



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL USO DE  
CANNABINOIDES EN CANCER DE RECTO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**SUBESPECIALISTA EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA**

PRESENTA:

**DR. PEDRO LUNA MERLOS**

DRA. ERIKA BETSABÉ RUÍZ GARCÍA

**DIRECTOR DE TESIS**

DRA. ALETTE ORTEGA

**CODIRECTORA DE TESIS**



CIUDAD DE MÉXICO

2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**AUTORIZACIÓN DE TESIS**

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL USO DE CANNABINOIDES EN CANCER DE  
RECTO**

---

**Dra. Erika Betsabé Ruíz García**  
**Presidente de Tesis**  
**Instituto Nacional de Cancerología**

---

**Dra. Sylvia Verónica Villavicencio Valencia**  
**Subdirectora de Educación Médica**  
**Instituto Nacional de Cancerología**

---

**Dr. Antonio Cruz Rodríguez**  
**Médico Residente de Tercer Grado Cirugía Oncológica**  
**Autor**  
**Instituto Nacional de Cancerología**

## **Agradecimientos:**

Agradezco a mi familia por el apoyo que me brindaron durante mi desarrollo profesional y personal, sin ellos esto hubiere sido imposible.

A mi madre María del Rosario Merlos Sánchez por ser el pilar más importante en éste apoyo, brindarme su amor, enseñanzas, su forma de compartir con los demás y brindarme fuerzas cuando las cosas se tornaban difíciles y por acudir a mi llamado cuando le necesitaba, porque dejaste tus sueños, para realizar los míos y vivirlos a través de mí y mi hermano.

A mi padre Pedro Luna Pérez, quien, lejos de ser un gran cirujano, fue el ejemplo de vida que deseo, admirable por su lucha incesante por el bien de los demás, por su ayuda al desvalido y por su espíritu noble y en busca de la verdad suprema, el bien a los demás, por ser el ejemplo de persona a seguir, por darme la sabiduría y ánimos de luchar y ser cada día una mejor persona, médico y ser humano.

A mi hermano Pablo Luna Merlos por ser gran parte de mi alegría, que desde pequeños compartíamos, quien fue mi ejemplo de alegría, de mirar el mundo diferente y de confianza que necesité desde pequeño, con quien compartí esos sueños y juegos y que al día de hoy son realidad, como el jugar y suturar nuestros juguetes.

A mi esposa, América Yukary Barrera Rodríguez, quien se mantuvo presente con su ejemplo de amor, que me apoyó en los momentos difíciles y quien muchas veces los vivió por compartir conmigo, quien su amor ha sido intachable, quién con su alegría alegró los días difíciles, y tuvo la paciencia de soportar éste camino con muchos altibajos, por el amor compartido que tenemos.

A mis maestros y amigos, quienes han llenado mi actuar y han sido ejemplo para todo momento, quienes me apoyaron, quienes me aprecian y por quienes daré y haré mi mejor esfuerzo posible.

Al Instituto Nacional de Cancerología, por permitirme aprender en sus filas, y permitirme ser no sólo un buen médico, sino una gran persona.

## **INDICE**

<b>1. Introducción</b>	<b>Pag. 5</b>
<b>2. Justificación</b>	<b>Pag. 13</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>Pag. 13</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>Pag. 13</b>
<b>5. Métodos</b>	<b>Pag. 15</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>Pag. 19</b>
<b>7. Discusión</b>	<b>Pag. 24</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>Pag. 26</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>Pag. 27</b>

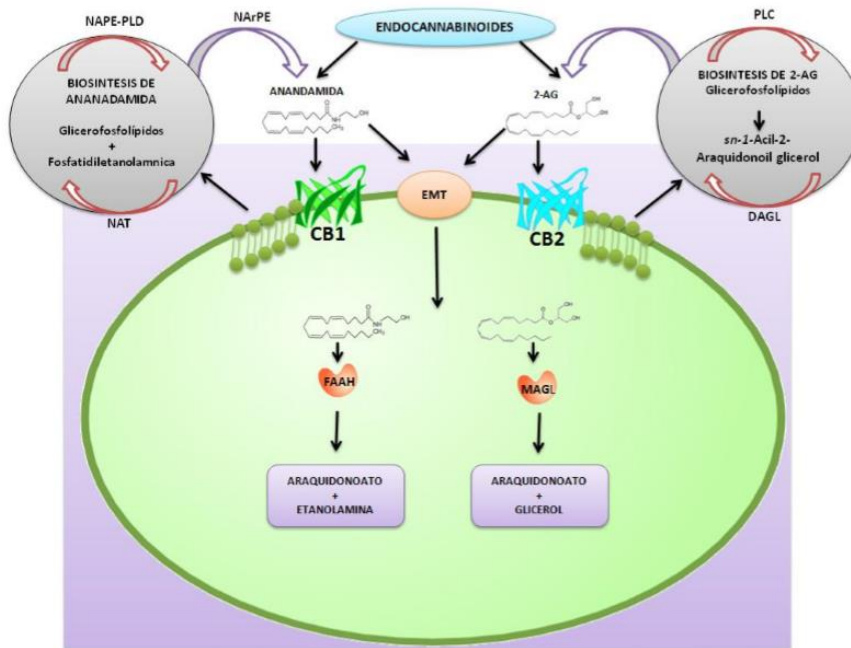
## Introducción

El cáncer colorrectal es la cuarta neoplasia en incidencia entre hombres y mujeres. Es la tercera causa de muerte en hombres y segunda en mujeres (**Globocan 2012**). En estados Unidos el Instituto Nacional del Cancer a través de su programa de Seguimiento epidemiología y resultados reportan que aproximadamente 4.3% de los hombres y mujeres padecerán ésta entidad durante su vida, así como una incidencia de 8%. En general reportan una sobrevida general limitada a pesar de la etapa clínica de presentación, por lo general, es realizado el diagnóstico en etapas localmente avanzadas hasta en un 35% y con enfermedad a distancia hasta en un 21%, con sobrevidas a cinco años de 71.3% y 13.9% respectivamente, haciendo peso el diagnóstico temprano y tratamiento oportuno al ofrecerse sobrevidas superiores (89.9%) en etapas tempranas. **(SEER)** El cáncer colorrectal en México, en el estudio reportado por Rizo en 2007 se cuenta con una incidencia de 3.8% del total de pacientes dentro del Instituto Nacional de Cancerología. **(Rizo 2007)**. Únicamente con esto podemos notar la gran importancia del manejo en las etapas avanzadas de ésta entidad, en las cuales el uso de drogas como método paliativo como lo son los cannabinoides puede jugar un rol importante.

Es importante recalcar para los fines del presente documento la respuesta ante el tratamiento estándar en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado se lleva a cabo con Quimioterapia y Radioterapia concomitante, siendo la respuesta patológica completa de nuestro total interés por presentarse únicamente en el 8 a 20% de los pacientes bajo éste tratamiento, con un promedio de enfermedad residual de 85%. **(Lorimer et al. 2017)**

Los extractos del Cannabis Sativa, se han utilizado como medicamento desde los años 1960s luego del aislamiento del componente activo más importante (-)-trans-D9 - tetrahydrocannabinol (D9 -THC). Actualmente se conocen 66 compuestos derivados de ésta planta los cuales toman el nombre de Cannabinoides, los cuales actualmente se encuentran clasificados de acuerdo a sus estructuras químicas en fitocannabinoides, cannabinoides sintéticos como JWH-133, WIN 55,212-2 and SR141716 y endocannabinoides como anandamida y sn-2-arachidonylglycerol (2-AG).

El sistema endocannabinoide se resume en la siguiente figura:



**Figura 1.**

Receptores CB1 y CB2, activados por endocannabinoides (AEA y 2-AG). Producidos a demanda de la célula. La biosíntesis se lleva a cabo mediante las enzimas N-aciltransferasa (NAT), N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), diacilglicerol lipasa (DAGL) y fosfolipasa C (PLC). La degradación se lleva a cabo mediante las enzimas ácido graso aminohidrolasa (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL).

**Diagrama modificado de Expert Opin Ther Targets. 2011**

**Mar;15(3):297-308**

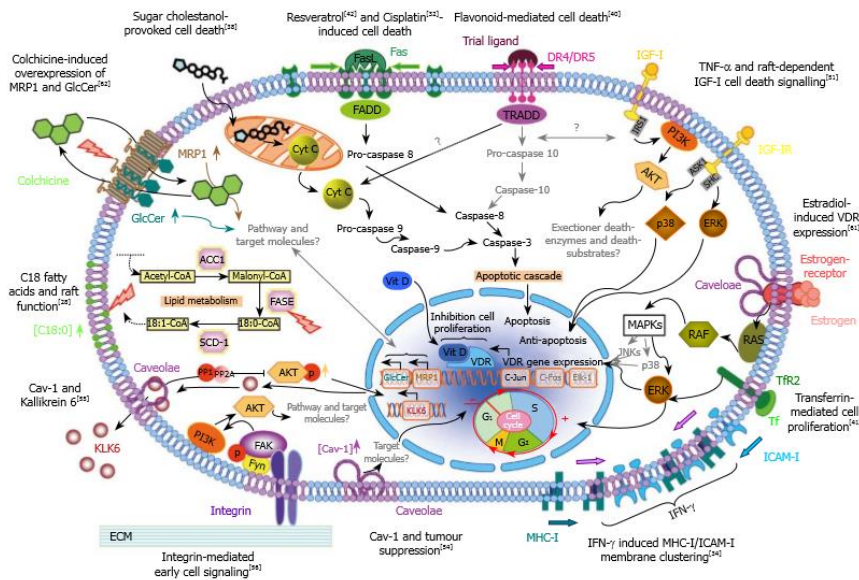
Éstos agentes se han usado en memoria, apetito, manejo del dolor, inflamación (**Wilson and Nicoll, 2002**) (**Klein, 2005**), náusea, tolerancia o intolerancia inmunológica (**Di Marzo 2000**) y actualmente se han observado sus efectos como tratamiento paliativo y antiproliferativo en cáncer, sin embargo, no se ha probado adecuadamente su efecto como tratamiento ante la progresión tumoral. Se han encontrado diversos efectos in vivo en éstos pacientes bajo tratamiento paliativo en cáncer, con cierta respuesta antineoplásica (**Singer 2015**), sin embargo, aún es una entidad en estudio.

Para poder entender que éstos pueden tener efectos en las vías oncogénicas en cáncer de recto, debemos saber las diferentes vías a través de las cuales participa el proceso proliferativo y así mismo los blancos moleculares a los cuales se dirige el tratamiento, así como las interacciones que podría ofrecer dentro de ésta vía el uso de cannabinoides, así como la existencia demostrada de los receptores a cannabinoides en el cáncer de recto, como lo muestra el Proteín Genome Atlas

Empezaremos por las vías oncogénicas del cáncer de colorrectal encontradas como microdominios en la membrana celular, los cuales son en su mayoría metabotrópicos

como lo son los receptores a cannabinoides, además por la propia estructura de los cannabinoides presentan actividad compartida y vías comunes

Existen las Caveolinas (Cav-1 y Cav-2) que son estructuras asociadas al colesterol las cuales se encuentran mayormente expresadas en las células de cáncer de colon comparadas con una célula normal las cuales degradan la matriz extracelular. Algunos de éstos tienen efectos al ser modificados mediante compuestos como el cisplatino, azúcar, colestanol, flavonoides y resveratrol mostrando muerte celular. Algunos otros ejemplos de éstos son los Receptores de estrógenos, inducidos por Vitamina D, los cuales controlan la proliferación celular a través de la vía de MAPK/ERK y Ras/Raf. Por lo que se propone el estimular por cualquier método, las vías de muerte celular, incluyendo el propuesto a través de cannabinoides en éste trabajo. Se mostraran las diferentes vías en la siguiente imagen.



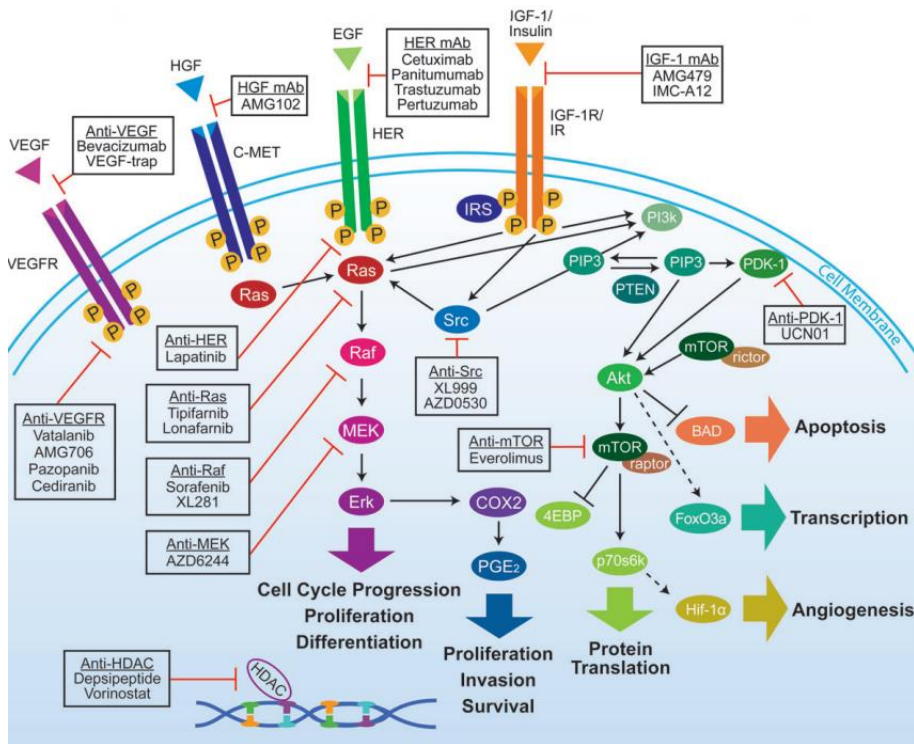
**Figura 2**

Capa lipídica en azul y microdominios RAFT morado  
 Cada uno de los receptores  
 GlcCer Glucosil ceramida,;  
 FADD: Fas-associated protein with death domain; TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; AKT: Serine/threonine protein kinase; ERK: Extracellular signal-regulated kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; IRS1: Insulin receptor substrate 1; ASK1: Apoptosis signal-regulating kinase 1; SHC: Src homology 2 domain; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IGF- I : Insulin-like growth factor-I ; VDR: Vitamin D receptor; Vit D: Vitamin D; RAF: Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; RAS: RAT sarcoma; TfR2: The second transferrin receptor; Tf: Transferrin; JNKs: c-Jun N-terminal kinases; ICAM- I : Intercellular adhesion molecule I ; IFN-g: Interferon-g; MHC- I : Major histocompatibility complex I ; FAK: Focal adhesion kinase; ECM: Extracellular matrix; FASE: Fatty acid synthase; SCD-1: Stearoyl-coenzyme A desaturase 1; ACC1: Acetyl-CoA carboxylase; Cav: Caveolin

**Diagrama tomado de World J Gastroenterol 2011 February 14; 17(6): 681-690**



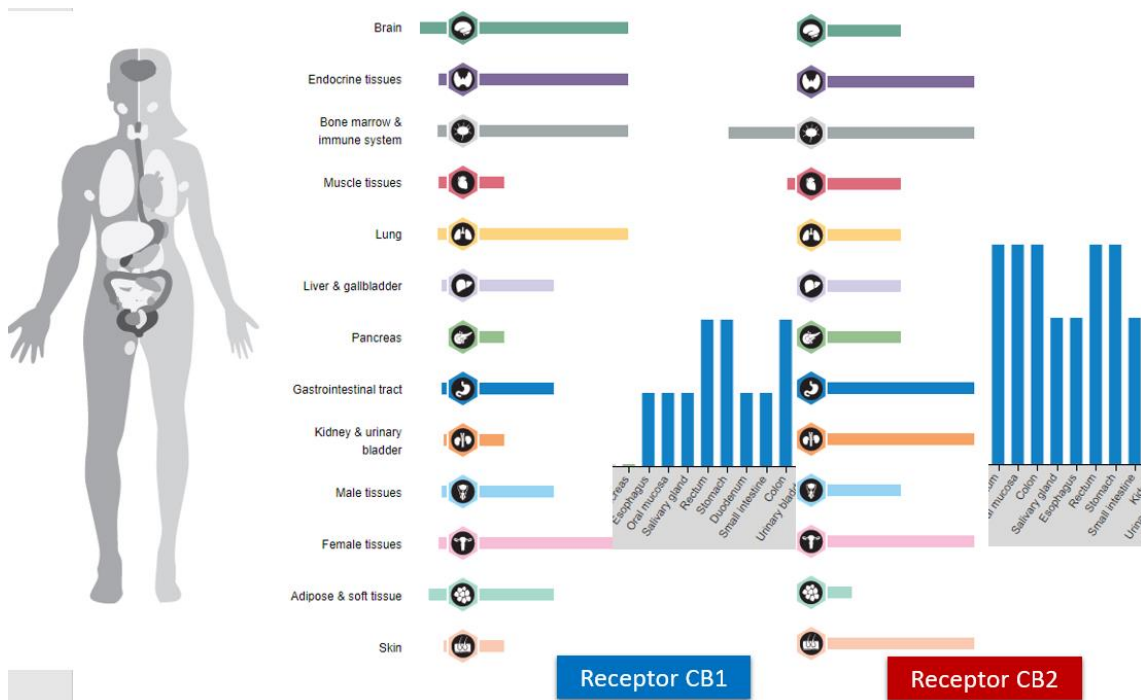
Así mismo, otro factor relacionado al cáncer de recto es la presencia de la familia de receptores de Tirocin-cinasa del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) dentro de los cuales se encuentran Receptor epidérmico humano tipo 1, 2 4 y 4 (Her1, 2 3 y 4), Factor de transición mesenquimal epidelial, (C-MET), , Receptor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGFR-1), Receptor de crecimiento vascular endotelial (VEGF-R), los cuales se manejan a través de la vía de Ras/Raf, PI3K/PTEN, Akt/mTOR los cuales tienen efectos sobre la progresión del ciclo celular, diferenciación, invasión, y desarrollan procesos dirigidos hacia apoptosis, transcripción y angiogénesis. Éstos han sido utilizados como blancos terapéuticos con los diferentes medicamentos como se muestran en el siguiente diagrama. (Figura 2)



**Figura 3.**  
Vista general de las vías celulares que participan en la proliferación y progresión del cáncer colorrectal  
Diagrama tomado de J Natl Cancer Inst 2009;101:1308-1324

Las vías por las cuales pueden ejercer su efecto es a través de los receptores CB1 y CB2 los cuales son receptores mediados por Proteína G (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Los endocannabinoides son derivados del ácido araquidónico asociado a una cabeza con polaridad. (Piomelli, 2003). En el proyecto Human Protein Atlas se menciona la alta expresión de los receptores a nivel rectal, como concierne a éste estudio, encontrando CB2 principalmente en las células glandulares, así mismo se menciona

expresividad moderada del receptor CB1 en células glandulares de recto y ambos en células de cancer colorrectal. (THE HUMAN PROTEIN ATLAS)



**Figura 4.** Expresión de Receptores de Cannabinoides en el Cuerpo Humano. **Figura modificada del Protein Genome Atlas.**

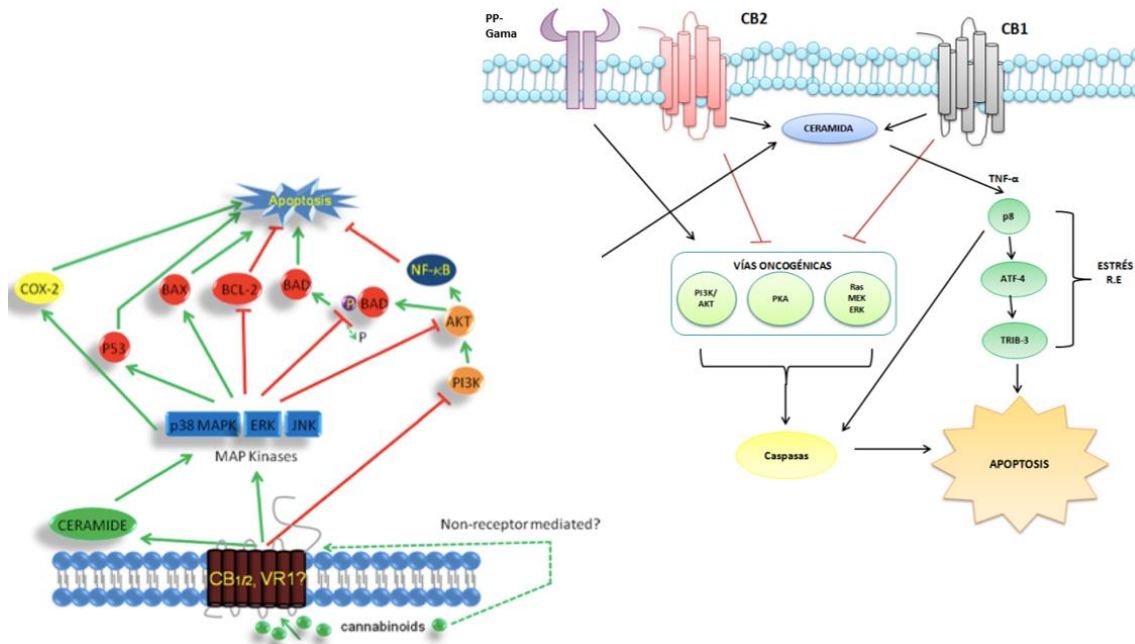
En algunos estudios se ha observado que existen diferentes vías de actuar por parte de los receptores cannabinoides, se menciona que el receptor asociado a muerte tumoral es el CB1 ya que por una parte como se explicará delante promueve el incremento en la cantidad de ceramidas que promueve estrés oxidativo, vías a través de la inhibición de AKT, ERK y MAP cinasas (Bifulco 2007 y Caffarel 2010), autofagia media por AMPK (Vara 2011), inhibición del ciclo celular (Laezza 2006) y algunos otros por receptores aún desconocidos (Gustafsson 2009). La actividad del receptor CB1 se ha asociado a un mejor pronóstico en pacientes con cáncer de lengua (Theocharis 2015) Sin embargo el recetor CB2, al menos en cáncer de mama, se ha asociado con un pobre pronóstico en los pacientes Her2 positivos en los cuales se asoció a a una respuesta pro-oncogénica ya que se promueve la actividad de tirocincinasa s-SRC (Pérez-Gómez 2015), y por el contrario, en los pacientes con receptores triple neativo en cancer de mama, la activación de éstos receptores se asoció a muerte celular tumoral (Morales 2015). Así fue demostrado por diversos estudios que éstos receptores cannabinoides asociados a

receptores de factores de crecimiento epidérmico forma heterodímeros que realizan una acción reversa en la función normal de éstos receptores.

Una de las vías en las cuales se ha demostrado incrementa la agresividad tisular de las células neoplásicas es ante la producción de especies reactivas dependientes de oxígeno. **(Ligresti et al., 2006; Massi et al., 2006; McKallip et al., 2006; McAllister et al., 2011; Massi et al., 2012; De Petrocellis et al., 2013)**. Sin embargo, se han encontrado otras vías en las cuales se comparten los mecanismos en la progresión tumoral.

Las vías que se utilizan como mecanismo antineoplásico son diversas, y se ha observado que ante un proceso neoplásico en el microambiente tumoral existen cambios ante el crecimiento tumoral como lo es el incremento del 2-araquinoilglicerol (2-AG), **(Irmgard 2016)** pudiendo tener significado ya que éste puede deberse ante el efecto de la respuesta inmune celular, principalmente en zonas periféricas del área inflamada y se ha visto que éste activo (2AG) provoca que el receptor CB2 se active provocando un cambio en la respuesta de un proceso agresivo hacia uno tolerante **(Pacher 2008)** y se ha mencionado la polarización de macrófagos similares a M2 los cuales son denominados “macrófagos asociados a tumor” los cuales tienen la capacidad de promover la invasividad tumoral y metastasis al secretar metaloproteinasas y factores angiogénicos. **(Ley 2013)**

Existen además, otras vías por las cuales tienen acción los cannabinoides como la producción de radicales libres y la disminución secundaria del glutatión, **(Massi et al., 2006)** incremento en NAD(H)P oxidasas (NOX4 y p22phox lo que produce estrés oxidativo lo que produce liberación de citocromo c y activa la vía de las caspasas llevando a la célula a apoptosis **(McKallip et al., 2006)**. Así mismo se ha estudiado que se liberan aniones de calcio llevando a la mitocondria a alteraciones en potencial de membrana disminuyendo la viabilidad celular neoplásica **(Ligresti et al., 2006)** ésta puede ser una vía selectiva debido a la alta tasa metabólica en las células tumorales en comparación con las no transformadas. **(Wondrak, 2009)**. Existen otras vías afectadas como lo son AKT/mTOR y TRIB3 las cuales regula la autofagia **(Cardaci et al., 2012; Sui et al., 2013)**., y éstas vías no necesariamente actúan bajo la interacción en forma agonista con los receptores CB1 y CB2 por separado **(Shrivastava et al., 2011 y Donadelli 2011)** ya que Dando en 2013 demostró que se pueden formar éstas formas reactivas derivadas del oxígeno desde cualquiera de ellos y se pueden producir éstos efectos **(Dando et al., 2013)** a través de la Proteíncinasa de AMP (AMPK).



**Figura 5**

Vías de señalización que inhiben los cannabinoides en células tumorales para conducir a muerte celular. **Esquema modificado Progress in Lipid Research 52 (2013) 80–109 y Life Sciences 165 (2016) 56–62**

Otras de las vías de acción de éstos medicamento se relacionan con la inhibición de la invasión y formación de metástasis s (**Ligresti et al., 2006; McAllister et al., 2007; McAllister et al., 2010; Ramer et al., 2010a**), siendo la migración un paso importante la cual es mediada por proteínas G, sin embargo Vaccani muestra en su papel de 2005 una relación en éste proceso. (**Vaccani et al., 2005**) La invasión es un proceso importante en el crecimiento tumoral ya que ésta destruye los tejidos en contacto con el tumor y se ha demostrado que éste proceso puede ser inhibido mediante cannabidiol en algunas investigaciones (**Ligresti et al., 2006; McAllister et al., 2007; Ramer et al., 2010a; McAllister et al., 2011; Ramer et al., 2011; Ramer et al., 2012; Soroceanu et al., 2012; Murase et al., 2014**). Así también se ha demostrado que los cannabinoides inhiben la expresión de ID1 en cáncer de mama, glioma y pulmón . (**McAllister et al., 2007; Soroceanu et al., 2012; Murase et al., 2014**) (**Fong et al., 2003; Minn et al., 2005; Gupta et al., 2007; Swarbrick et al., 2008**) y el control ante la expresión ectópica del gen Id1 reactiva la capacidad invasiya y mestastásica del tejido. Así mismo otros cannabinoides como el Win 55,212, JWH-015 o JWH-133 (Agonista CB2) inhibieron la progresión celular y formación de metástasis en cáncer de mama y pulmonar (**Qamri et**

**al., 2009; Caffarel et al., 2010; Nasser et al., 2011; Preet et al., 2011)** y se ha visto el cannabidiol inhibe el reclutamiento de Macrófagos asociados a tumor **(Elbaz et al., 2015)**. Otro mecanismo implicado en el desarrollo tumoral es el de angiogénesis el cual se ha visto modificado como en el trabajo de Ramer en el cual se demostró un decremento en la expresión de CD31, un marcador de angiogénesis, en modelos murinos en los cuales había sido implantado cáncer pulmonar **(Ramer et al., 2013)**

Es importante recalcar que éstos efectos se han intentado comprobar in vivo, sin embargo, fue notorio que las concentraciones de los fármacos in vitro son mucho mayores que in vivo en forma significativa, lo cual puede provocar la discrepancia en resultados. **(Torres 2011)** y éstos a su vez presentan metabolismo de primer paso lo cual producen metabolitos que reducen la actividad terapéutica **(Perez-Reyes et al., 1973; Ohlsson et al., 1980)**. Además, no existen publicaciones sobre la farmacocinética de los cannabinoides en relación la actividad antitumoral o como sensibilizante a los medicamentos de primera línea.

Éste estudio se encuentra dirigido hacia una línea tumoral celular en recto, Patsos en 2005 ante el uso de anandamida se presenta un incremento en la producción de PGE2/PGE2-EA y éstos al ser dependientes del metabolismo de COX-2 y ser sustratos competitivos induce la actividad de ésta enzima llevando a la célula a muerte celular, explicando una de las vías de acción en colon. **(Patsos, 2005)**. Aviello en 2012 menciona que el cannabidiol, un fitocannabinoide se asocia con la disregulación de phospho-Akt e incrementa la actividad de Caspasa-3. y menciona que puede ser utilizado como quimiopreventivo ya que al activar receptores CB1, TRPV1 y PPAR-gamma disminuye el daño oxidativo al DNA. **(Aviello, 2012)**. Finalmente Romano en 2014 menciona que el cannabidiol es activo en células tumorales, más no lo es en células normales y menciona que el receptor CB1 es el implicado en la reducción de proliferación celular y ya realizado en modelos murinos de cáncer de colon se mostró que redujo la acción de agentes carcinogénicos en la aparición de pólipos, y disminución del tamaño tumoral. **(Romano, 2014)**

### **Justificación:**

La respuesta patológica completa en cáncer de recto es del 8 al 20% aproximadamente, por lo que el incrementar la respuesta completa en los pacientes tratados con Quimioterapia y Radioterapia concomitante con cáncer de recto locamente avanzado, mejorará el pronóstico de los pacientes en su periodo libre de recaída, por lo que se busca incrementar ésta respuesta, ante esto, el uso de cannabinoides en otras neoplasias presenta respuestas antiproliferativas como se demuestra en el marco teórico, aunque el uso de los cannabinoides se realiza en forma paliativa, por lo que se podrían proponer como tratamiento coadyuvante en algún futuro.

### **Hipótesis**

El tratamiento con los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 a distintas concentraciones y diferentes periodos de tiempo, inducen cambios morfológicos, disminución de la viabilidad y activación de vías asociadas a muerte celular en la línea tumoral recta humana SW-837.

### **Objetivos**

- **General:**
  - Evaluar los efectos anti-tumorales de los agonistas cannabinoides en la línea de recto humana SW-837.
  
- **Específico**
  - ✓ Evaluar la morfología de la línea tumoral de recto humana SW-837 tratada con los distintos agonistas cannabinoides a diferentes tiempos utilizando microscopia en contraste de fases.
  
  - ✓ Evaluar la viabilidad celular de la línea tumoral de recto humana SW-837 con los diferentes agonistas cannabinoides a diferentes concentraciones, mediante la técnica de viabilidad por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-difeniltetrazolio bromida).

- ✓ Analizar los cambios en el perfil electroforético del DNA en presencia de los diferentes agonistas cannabinoides y analizar los posibles mecanismos de muerte celular en la línea tumoral humana SW-837 empleando la técnica de Southern blot.
  
- ✓ Identificar los posibles mecanismos de muerte en la línea tumoral humana AGS tratada con los diferentes agonistas a cannabinoides mediante de citometría de flujo.

## Métodos

### Cultivo celular

La línea celular SW-837 (Adenocarcinoma Recto humano, ATCC CCL-235, Grado IV; con mutaciones en: APC, FAM1238, FBXW7, KRAS, TP53; genes expresados ACE, ketarina, p53 C-T c248, CSAp y Antígeno 3 (-); expresión de antígenos HLA A23, A32, B15, B35; Tipo sanguíneo O; Rh (+) ) se cultivó inicialmente, en botellas T-75 (Corning™) con medio F-12 HAM suplementado con suero bovino fetal (SBF) e incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se crecieron hasta obtener un 70% de confluencia en el cultivo. A las 24 horas las células fueron tripsinizadas y resembradas en placas de 24 pozos (0.5 mL), 6 pozos (2.5 ml) o en cajas petri de 2mL dependiendo del tipo de protocolo experimental a estudiar. Se empleó una densidad de  $7 \times 10^5$  de células por pozo de 0.5 ml para los métodos de análisis morfológico, viabilidad y Southern blot. Se sembraron  $1 \times 10^6$  células por pozo de 2.5 ml para los experimentos de citometría de flujo.

### 6.2 Reactivos.

Los diferentes fármacos utilizados fueron Anandamida (AEA) (Cat. No. 1339) y (R)-(+)-Methanandamida (Meth) (Cat. No. 1121) adquiridos de TOCRIS Bioscience (Bristol, BS, UK). CP-55,940 (Cat. No. 83002-04-4) se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Dimetilsulfoxido (DMSO) (Cat. No. 0231-500mL) AMRESCO™. Como controles positivos empleamos estaurosporina (Cat. No. S6942). Para el estudio de viabilidad celular, empleamos el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA™) (Cat. No. 298-93-1). Para los cultivos de la línea gástrica AGS empleamos el medio de cultivo Ham F-12 (Lot.1556053), tripsina (Cat. No. 25-200-114) y suero bovino fetal (SBF) (Cat. No. MT35011CV) de Gibco (Life Technologies™). Para el Southern blot empleamos los marcadores de peso molecular (100 Bp) de AMRESCO™ (Code K180-250). Para el estudio de citometría empleamos FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD (Cat. No. 640922) (BioLegend, San Diego, CA, USA™). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico y obtenidos de recursos comerciales reconocidos.



### 6.3 Tratamiento con agonistas cannabinoides

Para realizar los ensayos de viabilidad y morfología, la línea celular de recto gástrico SW-837 humana fue sembrada en placas de 24 pozos a una densidad de  $7 \times 10^5$  células por pozo y tratadas con los diferentes agonistas a cannabinoides: Anandamida (AEA), (R)-(+)-Methanandamida (Meth-AEA) y CP-55,940 (CP) con sus respectivos controles a diferentes concentraciones (0.5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) a diferentes tiempos en el cultivo (24, 48 y 72h) y a las 24h para la sobrevivencia. Para todos los ensayos relacionados con los mecanismos de muerte las células AGS fueron tratadas con los diferentes agonistas a cannabinoides a diferentes concentraciones ( $IC_{50}$ ) específicos para cada uno de ellos empleado datos teóricos, debido a la poca información experimental en la líneas de recto. Para los diferentes ensayos se empleó una densidad de  $7 \times 10^5$  para multipozos de 24 (0.5 ml) y para cajas de Petri de 2 mL y una densidad de  $1 \times 10^6$  para placas de 6 pozos (2.5 ml).

### 6.4 Evaluación Morfológica

Se evaluó la morfología de la línea celular de recto SW-837 por 3,6,12 y 24 horas de tratamiento con los diferentes agonistas cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) a diferentes concentraciones ( $IC_{50}$ ; 0.5  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M) y los respectivos controles tratados con dimetil sulfoxido (DMSO). Los cambios morfológicos fueron observados utilizando un microscopio invertido en contraste de fases, denominado, lector multimodal de imágenes celulares (Cytation 5™). Las imágenes se observaron con objetivo 20x. Las imágenes se procesaron mediante el software Gen5™ de BioTek.

### 6.5 Ensayo de viabilidad celular por MTT

La viabilidad de la línea celular fue determinada mediante el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) (Cat. No. 298-93-1). Las células fueron resembradas en placas de 24 pozos, a una densidad de  $7 \times 10^5$  células por pozo y se dejaron adherir durante 24 hr, después fueron sometidas a los diferentes tratamientos con los agonistas

cannabinoides (AEA, Meth-AEA, CP-55,940) a una concentración de 5 $\mu$ M durante 24 horas y los respectivos controles fueron tratados con dimetilsulfoxido (DMSO) (Cat. No. 0231-500mL). Posteriormente se añadió el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) 100  $\mu$ L por pozo y se incubó por 3 horas a 37°C. La reducción del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) a cristales de formazan se determinó sobre una placa de 96 pozos a 595 nm usando un lector de ELISA como marcador indirecto de viabilidad mitocondrial en la línea AGS (, iMark microplate reader™, Bio Rad). Este ensayo fue repetido por triplicado.

#### 6.6 Evaluación de la Fragmentación del DNA por Laddering

La línea celular de recto humana fue resembrada en cajas petri de 2mL con una densidad por pozo de 7x10<sup>5</sup> células, tratadas con los diferentes agonistas cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) a 5  $\mu$ M y un control positivo de muerte apoptótica para el cuál se empleó un inhibidor de cinasas bien descrito como inductor de muerte apoptótica llamado estaurosporina (STS) (Sigma Aldrich™, Cat. No. S6942) a una concentración de 0.5  $\mu$ M por 24 horas. Se realizó la extracción del DNA según las indicaciones del protocolo de extracción para cultivo celular del kit de extracción QIAamp DNA mini kit (Cat.51304) QIAGEN. Se cuantificó la concentración y pureza empleando el espectrofotómetro (NanoDrop 2000™, ThermoFisher). Se analizó el perfil electroforético para lo cual se emplearon 60 ng/ $\mu$ l de DNA obtenido de cada condición experimental. Se evaluó la integridad del DNA empleando un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio sometiendo durante 20 minutos a 100 volts. Los perfiles electroforéticos se observaron empleando un fotodocumentador por fluorescencia (Fusion Fx5™). Este ensayo fue repetido por triplicado con su respectivo control positivo de muerte apoptótica (STS), necrosis (Ionoforo de calcio), y autofagia (Rapamicina).

#### 6.7 Citometría de flujo

Con el propósito de evaluar los mecanismos asociados a muerte celular, la línea SW-837 g fué expuesta a los diferentes cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) por 24 horas a 5  $\mu$ M con su respectivo control sin tratamiento. Una vez tratadas por 24 horas sobre una placa

de 6 pozos y ajustadas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células por pozo, las células SW-837 fueron teñidas con Annexina V (FITC) (Cat. No. 640922) y con 7-AAD (PE-Cy5) (Cat. No. 640922) (BioLegend, San Diego, CA, USA<sup>TM</sup>). Se emplearon, estaurosporina (STS) (Sigma Aldrich)(Cat No. S6942), ionomicina y Rapamicina, como controles positivos de muerte. Las células SW-837 se lisaron y se homogenizaron en 1 mL de buffer de fosfatos (PBS) en diferentes tubos eppendorf de 1.5 mL conforme al diseño del tratamiento con los agonistas. Se cuantificó la densidad celular por condición experimental utilizando un contador de células (Cell Couter, Bio Rad<sup>TM</sup>). Con Anexina V se evaluó apoptosis (temprana y tardía) y con 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) se evaluó la muerte necrótica en la línea AGS. Las células fueron centrifugadas por 5 minutos, se retiró el sobrenadante (PBS) y se re-suspendieron en 1mL de 1X de buffer de unión a Annexina V. Se tomó de cada condición experimental 100 $\mu$ L de la suspensión celular y se transfirió para cada caso a tubos de citometría de 5 mL a cada tubo se le añadieron 5  $\mu$ L de FITC® Annexin V, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos y posteriormente se llevó a un volumen final de 400 $\mu$ L con el Buffer 1X de unión a Annexina V. Realizamos el mismo procedimiento para preparar el 7-AAD (7-Aminoactinnomicina D), pero añadiendo 10  $\mu$ l de 7-AAD (PE-Cy5) en un tubos de citometría de 5mL. La línea SW-837 en cada una de sus condiciones fue analizada utilizando un citometro de Flujo (Attunne Nxt Flow Cytometer, from Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Calif, USA<sup>TM</sup>) y los datos se procesaron mediante FlowJo software 10.1 (Tree Star. Ashland, Or, USA<sup>TM</sup>).

## Resultados

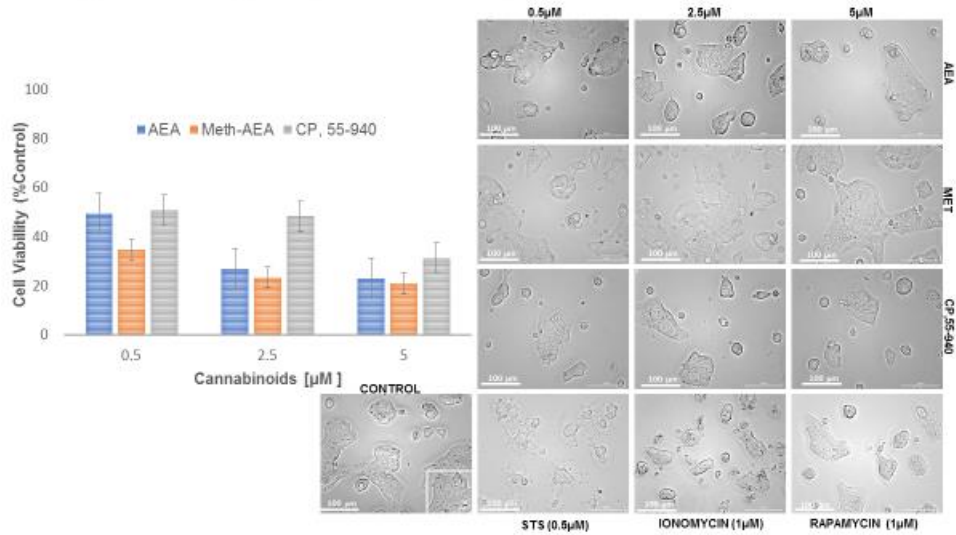
Los principales cambios morfológicos evaluados por contraste de fases inician alrededor de las 3, 6 y 12 hr y son: (AEA) alteraciones en los contractos intercelulares dentro del cúmulo, hinchamiento (vacuolas), disociación de células independientes hacia el medio. En el estudio de viabilidad celular observamos una disminución en la actividad mitocondrial, particularmente, AEA [5µM] 75%-90%-70%, METH [5µM] 80%--80%-90%, CP55940 [5µM] 70%-70%-70% en cada caso experimental a los diferentes tiempos experimentales.

A las 24 h observamos desprendimiento de células de los cúmulos (AEA y CP55940) y fragmentación de células (METH). En el estudio de viabilidad celular observamos una disminución en la actividad mitocondrial, AEA, [5µM] 60%,, METH [5µM] 70%, CP55940 [5µM] 80% en cada caso experimental a los diferentes tiempos experimentales.

Mecanismos Propuestos: muerte autofágica (AEA y CP55940) y necrosis (MET) comparándolo con los cambios morfológicos inducidos por los controles positivos de muerte Ionomicina (1 µM) y Rapamicina (1 µM).

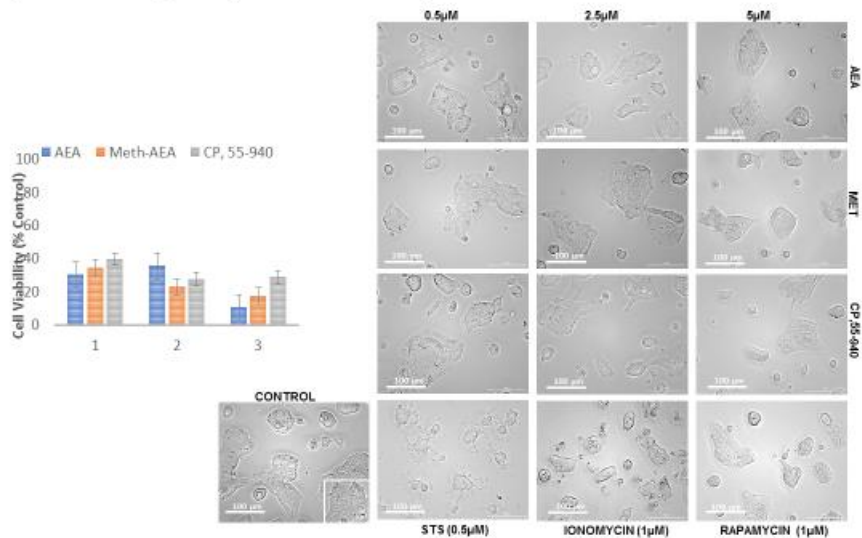
Vías propuestas vías autofagia mTOR1/Raptor/complejo autofagosoma (ULK1, Atg13, FIP200), PI-K/Akt. Necrosis Receptores CB1, CB2 y GRP activada por lipidos (Maurizio Renna, et al., 2010). Necrosis (MAPK), RhoA-ROCK1/ROCK2 y su regulación por miR-144 (disminuye proliferación y migración en cancer de recto). **(Lock FE, et al., 2012)** **(Shang-Dang, et al., 2015)**.

Morfología y Viabilidad de la línea SW837 tratadas con agonistas endógenos y sintéticos a receptores cannabinoides a las 3 horas



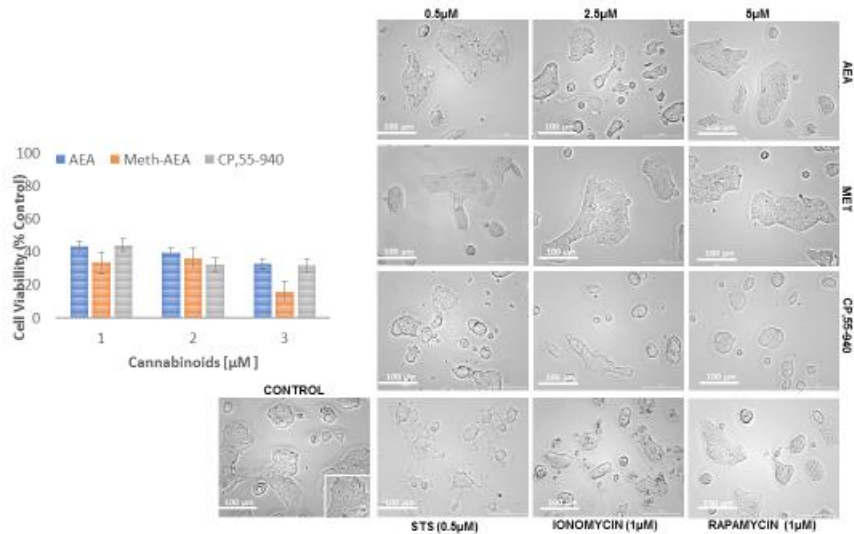
**Figura 6.** Efecto de los Agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55940 sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer de recto SW-837 mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT). SW-837 fue tratada a diferentes concentraciones de cannabinoides (0.5, 2.5 y 5 micromolares) y evaluado a **las 3 hrs**. Los resultados son mostrados como el porcentaje de viabilidad relacionado al control. Cada barra representa el promedio de n=3 experimentos (+/- S.E.M.) por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc (Tukey) para comparar los tratamientos  $p < 0.05$  denota el análisis estadístico de las diferencias con respecto al porcentaje de control

Morfología y Viabilidad de la línea SW-837 tratadas con agonistas endógenos y sintéticos a receptores cannabinoides a las 6 horas



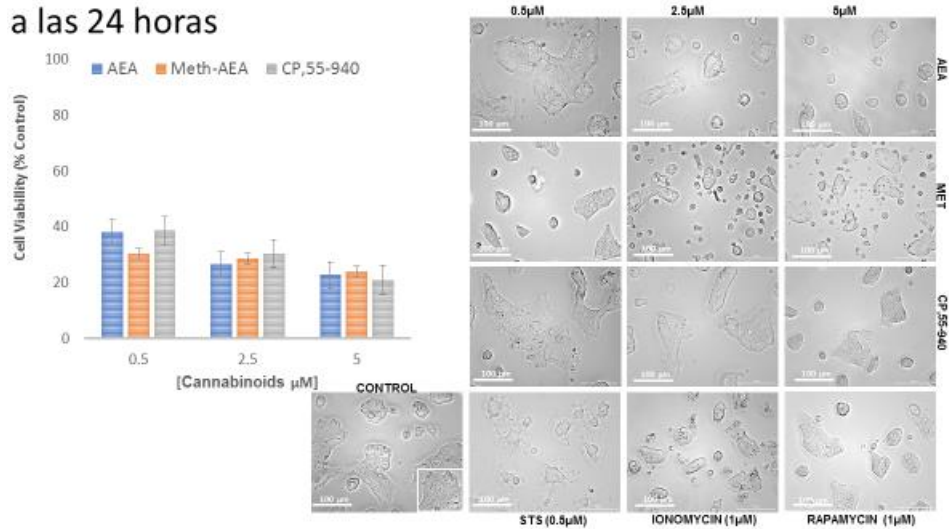
**Figura 7.** Efecto de los Agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55940 sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer de recto SW-837 mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT). SW-837 fue tratada a diferentes concentraciones de cannabinoides (0.5, 2.5 y 5 micromolares) y evaluado a las 6 hrs. Los resultados son mostrados como el porcentaje de viabilidad relacionado al control. Cada barra representa el promedio de n=3 experimentos (+/- S.E.M.) por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc (Tukey) para comparar los tratamientos  $p < 0.05$  denota el análisis estadístico de las diferencias con respecto al porcentaje de control

Morfología y Viabilidad de la línea SW-837 tratadas con agonistas endógenos y sintéticos a receptores cannabinoides a las 12 horas



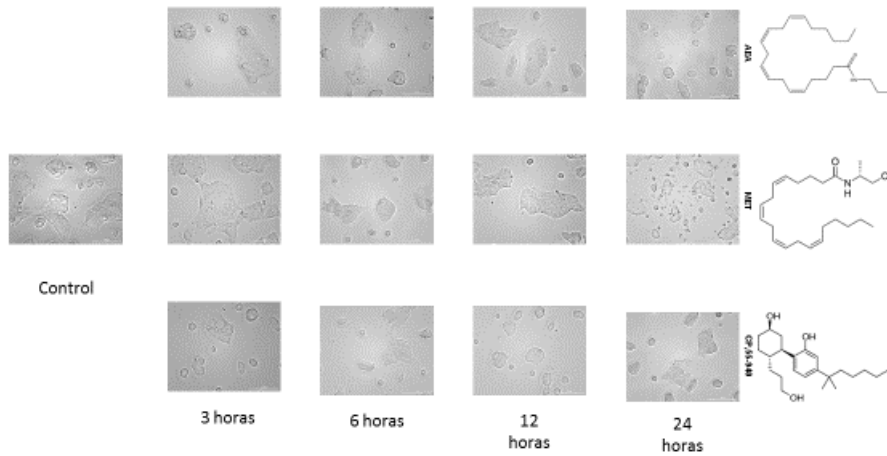
**Figura 8.** Efecto de los Agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55940 sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer de recto SW-837 mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT). SW-837 fue tratada a diferentes concentraciones de cannabinoides (0.5, 2.5 y 5 micromolares) y evaluado a las 12 hrs. Los resultados son mostrados como el porcentaje de viabilidad relacionado al control. Cada barra representa el promedio de n=3 experimentos (+/- S.E.M.) por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc (Tukey) para comparar los tratamientos  $p < 0.05$  denota el análisis estadístico de las diferencias con respecto al porcentaje de control

## Morfología y Viabilidad de la Línea SW-837 tratadas con agonistas endógenos y sintéticos a receptores cannabinoides a las 24 horas

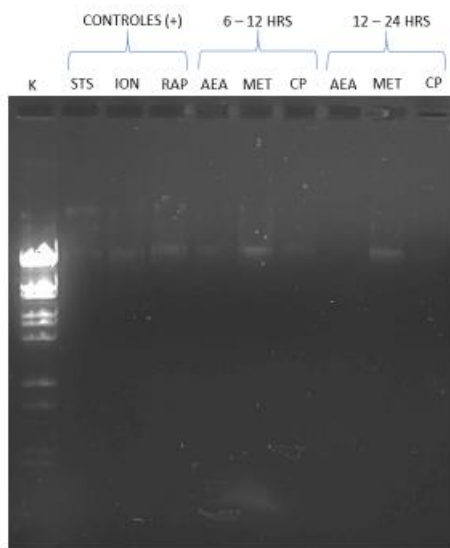


**Figura 9.** Efecto de los Agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55940 sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer de recto SW-837 mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT). SW-837 fue tratada a diferentes concentraciones de cannabinoides (0.5, 2.5 y 5 micromolares) y evaluado a las 24 hrs. Los resultados son mostrados como el porcentaje de viabilidad relacionado al control. Cada barra representa el promedio de n=3 experimentos (+/- S.E.M.) por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc (Tukey) para comparar los tratamientos  $p < 0.05$  denota el análisis estadístico de las diferencias con respecto al porcentaje de control

## Cambios morfológicos en relación a tiempo con concentración a 5 Micromolar



**Figura 10.** Imagen en la que se observan los cambios morfológicos en forma progresiva de acuerdo a los tres diferentes cannabinoides



**Figura 11.** Prueba de Southern blot en la cual no se demuestran cambios en cuanto al patrón de muerte de los diferentes cannabinoides comparado con controles.



## Discusión

En éste trabajo se muestran los efectos de tres agonistas cannabinoides, anandamida, meth-anandamida y CP, los cuales se relacionaron con cambios morfológicos, y con la actividad mitocondrial. Evaluamos los mecanismos de muerte en las células de adenocarcinoma de Recto de alto grado, los cuales fueron probados a tres tiempos diferentes y en tres concentraciones diferentes de cannabinoides endógenos y sintéticos. En los diferentes experimentos, los tres cannabinoides mostraron efectos similares alterando la morfología celular, desagrupando las células y mostrando rasgos de muerte celular manifestados por picnosis y formación de vacuolas.

En éste estudio se mostró que empleando la concentración mas alta de 5 micromolar, a las 24 h observamos los mayores cambios en la dispersión celular, formación de vacuolas y mayores cambios en la morfología citoplasmática, sin embargo, aCP y anandamida, no se mostraron cambios tan significativos en la morfología. De igual manera los cambios morfológicos son diferentes lo que reflejaría la activación de mecanismos diferentes asociados a autofagia comparándolo con los resultados morfológicos con metaanandamida asociada a mecanismos necróticos. En los estudios de Greenhough **(Greenhough 2007)**, se muestra con las línea celular de cáncer de colon inhibición de las vías de RAS/MAPK y PI3K-AKT relacionadas con apoptosis y autofagia respectivamente.

Los ensayos mostrados en otros estudios sobre cáncer de colon, que fue tomado como semejanza y se abarca como una entidad única “colorrectal” no permite diferenciar el comportamiento biológico entre las diversas zonas que ya son conocidas por presentar patrones neoplásicos moleculares diferentes, porque al no encontrar trabajos sobre cáncer de recto en cultivos celulares y mostrar los efectos de los cannabinoides, se buscaron como analogía los realizados en la línea celular SW 480 la cual pertenece a cáncer de colon y el uso de THC, la cual muestra un efecto en la supervivencia celular dependiente de concentración y en gran medida relacionado a apoptosis, sin embargo participan otras vías alternas para poder ésta ser evaluada. y demostró en el estudio que la vía probablemente implicada es a través del receptor CB1 ante la inhibición de RAS-MAPK/ERK y PI3K-AKT, además de haber activado las vías de muerte a través de BCL-2 llevándolas a muerte celular programada, lo cual fue comprobado mediante el bloqueo de BAD se comprueba ésta actividad. **(Greenhough, 2007)**. En otro estudio en el cual se

utilizó un cannabinoide sintético de nombre WIN 55212 y Cannabidiol en el mismo cultivo celular de cáncer de colon SW 480 se demostró que los cannabinoides inhiben la proliferación celular e inducen apoptosis mediada a través de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2. Se mostró que existe expresión en el mRNA de las fosfatasa de tirosina las cuales tienen un efecto antineoplásico con los cannabinoides, así como con otras sustancias como la curcumina, reveratrol, ácido ursólico, ácido betulico, sesquiterpenoides y ácido retinico. Se mostró en éste estudio que WIN reduce dramáticamente la fosforilación de AKT sin reducir la concentración de AKT no fosforilada, así como también induce la fosforilación de p38 (proteincinasa de estrés). Se utilizó PARP, proteína caspasa dependiente la cual indica la división y actividad de ésta vía apoptótica, junto a caspasa 3, y comprobada ante el uso de SOV (un inhibidor de fosfatasa, mostrando y recalcando su actividad apoptótica. **(Sreevalsan 2011)**

Se han realizado numerosos ensayos en diferentes líneas celulares empleando agonistas a receptores CB1 y CB2 en diferentes neoplasias, como en cáncer de mama, lengua, colon, glioma y pulmón **(McAllister et al., 2007; Soroceanu et al., 2012; Murase et al., 2014) (Fong et al., 2003; Minn et al., 2005; Gupta et al., 2007; Swarbrick et al., 2008) (Morales 2015) (Theocharis 2015) (Massi et al., 2006) (Patsos, 2005)** donde se ha visto actividad antiproliferativa.

En este trabajo proponemos la asociación de la vía autofagica mTOR1/Raptor/complejo autofagosoma (ULK1, Atg13, FIP200), y PI3K/Akt. Para el mecanismo Necrótico la señalización primaria a través de los Receptores CB1, CB2 y GRP activada por lípidos **(Maurizio Renna, et al., 2010)**. Otras vías implicadas en la Necrosis son la vía de MAPK, RhoA-ROCK1/ROCK2 y se ha descrito su regulación transcripcional por miR-144 (disminuye proliferación y migración en cancer de recto). **(Lock FE, et al., 2012) (Shang-Dang, et al., 2015)**.

Además de las vías propuestas, existen otras relacionadas hacia muerte celular como la vía de COX-2 la cual promueve muerte celular en la línea tumoral de Cancer de colon **(Patsos, 2005)**, y ya descrita ampliamente como mecanismo terapéutico en la inhibición de la formación de pólipos, **(Piazuelo, 2015)**.

En otros estudios, se ha visto un incremento en la presencia de calcio iónico intracelular el cual promueve estrés mitocondrial y libera citocromo C **(Maccarrone, 2003)**, y finalmente la presencia de Ceramidas, metabolito de los cannabinoides se realciona, a la activación de diferentes vías apoptosis, detención en el ciclo celular, autofagia y como efecto antiproliferativo **(García-Barros, 2014)**

## **Conclusiones**

Los agonistas cannabinoides (AEA, Meth- AEA y CP 55 940) como agentes antitumorales son altamente efectivos para favorecer procesos de muerte celular en células tumorales, en específico durante éste experimento en células de adenocarcinoma rectal, el cual fue más evidente al alcanzar las 24 horas, sin embargo cada uno de ellos realizó éstos cambios en diferentes tiempos a menor concentración CP-55940 mostró gran actividad, sin embargo ante mayores concentraciones y a mayor tiempo, se evidenciaron mayor número de cambios de vacuolización y picnosis con Meth-AEA, sin embargo significativamente fue más efectivo CP-55940 en el método comprobacional gráfico. Los procesos aún se encuentran en vías de investigación.

## Bibliografía:

1. GLOBOCAN 2012 (IARC) Section of Cancer Surveillance (6/6/2017)
2. Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute.
3. Rizo P, Sierra I, Vázquez G, Cano M, Meneses A, Mohar A. Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000 – 2004. *Cancerología* 2 (2007): 203-287.
4. Lorimer PD, Motz BM, Kirks RC, Boselli DM, Walsh KK, Prabhu RS, Hill JS, Salo JC. Pathologic Complete Response Rates After Neoadjuvant Treatment in Rectal Cancer: An Analysis of the National Cancer Database. *Ann Surg Oncol*. 2017 Aug;24(8):2095-2103.
5. Alexander A, Smith Pf, Rosengren RJ Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Letters* 285 (2009) 6–12
6. Malfitano AM, Ciaglia E, Gangemi G, Gazzero P, Laezza C, Bifulco M Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Mar;15(3):297-308
7. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*. 2002; 296:678–682.
8. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5:400–411.
9. Di Marzo, V.; Melck, D.; de Petrocellis, L.; Bisogno, T. Cannabimimetic fatty acid derivatives in cancer and inflammation. *Prostaglandins Lipid Mediat*. 2000, 61, 43–61. [
10. Jahn KA, Su Y, Braet F. Multifaceted nature of membrane microdomains in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2011; 17(6): 681-690
11. Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Balfour J, Bardelli A. Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor – Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101: 1308–1324
12. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus S, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almong S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of a 2-mono-glyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol*. 1995; 50:83–90.
13. Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2Arachidonoylglycerol: a possible cannabinoid receptor ligand in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1995; 215:89–97.

14. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003; 4:873–884.
15. Sean D. McAllister, Liliana Soroceanu, and Pierre-Yves Desprez. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 June; 10(2): 255–267.
16. Human Proteín Atlas. [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org). Cannabinoid Receptors
17. Bifulco, M.; Laezza, C.; Gazerro, P.; Pentimalli, F. Endocannabinoids as emerging suppressors of angiogenesis and tumor invasion (review). *Oncol. Rep.* 2007, 17, 813–816.
18. Caffarel, M.M.; Andradas, C.; Mira, E.; Perez-Gomez, E.; Cerutti, C.; Moreno-Bueno, G.; Flores, J.M.; Garcia-Real, I.; Palacios, J.; Manes, S.; et al. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol. Cancer* 2010, 9, 196.
19. Vara, D.; Salazar, M.; Olea-Herrero, N.; Guzman, M.; Velasco, G.; Diaz-Laviada, I. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: Role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ.* 2011, 18, 1099–1111.
20. 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 Lett.* 2006, 580, 6076–6082.
21. Gustafsson, S.B.; Lindgren, T.; Jonsson, M.; Jacobsson, S.O. Cannabinoid receptor-independent cytotoxic effects of cannabinoids in human colorectal carcinoma cells: Synergism with 5-fluorouracil. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009, 63, 691–701.
22. Theocharis, S.; Giaginis, C.; Alexandrou, P.; Rodriguez, J.; Tasoulas, J.; Danas, E.; Patsouris, E.; Klijanienko, J. Evaluation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: Associations with clinicopathological parameters and patients' survival. *Tumour Biol.* 2015, 1–10
23. Perez-Gomez, E.; Andradas, C.; Blasco-Benito, S.; Caffarel, M.M.; Garcia-Taboada, E.; Villa-Morales, M.; Moreno, E.; Hamann, S.; Martin-Villar, E.; Flores, J.M.; et al. Role of cannabinoid receptor CB2 in HER2 pro-oncogenic signaling in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015, 107, djv077.
24. Morales, P.; Blasco-Benito, S.; Andradas, C.; Gomez-Canas, M.; Flores, J.M.; Goya, P.; Fernandez-Ruiz, J.; Sanchez, C.; Jagerovic, N. Selective, nontoxic CB(2) cannabinoid o-quinone with in vivo activity against triple-negative breast cancer. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 2256–2264.
25. Ligresti A, Moriello 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.
26. Irmgard Tegeder . *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 230; doi:10.3390/ijms17020230
  27. Pacher, P.; Ungvari, Z. Pleiotropic effects of the CB2 cannabinoid receptor activation on human monocyte migration: Implications for atherosclerosis and inflammatory diseases. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008, 294, H1133–H1134
  28. Ley, S.; Weigert, A.; Heriche, J.K.; Mille-Baker, B.; Janssen, R.A.; Brune, B. RNAi screen in apoptotic cancer cell-stimulated human macrophages reveals co-regulation of IL-6/IL-10 expression. *Immunobiology* 2013, 218, 40–51. [
  29. 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 Life Sci.* 2006; 63:2057–2066. McKallip et al., 2006;
  30. McAllister SD, Murase R, Christian RT, Lau D, Zielinski AJ, Allison J, Almanza C, Pakdel A, Lee J, Limbad C, Liu Y, Debs RJ, Moore DH, Desprez PY. Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 129:37–47.
  31. Massi P, Solinas M, Cinquina V, Parolaro D. Cannabidiol as Potential Anticancer Drug. *Br J Clin Pharmacol.* 2012.
  32. De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Cristino L, Orlando P, Di Marzo V. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *Br J Pharmacol.* 2013; 168:79–102.
  33. Ligresti A, Moriello 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.
  34. Wondrak GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11:3013–3069.
  35. Srivastava MD, Srivastava BI, Brouhard B. Delta9 tetrahydrocannabinol and cannabidiol alter cytokine production by human immune cells. *Immunopharmacology.* 1998; 40:179–185.
  36. Donadelli M, Dando I, Zaniboni T, Costanzo C, Dalla Pozza E, Scupoli MT, Scarpa A, Zappavigna S, Marra M, Abbruzzese A, Bifulco M, Caraglia M, Palmieri M.

- Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell Death Dis.* 2011; 2:e152.
37. Dando I, Donadelli M, Costanzo C, Dalla Pozza E, D'Alessandro A, Zolla L, Palmieri M. Cannabinoids inhibit energetic metabolism and induce AMPK-dependent autophagy in pancreatic cancer cells. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e664.
  38. Cardaci S, Filomeni G, Ciriolo MR. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. *J Cell Sci.* 2012; 125:2115–2125
  39. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C, Pan H. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 2013; 4:e838.
  40. 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; 6:2921–2927.
  41. Ramer R, Bublitz K, Freimuth N, Merkord J, Rohde H, Haustein M, Borchert P, Schmuhl E, Linnebacher M, Hinz B. Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J.* 2011
  42. Ramer R, Bublitz K, Freimuth N, Merkord J, Rohde H, Haustein M, Borchert P, Schmuhl E, Linnebacher M, Hinz B. Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis via intercellular adhesion molecule-1. *FASEB J.* 2012; 26:1535–1548.
  43. Soroceanu L, Murase R, Limbad C, Singer EL, Allison J, Adrados I, Kawamura R, Pakdel A, Fukuyo Y, Nguyen D, Khan S, Arauz R, Yount GL, Moore D, Desprez PY, McAllister SD. Id-1 is a Key Transcriptional Regulator of Glioblastoma Aggressiveness and a Novel Therapeutic Target. *Cancer Res.* 2012
  44. Murase R, Kawamura R, Singer E, Pakdel A, Sarma P, Judkins J, Elwakeel E, Dayal S, MartinezMartinez E, Amere M, Gujjar R, Mahadevan A, Desprez PY, McAllister SD. Targeting multiple cannabinoid antitumor pathways with a resorcinol derivative leads to inhibition of advanced stages of breast cancer. *Br J Pharmacol.* 2014
  45. Fong S, Itahana Y, Sumida T, Singh J, Coppe JP, Liu Y, Richards PC, Bennington JL, Lee NM, Debs RJ, Desprez PY. Id-1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:13543–13548.
  46. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature.* 2005; 436:518–524.

47. Swarbrick A, Roy E, Allen T, Bishop JM. Id1 cooperates with oncogenic Ras to induce metastatic mammary carcinoma by subversion of the cellular senescence response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:5402–5407.
48. 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; 8:3117–3129.
49. Caffarel MM, Andradas C, Mira E, Perez-Gomez E, Cerutti C, Moreno-Bueno G, Flores JM, GarciaReal I, Palacios J, Manes S, Guzman M, Sanchez C. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol Cancer*. 2010; 9:196
50. Nasser MW, Qamri Z, Deol YS, Smith D, Shilo K, Zou X, Ganju RK. Crosstalk between chemokine receptor CXCR4 and cannabinoid receptor CB2 in modulating breast cancer growth and invasion. *PLoS One*. 2011; 6:e23901.
51. Preet A, Qamri Z, Nasser MW, Prasad A, Shilo K, Zou X, Groopman JE, Ganju RK. Cannabinoid receptors, CB1 and CB2, as novel targets for inhibition of non-small cell lung cancer growth and metastasis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011; 4:65–75.
52. Ramer R, Heinemann K, Merkord J, Rohde H, Salamon A, Linnebacher M, Hinz B. COX-2 and PPAR-gamma confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2013; 12:69–82
53. Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther*. 1980; 28:409–416
54. Perez-Reyes M, Timmons MC, Davis KH, Wall EM. A comparison of the pharmacological activity in man of intravenously administered D9-tetrahydrocannabinol, cannabiniol, and cannabidiol. *Experientia*. 1973; 29:1368–1369.
55. Torres S, Lorente M, Rodriguez-Fornes F, Hernandez-Tiedra S, Salazar M, Garcia-Taboada E, Barcia J, Guzman M, Velasco G. A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10:90–103.
56. 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* 2005;54: 1741–1750.
57. Aviello G, Romano B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L, Piscitelli F, Di Marzo V, Izzo A. Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med* (2012) 90:925–934



58. Romano B, Borrelli F, Pagano E, Grazia M, Pertwee R, Izzo A. Inhibition of colon carcinogenesis by a standardized Cannabis sativa extract with high content of cannabidiol. *Phytomedicine* 21 (2014) 631–639.
59. Kalady MF, Dejulus KL, Sanchez JA, Jarrar A, Liu X, Manilich E, Skacel M, Church JM. BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum*. 2012 Feb;55(2):128-33.
60. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol* 2015 May 7; 21(17): 5167-5175
61. Sreevalsan S, Joseph S, Jutooru I, Chadalapaka G, Safe S, Induction of Apoptosis by Cannabinoids in Prostate and Colon Cancer Cells Is Phosphatase Dependent. *Anticancer Res*. 2011 November ; 31(11): 3799–3807.
62. Piazuelo E, Lanas A. NSAIDS and gastrointestinal cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015, Jul;120: 91-6.
63. Maccarrone M, Finazzi-Agró A, The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis, *Cell Death Differ*. 10 (2003) 946–955.
64. García-Barros M, Coant N, Truman JP, Snider AJ, Hannun YA. Sphingolipids in colon cáncer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 57514; 10; 4C: 4