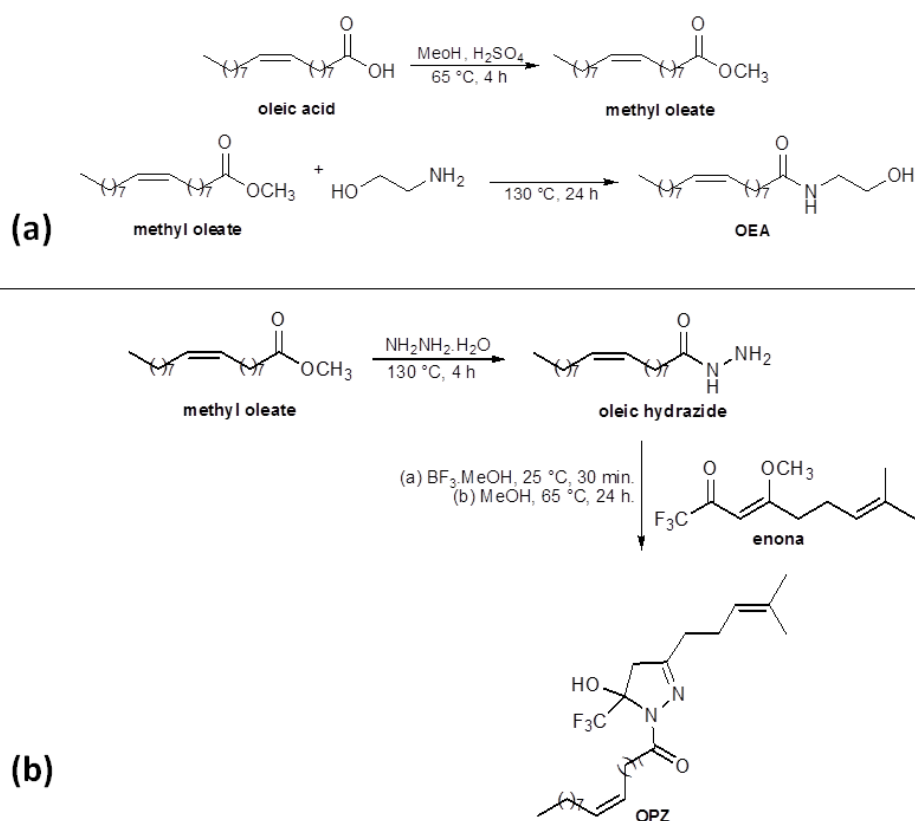


Fig 1. (a) Synthesis and molecular structure of oleoyl ethanolamide (OEA) and (b) oleic pyrazoline (OPZ), (b) synthesis and molecular structure of oleic pyrazoline (OPZ).

Cells and treatments with oleoyl ethanolamide (OEA) and oleic pyrazoline (OPZ)

The B16F10 cells were centrifuged, suspended in DMEM medium (2×10^5 cells/mL) and incubated for 24 h to adhere in cell culture plates at 37 °C. The compounds (OEA and OPZ) were diluted in ethanol and Tween 20 (Synth) and added to the cells in the maximum volume of 0.05% (0.04% ethanol and 0.01% Tween) which was not cytotoxic (Fig. 2a). The control cells received the same volume of solvent of the highest concentrations of compounds. The concentrations of OEA or OPZ tested were 50, 125, 250, 375 and 500 μM until 72 h.

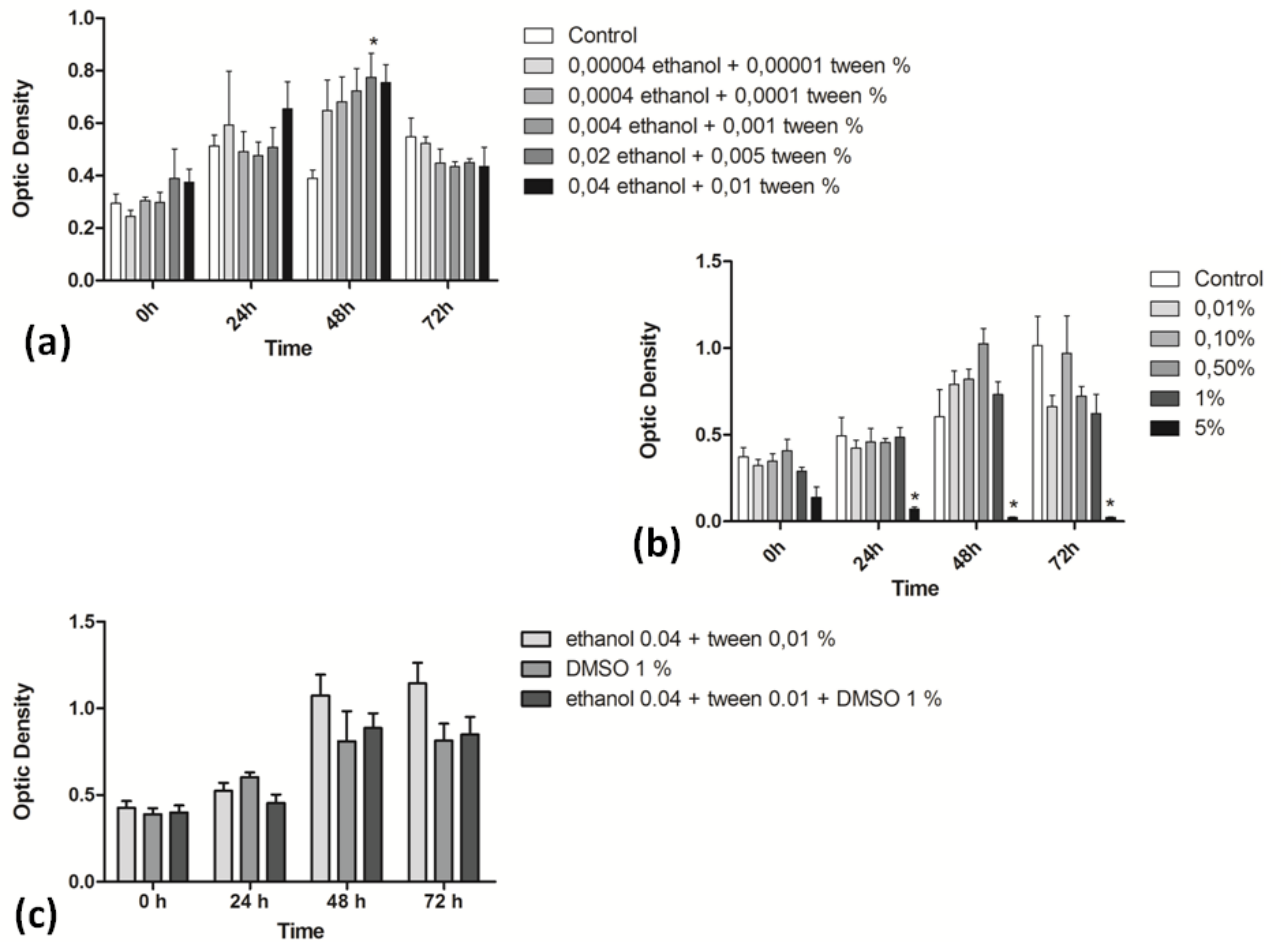


Fig 2. Cells B16F10 treated with (a) ethanol and tween; (b) DMSO; and (c) ethanol and tween, DMSO or both solvents at the same concentration. Data are shown as mean \pm standart error. * indicates significant difference from the respective control at each exposure time ($p < 0.05$).

Cellular viability

The viability of B16F10 cells exposed to OEA and OPZ was measured by method of MTT (3-(4,5--2-yl)-2,5-ditetrazolium bromide) 0 h, 24 h, 48 h and 72 h after incubation at 37 °C, according to Trindade et al., (1999). Briefly, the cells after incubation were washed with PBS and 200 μ l DMEM medium β -mercaptoethanol free and 20 μ l of MTT (5 mg/ml) was added to each well. The plates were incubated for 3 h at 37 °C. The

medium was removed and formazan crystals were dissolved in 200 μ l of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) with gentle shaking. The absorbance values at 490 nm were determined on a multiwell plate reader (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK).

Quantitative analysis of apoptosis and necrosis

The evaluation of apoptosis and necrosis was realized according to Ribble et al. (2005) modified, with the addition of 2 μ l of work solution composed by PBS, with 100 μ g/mL of acridine orange and 100 μ g/mL of ethidium bromide. The analysis was performed from areas captured from the well plate (20X) with epifluorescence microscope (Olympus IX81). All cells were analyzed and the data were expressed in percentage related to total cells number visualized on the captured area. The cells were classified according Kosmider et al (2004) modified, as following: those evincing yellow-orange fluorescence cytoplasm and green nucleus were considered viable cells; those presenting orange nucleus with fragmented chromatin were considered apoptotic. Those cells with uniformly orange-stained nucleus were considered necrotic.

Assessment of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) formation

The B16F10 cells were centrifuged, suspense in DMEM medium (2×10^5 cells/mL) and incubated for 24 h to adhere in cell culture plates with DMEM medium at 37 °C. After this, they were treated in medium with 50, 125 and 250 μ M of OEA or OPZ and incubated at 37 °C during 24 h. Then the cells were washed with PBS (two times) and incubated for 30 min at 37 °C with the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) at a final concentration of 40 μ M. After the loading with H₂DCF-DA, the cells were washed with PBS two times and then suspended in fresh PBS. Aliquots of 160 μ l of each sample (five replicates) were placed into an ELISA plate and the fluorescence intensity was determined during 90 min at 37 °C, using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer), with an excitation and emission wavelength of 485 and 520 nm, respectively. ROS levels were expressed in terms of fluorescence area, after fitting

fluorescence data to a second order polynomial and integrating between 0 and 90 min in order to obtain its area.

α -tocopherol

To verify the involvement of ROS generation in the effects of OEA was used an antioxidant (α -tocopherol - Vitamin E) at the concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dissolved with DMSO. The cells were treated with α -tocoferol, 250 μM of OEA, and α -tocoferol and 250 μM of OEA during 24 h. The control cells received the same volume of solvent used in each condition (Ethanol and Tween or DMSO, or DMSO plus Ethanol and Tween) (Fig. 2 a, b, c respectively). It was made assessment of intracellular ROS formation and cell viability assay by MTT. In this case the data are presented as percentual of viable cells in relation to respective controls.

Statistical analysis

Each experiment was repeated on three independent times with, at minimum triplicate samples. The results were expressed as the means \pm SEs. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences among groups. Tukey's significant difference post hoc test was used for pairwise comparisons after analysis of variance. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

OEA

When exposed to OEA the B16F10 cell line showed lower percentage of viable cells 24 h after treatment with concentrations of 250 μM and 375 μM compared to control. After 48 h, it was observed a lower percentage of viable cells compared to control in cells treated with a concentration of 375 μM of OEA. At 72 hours this effect was no

longer observed, except for the concentration of 500 μM , which was cytotoxic from 24h exposure (Fig. 3 a).

OPZ

On OPZ exposure, there were not any significant differences immediately, 24 h and 48 h after treatment with different concentrations. However 72 h after treatment it was observed a significant increase in the percentage of viable cells treated with 50 μM , 125 μM and 375 μM of OPZ (Fig. 3 b).

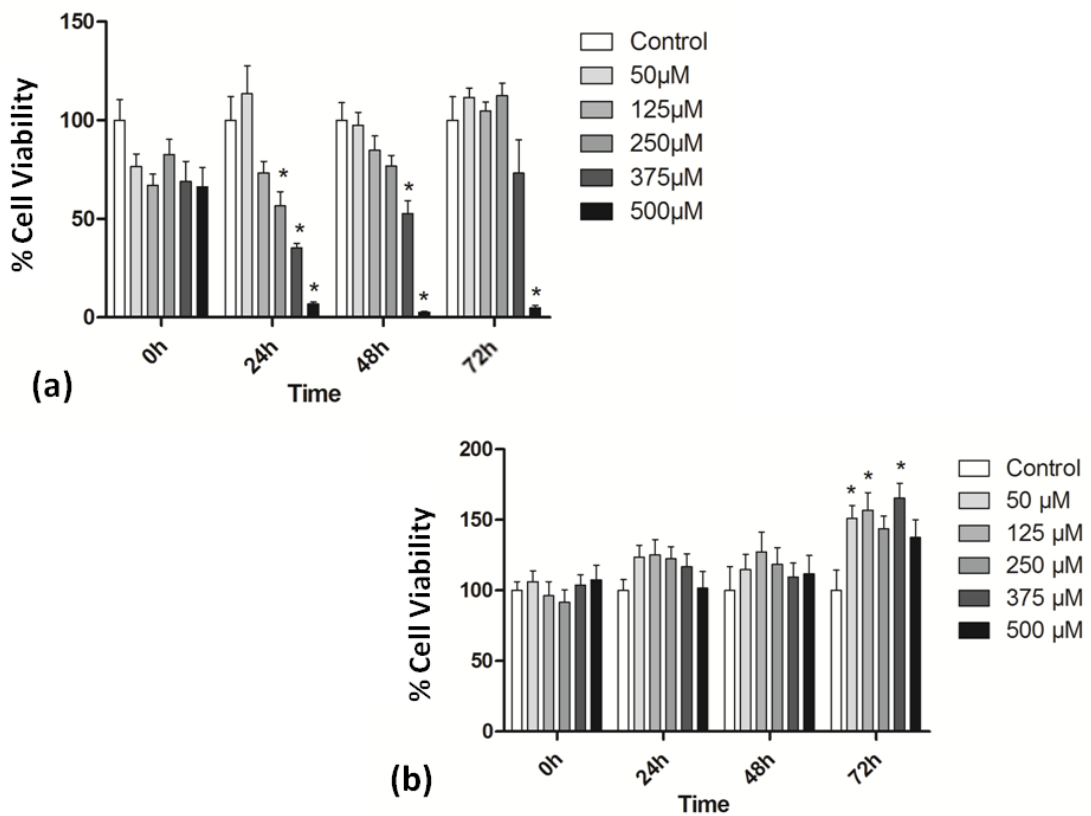


Fig. 3 (a) Percentage of viable B16F10 cells treated with different concentrations of OEA and (b) OPZ immediately, 24 h, 48 h and 72 h after exposure. Data shown are the mean \pm standard error. * Indicates significant difference from the respective control at each exposure time ($p < 0.05$).

ROS

After 24 hours of treatment with OEA, B16F10 cells showed an increase in ROS generation in concentration of 250 μM compared to control (Fig. 4a). For OPZ was observed a reduction in the generation of ROS in concentration of 50 μM , suggesting an antioxidant effect of this molecule (Fig. 4 b).

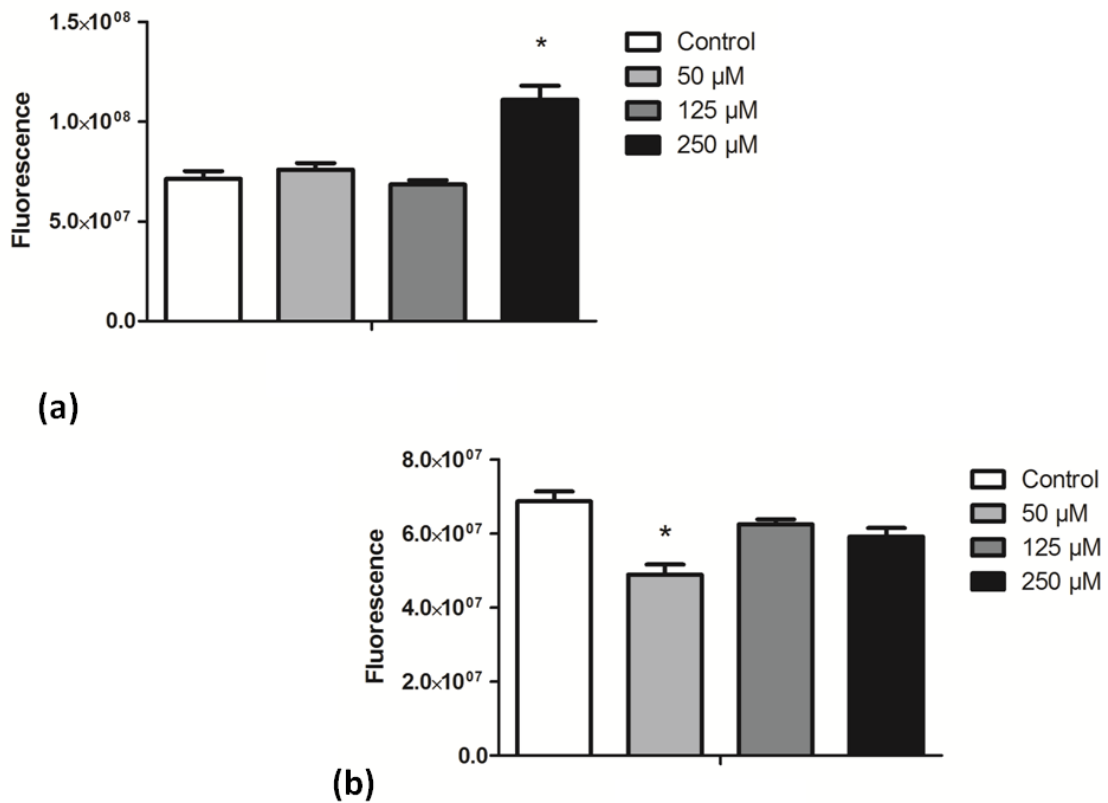


Fig. 4 (a) ROS generation in B16F10 cells treated with 50 μM , 125 μM e 250 μM of OEA and (b) OPZ for 24 h. Data shown are the mean \pm standart error. * Indicates significant difference from the respective control at each exposure time ($p < 0.05$).

Apoptosis and Necrosis

It was observed a decrease in cell viability while the concentration of OEA increased. In the concentrations of 125 and 250 μM , there was a decrease in number of viable cells and an increase in cell apoptosis. At highest concentrations (375 and 500 μM) all cells suffered necrosis (Fig. 5c).

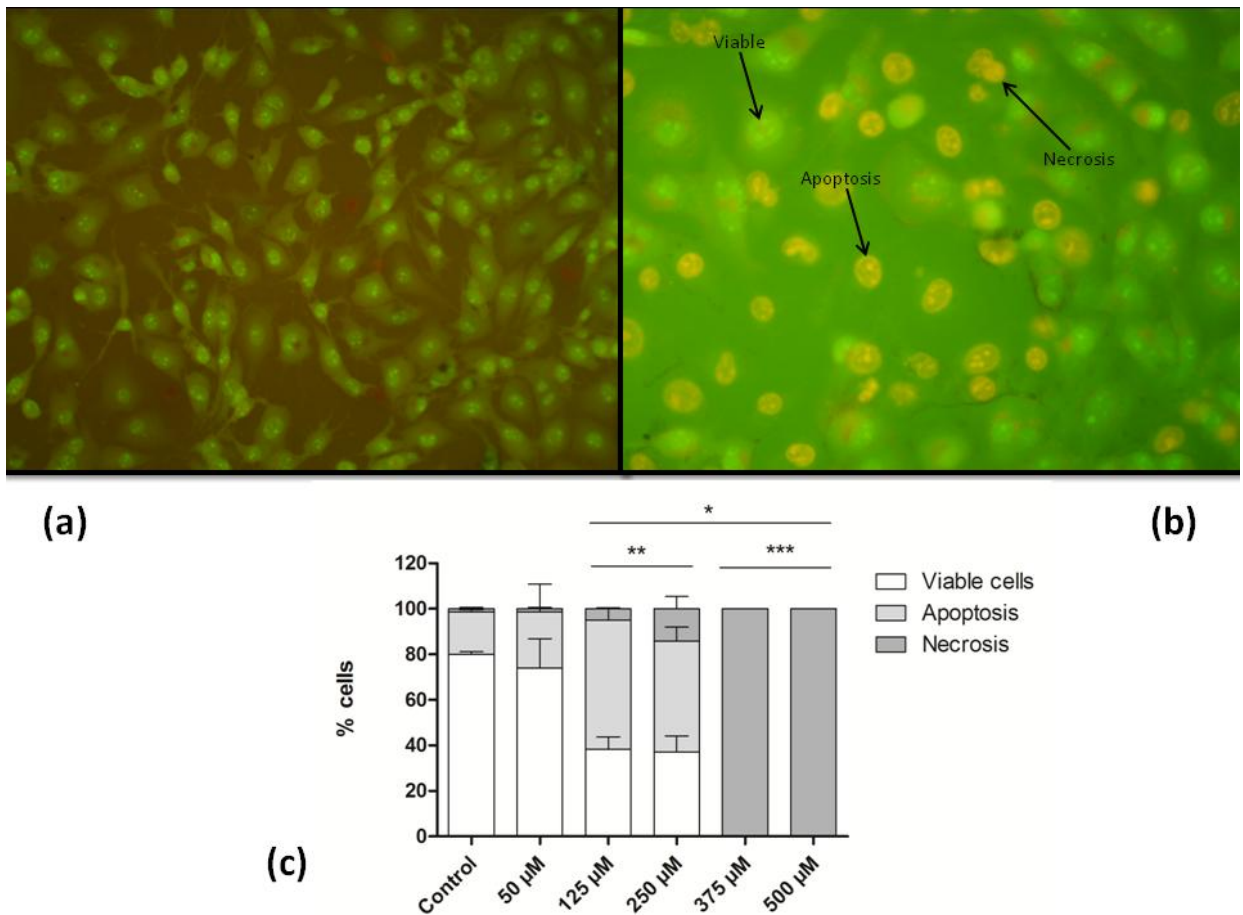


Fig. 5(a) Visual field of cells in the control group demonstrating viable cells and (b) cells treated with 125 μM of OEA showing viable cells, in apoptosis or necrosis captured by fluorescence microscopy, and (c) Percentage of viable, apoptotic and necrotic B16F10 cells 24h after treatment with 50 μM , 125 μM , 250 μM , 375 μM e 500 μM of OEA from the visual field captured by a fluorescence microscope. Data shown are the mean \pm standart error . *, ** and *** indicate significant difference in relation to control on viable, apoptotic and necrotic cells number, respectively ($p < 0.05$).

α - tocoferol

In the treatment of OEA with α -tocopherol, the ROS generation was significantly lower than treatment with only OEA and statistically equal to the treatment with only α -tocopherol (Fig. 6 a). Compared to its control, only OEA showed significant difference in the percentage of viable cells (Fig. 6 b).

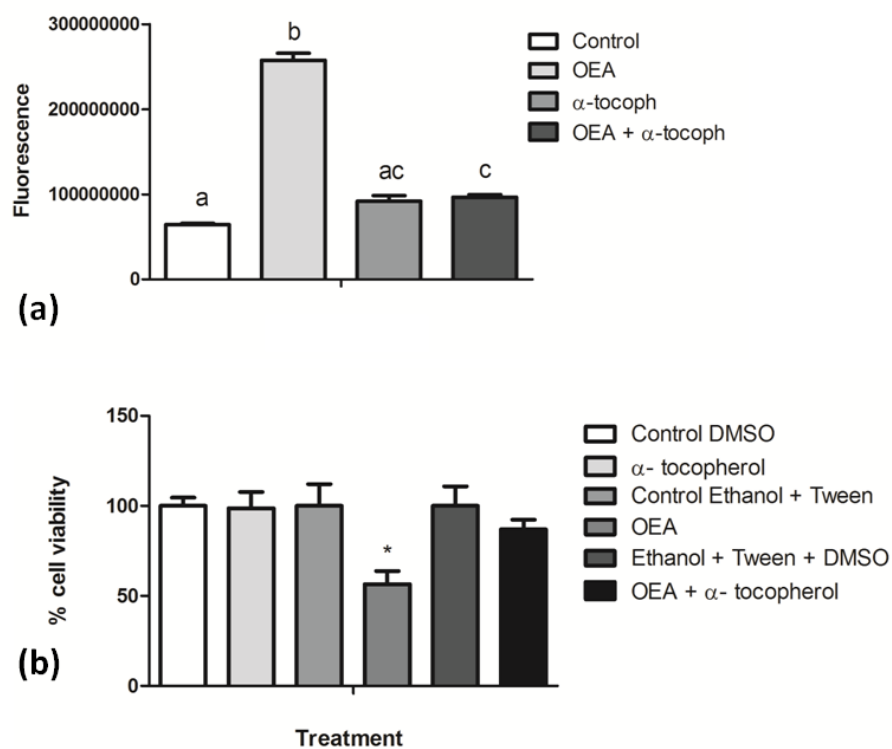


Fig. 6 (a) ROS generation in B16F10 cells exposed to OEA (250 μ M) in the presence and absence of antioxidant (α -tocopherol) and (b) Cell viability 24 h after treatment with and without the use of α -tocopherol. Data are shown as mean \pm standard error. Different letters mean significant differences between treatments ($p < 0.05$) and * means significant difference between the treatment and its respective control (which received the same vehicle used as solvent).

Discussion

According to Bifulco et al., 2006 the potential application of cannabinoid substances as antitumor drugs is supported by the decreased cell proliferation and survival, among others. In this study, two cannabinoid substances were used: an endocannabinoid, the oleoyl ethanolamide (OEA) and its pyrazolinic analogue denominated oleic pyrazoline (OPZ).

Previous studies have shown that trihalomethylated pyrazolines may have remarkable effects on the organisms, mediated through ROS generation, as well as a wide application in the pharmacology where they may be considered “privileged structures” in Medicinal Chemistry. According to Hassan et al. (2011), pyrazolinic compounds may induce oxidative stress and, in some cases, the antitumor activity may be accompanied by a considerable increase in superoxide dismutase activity, decrease in catalase and glutathione peroxidase activity in addition to decreased levels of glutathione, high production of H₂O₂, NO and free radicals, leading to death of tumor cells.

Thus, the utilization of synthetic cannabinoids analogs associated with pyrazoline structures should cause increased ROS generation and antiproliferative effect. However, these effects were not observed for OPZ. After 72h exposure to modified structure (OPZ), the opposite effect was seen and increased cell proliferation. Furthermore, when the endocannabinoid was tested in its original form (OEA), a considerable effect in cell viability was observed.

According Blazquez et al. (2006), melanoma cells actively express cannabinoid receptors (CB₁ and CB₂) and these receptors activation inhibits the growth of melanoma cells in vivo and in vitro. In this study was verified the utilization of cannabinoids THC and synthetic - WIN 55212-2 inhibit the growth of melanoma cells but not in melanocytes. Given the antitumor properties of cannabinoids, overexpression of CB receptors in tumors could be useful for predicting pharmacological responsiveness to cannabinoid agonists and their selectivity in tumor compared to normal cells.

Also, it was recently suggested that increased levels of endocannabinoids and blocking its degradation lead to decreased the viability of tumor cells (Hamtiaux et al. 2012). According to Cudaback et al. (2010), the increased synthesis of endogenous cannabinoid, catabolism of several ligands inside cells and tissues and increased expression of different receptors appear to be important in signaling cascades by different kinases. This signaling results in proautophagic, proapoptotic, antiproliferative or antiapoptotic effects, and these effects have been observed in some tissues and cancer cells.

In the present study, after 24 h there was a decrease in viable cell number and an increase in apoptotic cells in concentrations of 125 and 250 μM of OEA. The higher concentrations (375 and 500 μM) lead to cell death by necrosis. According to these results we might suppose that the intermediaries concentrations allow an initiation to a cellular response, leading cells to apoptosis, whereas higher concentrations because they are too high, do not allow any attempt to cell response. Also, Guiliano et al. (2009) demonstrated that the utilization of the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 in liver cancer cells was associated with the upregulation of proapoptotic factors such as bax, bid and bcl-xs, and the corresponding down-regulation of antiapoptotic, cell protective factors such as bcl-2.

Although OEA also presents antioxidant properties resulting in beneficial effects on in vitro capacitation of human sperm (Ambrosini et al., 2006), in the present work, the effect on cell viability was accompanied by an increase of ROS generation in the initial 24 h, for the concentration of 250 μM of OEA. Moreover, when an antioxidant was used in the same exposure condition, it was demonstrated a decreased in ROS generation accompanied by a decrease OEA effect on cell viability. Also, according to the results obtained for OPZ, it is possible to demonstrate that the structural change in OEA led to loss of oxidant capacity, as well as the loss of ability to reduce cell viability. Thus, these results suggest the involvement of ROS generation in the effect of OEA in the cell line B16F10.

According to Massi et al., 2006, the involvement of ROS in apoptosis mechanisms induced by cannabinoid has been demonstrated in glioma and leukemia cells, and its involvement has been confirmed by using N-acetylcysteine , an

antioxidant capable to reduce ROS production, or by the use of NAD (P), an oxidase inhibitor that can attenuate the effects of cannabinoids.

Besides, molecular mechanisms of OEA action are not yet completely elucidated (Fonseca et al, 2013), and more studies may be required to improve the knowledge about this molecule. In this sense, this work wants to contribute showing the dependence of the increase of ROS generation to the cellular death by apoptosis induced by OEA in the B16F10 melanoma cells.

Acknowledgements

This work was supported by the Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada (FURG). We are thankful to Alex F. C. Flores for support on the compounds synthesis, to Anahy Fazio and Milene Medeiros for help on manuscript, and to Fernanda Lopes for help on the work.

References

- Ambrosini A, Zolese G, Ambrosi S, Ragni L, Littarru G, Bertoli E *et al.* Oleoylethanolamide protects human sperm cells from oxidation stress: studies on cases of idiopathic infertility. *Biol Reprod* 2006; **74** (4): 659-665.
- Beck, P.; Santos, J. M.; Kuhn, B. L.; Moreira, D. N.; Flores, A. F. C.; Martins, M. A. P.; D'Oca, M.G.M.; Piovesan, Regiospecific synthesis of new fatty *N*-acyl trihalomethylated pyrazoline derivatives from fatty acid methyl esters (FAMES), *J. Braz. Chem. Soc.* 2012, **11**: 2122–2129.
- Bifulco M, Laezza C, Pisanti S, Gazzero P. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *Brit J Pharmacol* 2006; **148**: 123-135.
- Bifulco M, Malfitano AM, Pisanti S, Laezza C. Endocannabinoids in endocrine and related tumours. *Endocr-Relat Cancer* 2008; **15**: 391-408.

Blasquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G *et al.* Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *Faseb J* 2006; **20** (14): 2633-2635.

Carracedo A, Lorente M, Egia A, Blazquez C, Garcia S, Giroux V, *et al.* The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 2006; **9** (4): 301-312.

Cudaback E, Marrs W, Moeller T, Stella N. The expression level of CB₁ and CB₂ receptors determines their efficacy at inducing apoptosis in astrocytomas. *Plos One* 2010; **5** (1): e8702.

Fonseca BM, Costa MA, Almada M, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. *Prostag Oth Lipid M* 2013; **102-103**: 13-30.

Giuliano M, Pellerito O, Portanova P, Calvaruso G, Santulli A, De Blasio A, *et al.* Apoptosis induced in HepG2 cells by the synthetic cannabinoid WIN: involvement of the transcription factor PPAR gamma. *Biochimie* 2009; **91** (4): 457–65.

Hamtaux L, Masquelier J, Muccioli GH, Bouzin C, Feron O, Gallez B *et al.* The association of N-palmitoylethanolamine with the FAAH inhibitor URB597 impairs melanoma growth through a supra-additive action. *BMC Cancer* 2012; **12**: 92.

Hassan GS, Kadry HH, Abou-Seri SM, Ali MM, Mahmoud AEE. Synthesis and in vitro cytotoxic activity of novel pyrazolo[3,4-d]pyrimidines and related pyrazole hydrazones toward breast adenocarcinoma MCF-7 cell line. *Bioorgan Med Chem* 2011; **19**: 6808-6817.

Jacobsson SO, Wallin T, Fowler CJ. Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. relative involvement of cannabinoid and vanilloid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **299** (3): 951-959.

Kosmider B, Zyner E, Osiecka R., Ochocki J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the *cis*-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with *cis*-DDP. *Mutat Res* 2004; **563**: 61-70.

Lopes CR, D'Oca CDRM, Duarte RC, Kurz MHS, Primel EG, Clementim RM *et al.* Síntese de novas amidas graxas a partir da aminólise de ésteres metílicos. *Quim Nova* 2010; **33**: 1335-1341.

Massi P, Vaccani A, Rubino T, Parolaro D. Cannabinoids and opioids share cAMP pathway in rat splenocytes. *J Neuroimmunol* 2003; **145**: 46-54.

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. *Cell Mol Lif Sci* 2006; **63**: 2057-2066.

Mechoulam R. The pharmacology of Cannabis sativa. In: *Cannabinoids as Therapeutic Agents*, ed. Mechoulam R 1986; 1–19. Boca Raton, FL: CRC Press.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, SchatzAR *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; **50**: 83-90.

Mechoulam R, Spatz M, Shohami E. Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci STKE* 2002; **23**: (129): re5.

Nenajdenko VG, Balenkova ES. *ARKIVOC* 2011; i:246.

Pertwee RG. The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Brit J Pharmacol* 2008; **153**: 199-215.

Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem* 2010; **17** (14): 1360–81.

Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 2005; **5**: 12.

Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. Cannabinoids for Cancer Treatment: Progress and Promise. *Cancer Res* 2008; **68**: 339-342.

Sarker KP, Biswas KK, Yamakuchi M, Lee KY, Hahiguchi T, Kracht M, *et al.* ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death. *J Neurochem* 2003; **85** (1): 50-61.

Sauzem PD, Machado P, Rubin MA, Sant'anna GS, Faber HB, Souza AH, Mello CF, Beck P, Burrow RA, Bonacorso HG, Zanatta N, Martins MAP. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *Eur J Med Chem* 2008; **43**:1237-1247.

Trindade GS, Capella MAM, Capella LS, Affonso-Mitidier OR, Rumjanek VM. Differences in sensitivity to UVC, UVB and UVA radiation of a multidrug-resistant cell line overexpressing P-glycoprotein. *Photochem Photobiol* 1999; **69**: 694-699.

Velasco G, Sánchez C, Guzmán M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 436-444.

White AC, Munson JA, Munson AE, Carchman RA. Effects of delta9-tetrahydrocannabinol in lewis lung adenocarcinoma cells in tissue culture. *J Natl Cancer I* 1976; **56 (3)**: 655-658.

Zolese G, Bacchetti T, Ambrosini A, Wozniak M, Bertoli E, Ferrett G. Increased plasma concentrations of palmitoylethanolamide, endogenous fatty acid amide, affect oxidative damage of human low-density lipoproteins: an *in vitro* study. *Atherosclerosis* 2005; **182**: 47-55.

CONCLUSÕES

- A OEA diminuiu o percentual de células viáveis em relação ao controle na maioria das concentrações utilizadas.
- A OPZ induziu a proliferação celular após 72 h de incubação.
- OEA foi capaz de gerar espécies reativas de oxigênio nas células B16F10.
- A OPZ mostrou uma capacidade antioxidante nas células B16F10.
- A OEA foi capaz de induzir a morte celular por apoptose nas concentrações intermediárias e por necrose nas maiores concentrações.
- A utilização de α -tocoferol reduziu a capacidade da OEA de gerar espécies reativas de oxigênio.
- A redução da geração de ROS por α -tocoferol prejudicou a capacidade da OEA em diminuir o percentual de células viáveis
- Foi possível demonstrar a dependência da geração de ROS para indução de morte das células de melanoma da linhagem B16F10 pela OEA.

REFERÊNCIAS

American Cancer Society, Inc. 250 Williams Street, NW, Atlanta, v. 404, p. 320-3333, 2011. GA 30303-1002

BIFULCO, M.; LAEZZA, C.; PISANTI, S.; GAZZERO, P. Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 123-135, 2006.

BIFULCO, M.; MALFITANO, A.M.; PISANTI, S.; LAEZZA, C. Endocannabinoids in endocrine and related tumours. **Endocrine-Related Cancer**, v. 15, p. 391-408, 2008.

BLÁZQUEZ, C.; CARRACEDO, A.; BARRADO, L.; REAL, P.J.; FERNÁNDEZ-LUNA, J. L.; VELASCO, G.; MALUMBRES, M.; GUZMÁN, M. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma **The FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2633-2635, 2006.

Câncer no Brasil: presente e futuro. **Revista Associação Médica Brasileira** [online]., v. 50, n. 1, p. 1-1. 2004. ISSN 0104-4230

CARRACEDO, A.; LORENTE, M.; EGIA, A.; BLAZQUEZ, C.; GARCIA, S.; GIROUX, V.; CEDRIC, M.; VILLUENDAS, R.; GIRONELLA, M.; GONZÁLEZ-FERIA, L.; PIRIS, M.A.; IOVANNA, J.L.; GUZMÁN, M.; VELASCO, G. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. **Cancer Cell**, v. 9, n. 4, p. 301-312, 2006.

CUDABACK, E.; MARRS, W.; MOELLER, T.; STELLA, N. The expression level of CB₁ and CB₂ receptors determines their efficacy at inducing apoptosis in astrocytomas. **Plos One** v. 5, n. 1, p. e8702, 2010.

DEMUTH, D.G.; MOLLEMAN, A. Cannabinoid signaling. **Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 549-563, 2006.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETTINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure

of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, p. 1946-1949, 1992.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**; v.82, p. 47-95, 2002.

FONSECA, B.M.; COSTA, M.A.; ALMADA, M.; CORREIA-DA-SILVA, G.; TEIXEIRA, N.A. Endogenous cannabinoids revisited: A biochemistry perspective. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**; v. 102-103, p. 13-30, 2013.

GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 3-9, 2009.

GRIMALDI, C.; CAPASSO, A. Role of lipid rafts/caveolae in the anticancer effect of endocannabinoids. **Mini-Rev Med. Chem.** v. 12, n. 11, p. 1119-1126, 2012.

GUZMÁN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**; v. 3, p. 745-755, 2003.

HAMTIAUX, L.; MASQUELIER, J.; MUCCIOLI G. H.; BOUZIN, C.; FERON, O.; GALLET, B.; LAMBERT, D.M. The association of N-palmitoylethanolamine with the FAAH inhibitor URB597 impairs melanoma growth through a supra-additive action. **BMC Cancer**; v. 12, p. 92, 2012.

HONÓRIO, K. M.; ARROIO, A.; SILVA, A. B. F. Aspectos terapêuticos de compostos da planta *Cannabis sativa*. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 318-325, 2006. ISSN 0100-4042.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), site <http://www.inca.gov.br>, acessado em 14 de setembro de 2013.

Jacobsson, S.O.; Wallin, T.; Fowler, C.J. Inhibition of rat C6 glioma cell proliferation by endogenous and synthetic cannabinoids. relative involvement of cannabinoid and

vanilloid receptors. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**; v. 299, n. 3, p. 951-959, 2001.

Massi, P.; Vaccani, A.; Rubino, T.; Parolaro, D. Cannabinoids and opioids share cAMP pathway in rat splenocytes. **Journal of Neuroimmunology**; v. 145, p. 46-54, 2003.

MECHOULAM, R. The pharmaco history of *Cannabis sativa*. In: CANNABINOIDS AS THERAPEUTIC AGENTS, ed. Mechoulam R 1986; 1–19. Boca Raton, FL: **CRC Press**.

MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LIGUMSKY, M.; KAMINSKI, N.E.; SCHATZ, A.R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B.R.; COMPTON, D.R.; *et al.* Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**; v. 50, p. 83-90, 1995.

MECHOULAM, R.; SPATZ, M.; SHOHAMI, E. Endocannabinoids and neuroprotection. **Science's STKE**; v. 23, n. 129, p. re5. 2002.

NENAJDENKO, V.G.; BALENKOVA, E.S. Preparation of α,β -unsaturated trifluoromethylketones and their application in the synthesis of heterocycles. **Archive for Organic Chemistry**; v. (i), p. 246-328, 2011.

PACHER, P.; BÁTKAI, S.; KUNOS, G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. **Pharmacological Reviews**; v. 58 p. 389-462, 2006.

PASIN, J.S.M.; FERREIRA, A.P.O.; SARAIVA, A.L.L.; RATZLAFF, V.; ANDRIGHETTO, R.; MACHADO, P.; MARCHESAN, S.; ZANETTE, R.A.; BONACORSO, H.G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.P.; FERREIRA J.; MELLO C.F. Antipyretic and antioxidant activities of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; v. 43, n. 12, p. 1193-1202, 2010.

PERTWEE, R.G. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. **Current Medicinal Chemistry**; v. 17, n. 14, p. 1360–81, 2010.

PERTWEE, R.G. The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**; v. 153, p. 199-215, 2008.

PERTWEE, R.G.; HOWLETT, A.C.; ABOOD, M.E.; ALEXANDER, S.P.; DI MARZO, V.; ELPHICK, M.R.; GREASLEY, P. J.; HANSEN, H. S.; KUNOS, G.; MACKIE, K.; MECHOULAM, R.; ROSS, R.A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. **Pharmacological Reviews**; v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010.

SALAZAR, M.; CARRACEDO, A.; SALANUEVO, I.; HERNANDEZ-TIEDRA, S., LORENTE M, EGIA A, *et al.* Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. **Journal of Clinical Investigation**; v. 119, p. 1359-1372, 2009.

SARFARAZ, S.; ADHAMI, V.M.; SYED, D.N., AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Cannabinoids for Cancer Treatment: Progress and Promise. **Cancer Research**; v. 68, p. 339-342, 2008.

SARKER, K.P.; BISWAS, K.K.; YAMAKUCHI, M. LEE, K.Y.; HAHIGUCHI, T.; KRACHT, M.; KITAJIMA, I.; MARUYAMA, I. ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death. **Journal of Neurochemistry**; v. 85, n. 1, p. 50-61, 2003.

SAUZEM, P.D.; MACHADO, P.; RUBIN, M.A.; SANT'ANNA, G.S.; FABER, H.B.; SOUZA, A.H.; MELLO, C.F.; BECK, P.; BURROW, R.A.; BONACORSO, H.G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.P. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**; v. 43, p. 1237-1247, 2008.

SCHMID, H.H.; BERDYSHEV, E.V. Cannabinoid receptor-inactive N-acylethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**; v. 66, n. 2-3, p. 363-376, 2002.

SCUDERI, M.R, CANTARELLA, G.; SCOLLO, M.; LEMPEREUR, L.; PALUMBO, M.; SACCANI-JOTTI, G.; BERNARDINI, R. The antimitogenic effect of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on human melanoma cells is mediated by the membrane lipid raft. **Cancer Letters**, v. 310, p. 240-249, 2011.

THOMPSON, J.F.; SCOLYER, R.A; KEFFORD, R.F. Cutaneous melanoma. **Lancet**,; 365, p. 687-701, 2005.

VARA, D.; SALAZAR, M.; OLEA-HERRERO, N.; GUZMÁN, M.; VELASCO, G.; DIAZ-LAVIADA, I. Antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. **Cell Death and Differentiation**; v. 18, p. 1099-1111, 2011.

VELASCO, G.; SÁNCHEZ, C.; GUZMÁN, M. Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. **Nature Reviews Cancer**; v. 12, p. 436-444, 2012.

WHITE, A.C.; MUNSON, J.A.; MUNSON, A.E.; CARCHMAN, R.A. Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in lewis lung adenocarcinoma cells in tissue culture. **Journal of the National Cancer Institute**; v. 56, n.3, p. 655-658, 1976.

Zolese, G.; Bacchetti, T.; Ambrosini, A.; Wozniak, M.; Bertoli, E.; Ferrett G. Increased plasma concentrations of palmitoylethanolamide, endogenous fatty acid amide, affect oxidative damage of human low-density lipoproteins: an *in vitro* study. **Atherosclerosis**, v. 182, p. 47-55, 2005.