

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA**

Rodrigo Guabiraba Brito

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM
UM MODELO EXPERIMENTAL DE ANGIOGÊNESE
INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas:
Fisiologia e Farmacologia,
do Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade
Federal de Minas Gerais,
como pré-requisito para a
obtenção do título de mestre
em Ciências Biológicas:
Ênfase em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Aluno: Rodrigo Guabiraba Brito

Belo Horizonte

2007

Aos sempre supercondutores
do livre pensamento e do
conhecimento irrestrito, Frank
Zappa, Sir Henry Dale e Adélia
Prado.

Ensino

Minha mãe achava estudo
a coisa mais fina do mundo.
Não é.
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.
Aquele dia de noite, o pai fazendo serão,
ela falou comigo:
"Coitado, até essa hora no serviço pesado".
Arrumou pão e café, deixou tacho no fogo com água quente.
Não me falou em amor.
Essa palavra de luxo.

Adélia Prado

"...There was wanting, it seemed to me, only one item of evidence to justify certainty as to the nature of this substance, namely, a proof that acetylcholine itself, and not merely some choline ester of closely similar properties, was an actual constituent of the animal body..."

Sir Henry Dale, Nobel Lecture, 1936

"...The pojama people are boring me to pieces; They make me feel like I am wasting my time..."

Frank Zappa, Po-Jama People, 1975

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do CNPq (CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sistema completo, pelo todo.

Ao meu orientador, Mauro, pelos já "longos" anos de ensinamentos científicos, repreensões construtivas, bom-humor alternativo e apoio quase irrestrito às minhas incursões entusiásticas pelo mundo experimental. Este trabalho também é fruto de sua maquinaria produtiva.

A minha mãe, exemplo raro de perseverança e amor, pelo apoio incondicional desde os primórdios. Hei de agradecer também pelo carinho e pela ajuda no caminhar mais preciso.

Aos familiares realmente próximos, querida madrinha e padrinho, pelas palavras de fé nas recaídas freqüentes do viver na intrépida odisséia humana.

A Amanda Coelho, companheira de labuta e amiga, pela participação mais que fundamental no desenvolvimento de todo este trabalho. Devo muito desta criação à sua boa vontade e altruísmo.

Aos sempre presentes colegas do *Laboratório de Imunofarmacologia*, pelo apoio moral, imoral, técnico e científico, em especial ao amigo Adriano, pela formação mais do que complementar em "ciência geral", a Lucíola, pelos ensinamentos valiosos, a Ester pelo carinho e companheirismo, ao Remo, pela amizade e delírio e também aos essenciais: Angélica, Flávio, F. Lopes, Caio, Vanessa, Antônio, Kátia, Michele, Cris, Rafael, Letícia, Carol, Valdinéria, Dani Sachs e tantos outros bons amigos, sem os quais a sobrevivência diária nestes últimos seis anos beiraria o absurdo maior.

Aos grandes amigos, imemoriais, Vinícius, Daniel Camargos, Léo, companheiros inconstantes e ainda assim tão responsáveis por toda esta forma nada convencional de "estudar" as coisas.

Aos amigos de "formação", tão especiais, Lu, Thiago, Híggor, André, Ana e Mateus, pelas conquistas divididas e pelos sempre excelentes momentos de convívio dentro e fora deste Instituto de Ciências Biológicas.

Aos amigos de alta afinidade, megalomania & *non sense*, caríssimos Daniel Mansur, Chico, Bruno Eduardo, Diogo, Gabriel Magno e Taíssa. Porque o mundo ainda realmente será como deve ser: infinito.

A querida professora Salete, pela forma apaixonante de traduzir ciência e vida em momentos mais do que agradáveis. Este aprendizado é para a vida toda.

A Profa. Sílvia Passos e aos colegas do Laboratório de Angiogênese, por todo apoio e colaboração durante este trabalho.

A Profa. Mônica Ferreira, pela colaboração com as preparações histológicas.

A *Sanofi-Aventis*, por ceder gentilmente os antagonistas canabinóides utilizados neste estudo.

Ao Prof. Ary Corrêa Jr., pelo apoio com as fotografias.

A coordenação e membros da Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, pelo incentivo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XVIII
ABSTRACT	XXI
RESUMO	XXII
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. INFLAMAÇÃO	23
1.1.1. O processo inflamatório	23
1.1.2. Resolução do processo inflamatório e reparo tecidual.....	25
1.1.3. Mediadores do processo inflamatório.....	27
1.2. ANGIOGÊNESE	28
1.2.1. Etapas do processo de neovascularização	29
1.2.2. Regulação do processo angiogênico	31
1.2.3. Relação entre leucócitos e a resposta angiogênica	32
1.2.4. Modelos experimentais para o estudo da angiogênese	33
1.2.4.1. <i>Modelo de implantação subcutânea de esponja</i>	34
1.3. CANABINÓIDES	35
1.3.1. Visão geral	35
1.3.2. Os receptores canabinóides.....	38
1.3.3. Os endocanabinóides.....	40
1.3.4. Agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides.....	44
1.3.5. Sistemas de sinalização dos receptores canabinóides	46
1.3.5.1. <i>Modelos de agonismo inverso</i>	49
1.3.6. Os canabinóides na inflamação e na angiogênese	51
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	58
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59

3. MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1 - Animais	62
3.2 - Implantação da matriz esponjosa.....	62
3.3 – Quantificação da angiogênese pela dosagem de hemoglobina	64
3.4 - Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase (MPO).....	64
3.5 - Quantificação da infiltração de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)	65
3.6 - Ensaio de ELISA para detecção de citocinas e quimiocinas.....	66
3.7 - Análise histológica das matrizes esponjosas	68
3.8 - Análise estatística	68
3.9 – Delineamento experimental.....	69
4. RESULTADOS.....	71
4.1. Efeitos do tratamento sistêmico com os antagonistas dos receptores CB1 e CB2, SR141716A e SR 144528, respectivamente.	71
4.1.1. Efeitos sobre a concentração de hemoglobina na matriz esponjosa.....	71
4.1.2. Efeitos sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa.....	72
4.1.3. Efeitos sobre a concentração de citocinas e quimiocinas na matriz esponjosa.....	75
4.2. Efeitos do tratamento sistêmico com agonista misto dos receptores canabinóides WIN 55,212-2	80
4.2.1. Efeitos sobre a concentração de hemoglobina na matriz esponjosa.....	80
4.2.2. Efeitos sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa.....	81
4.2.3. Efeitos sobre a concentração de citocinas e quimiocinas na matriz esponjosa.....	83
4.3. Efeitos do tratamento local com agonista misto dos receptores canabinóides WIN 55,212-2	87
4.3.1. Efeitos sobre a concentração de hemoglobina na matriz esponjosa.....	87

4.3.2. Efeitos sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa.....	88
4.3.3. Efeitos sobre a concentração de citocinas e quimiocinas na matriz esponjosa.....	90
4.4. Análise histológica dos implantes de esponja após tratamentos com os antagonistas canabinóides SR141716A (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), e com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2	94
4.4.1 – Efeitos do tratamento com antagonistas dos receptores canabinóides sobre o perfil histológico da matriz esponjosa após implante subcutâneo.	95
4.4.2 – Efeitos do tratamento com o agonista misto dos receptores canabinóides sobre o perfil histológico da matriz esponjosa após implante subcutâneo.	98
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÃO	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema simplificado mostrando as etapas do recrutamento leucocitário, mais precisamente de neutrófilos.....	24
FIGURA 2: Mediadores e células envolvidas no processo de reparo tecidual e formação do tecido de granulação após lesão inflamatória (neutrófilos, macrófagos, plaquetas e fibroblastos).	26
FIGURA 3: Esquema simplificado das etapas envolvidas na neovascularização.	30
FIGURA 4: Estrutura molecular do fitocanabinóide Δ -9-THC.	36
FIGURA 5: Estrutura de alguns dos endocanabinóides mais estudados. (A): anandamida; (B): 2-Araquidonoilglicerol (2-AG); (C): 2-Araquidonoildopamina; (D): Virodamina.	42
FIGURA 6: Mecanismo bioquímico de formação da anandamida em tecidos biológicos.	43
FIGURA 7: Mecanismos de ação intracelulares do endocanabinóide 2-AG (2-araquidonoilglicerol), mediados por receptor canabinóide.	44
FIGURA 8: Agonistas e antagonistas canabinóides. (A) O agonista “não clássico” CP55,940; (B) O aminoalquilindóis WIN 55,212-2; Os antagonistas di-aril-pirazóis SR141716A (C) e SR144528 (D).	45
FIGURA 9: Sistema de sinalização dos receptores canabinóides.....	48
FIGURA 10: Mecanismo intracelular após ativação de receptor canabinóide em célula endotelial ou tumoral, por exemplo.	55

FIGURA 11: Matriz esponjosa. Aspecto da esponja antes da implantação (A) e após 14 dias de implantação (B).....	63
FIGURA 12: Tabela esquemática para o delineamento experimental proposto.....	69
FIGURA 13: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a formação de novos vasos, quantificada através da dosagem de hemoglobina na esponja (método de <i>Drabkin</i>).	72
FIGURA 14: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de neutrófilos, quantificado através da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	74
FIGURA 15: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de macrófagos, quantificado através da dosagem da atividade da <i>N</i> -acetilglicosaminidase (NAG).	75
FIGURA 16: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de TNF- α , quantificada por ELISA.	77
FIGURA 17: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de VEGF, quantificada por ELISA.....	77

FIGURA 18: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CXCL1-3/KC, quantificada por ELISA.....	78
FIGURA 19: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB ₁) e SR144528 (CB ₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CCL5/RANTES, quantificada por ELISA.....	79
FIGURA 20: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a formação de novos vasos, quantificada através da dosagem de hemoglobina na esponja (método de <i>Drabkin</i>).....	81
FIGURA 21: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de neutrófilos, quantificado através da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	82
FIGURA 22: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de macrófagos, quantificado através da dosagem da atividade da <i>N</i> -acetilglicosaminidase (NAG).	83
FIGURA 23: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de TNF- α , quantificada por ELISA.	84
FIGURA 24: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de VEGF, quantificada por ELISA.....	85

FIGURA 25: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CXCL1-3/KC, quantificada por ELISA.	86
FIGURA 26: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CCL2/JE, quantificada por ELISA.	86
FIGURA 27: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a formação de novos vasos, quantificada através da dosagem de hemoglobina na esponja (método de <i>Drabkin</i>).	88
FIGURA 28: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de neutrófilos, quantificado através da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).	89
FIGURA 29: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de macrófagos, quantificado através da dosagem da atividade da <i>N</i> -acetilglicosaminidase (NAG).	90
FIGURA 30: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de TNF- α , quantificada por ELISA.	91
FIGURA 31: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de VEGF, quantificada por ELISA.	92

FIGURA 32: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CXCL1-3/KC, quantificada por ELISA.	93
FIGURA 33: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CCL2/JE, quantificada por ELISA.	93
FIGURA 34: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados com os antagonistas canabinóides SR141716A e SR144528 (10 mg/Kg) por 7 dias.....	96
FIGURA 35: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados com os antagonistas canabinóides SR141716A e SR144528 (10 mg/Kg) por 14 dias.....	97
FIGURA 36: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados sistemicamente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 7 dias.	99
FIGURA 37: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados sistemicamente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 14 dias. .	100
FIGURA 38: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados localmente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 14 dias.....	100

FIGURA 39: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados localmente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 7 dias.....101

LISTA DE ABREVIATURAS

- Δ -9-THC** - delta-9-tetrahydrocannabinol
- 2-AG** - 2-araquidonoilglicerol
- AKT (PKB)** - Proteína quinase B
- AMPc** - Monofosfato de adenosina cíclico
- Ang2** - Angiopietina 2
- BSA** - soroalbumina bovina
- CB₁** - Receptor canabinóide do tipo 1
- CB₂** - Receptor canabinóide do tipo 2
- cDNA** - DNA complementar
- CCL2 (JE)** - Proteína quimiotática para monócito – 1 (MCP-1)
- CXC** - Grupo de quimiocinas com uma cisteína entre os dois resíduos amino-terminais
- CXCL1-3 (KC)** - Quimiocina derivada de queratinócito
- dH₂O** - água destilada
- DMSO** - dimetilsulfóxido
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético (“EthyleneDiamineTetrAcetic acid”).
- ERK** - *extracellular signal-regulated kinase*
- ELISA** - “*Enzyme-linked immunosorbent assay*”
- EPM** - Erro padrão da média
- FAN** - fator associado com a ativação neutra da esfingomielinase
- g** - Gramas
- GPCRs** - Receptores acoplados à proteína G
- GTP** - Trifosfato de Guanina
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄** - Ácido sulfúrico
- H.E.** - Hematoxilina e Eosina
- HTAB** - Brometo de “*hexadecyltrimethylammonium*”.
- HU-210** - dexabinol
- i.p.** - Intraperitoneal
- ICAM ()** - Molécula de adesão celular (“*Cell Adhesion Molecule*”) ()
- IFN- γ** - Interferon do tipo gama

IL - () - interleucina ()
IL-1 - Interleucina -1
IL-6 - Interleucina -6
IL-10 - Interleucina -10
IP - Intra-peritoneal
kD - Kilodalton
Kg - Kilogramas
LPS - Lipopolissacarídeo da parede bacteriana
M - Matriz
MadCAM - Adressina vascular de mucosa
MAP - *mitogen-activated protein*
MEK - *mitogen-activated protein kinase kinase*
MCP-() - Proteína quimiotática para monócito – ()
MCP-1 - Proteína quimiotática para monócito - 1
mg - Miligramas
Milli-Q H₂O - água ultra pura
min - Minutos
MIP-1 α (CCL3) - *Macrophage inflammatory protein 1 α*
mL - Mililitros
mM - Milimolar
MMP () - Metaloproteinase de matriz tipo ()
MMPs - Metaloproteinases de matriz ("*Matrix Metalloproteinases*")
MPO - Mieloperoxidase.
MMPs - Metaloproteinases
 μ g - microgramas
 μ m - micrometros
n - número de animais
NaCl - Cloreto de sódio
NaEDTA - EDTA de sódio
NAG - *N*-acetilglicosaminidase
NAPE - *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina
NaPO₄ - Fosfato de sódio
NF- κ B - Fator nuclear κ B

nM - NanoMolar
nm - Nanômetro
NO - Óxido nítrico
NO-sintase - Óxido nítrico sintase
O. D. - Densidade óptica
°C - Graus celsius
PAF - *Platelet activating factor* (Fator de ativação plaquetária)
PBS - Tampão fosfato de sódio ("*Phosphate-buffered saline*").
PE 10 - polipropileno 10
PECAM - Molécula de adesão celular endotélio-plaqueta
pg - picogramas
PI3K - fosfoinositídeo 3'-quinase
PKA - Proteína quinase A
PKC - Proteína quinase C
PLC - Fosfolipase C
RANTES (CCL5) - *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*
rpm - Rotações por minuto
s.c. - Subcutâneo
SDS - Dodecil sulfato de sódio Sodium dodecyl sulfate
TGF-β - Fator de crescimento transformador beta ("*Transforming growth factor β*")
TIMP - Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz ("*Tissue inhibitor of MMPs*")
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
tPA - Ativador de plasminogênio tipo tecidual ("*Tissue type plasminogen activator*")
Tris - (*Hydroxymethyl*)aminomethane
uPA - Ativador de plasminogênio tipo uroquinase ("*Urokinase-type plasminogen activator*")
uPAR - receptor uPA
VCAM () - moléculas de adesão em células vasculares ()
VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial (*Vascular endothelial growth factor*)

ABSTRACT

Angiogenesis depends on a complex network of cells and mediators. The activation or blockade of cannabinoid receptors showed to be an interesting pharmacological strategy to attenuate the angiogenic and/or inflammatory response in many experimental models. Here we investigated how this strategy may interfere in inflammatory angiogenesis. Polyester-polyurethane sponges were implanted in C57BL/6 mice. Animals received daily doses (10 mg/kg, s.c.) of the cannabinoid antagonists SR141716A (CB₁) and SR144528 (CB₂), separately, or 3 and 10 mg/Kg (30 or 100 µg/mice, for the local treatment) (s.c.) of the cannabinoid CB₁/CB₂ agonist WIN 55212-2, for 7 or 14 days. The implants were then collected for ELISA, hemoglobin, myeloperoxidase and *N*-acetylglucosaminidase measurements, used as indexes for angiogenesis, neutrophil and macrophage accumulation, respectively. Histological analysis was also conducted. CB₁ or CB₂ receptor antagonist treatment was able to reduce cellular influx to the sponge at 7 and 14 days, with distinctive pattern for macrophages and neutrophils. The CB₁/CB₂ agonist also reduced cellular influx. Both treatments affected angiogenesis. These alterations were accompanied by changes in the levels of TNF- α , VEGF, CXCL1-3/KC, CCL2/JE and RANTES, depending on the treatment. All changes correspond to a similar pattern in the histological analysis. The blockade or activation of cannabinoid receptors showed to be effective in reducing inflammatory and angiogenic responses. Although acting in a similar way, levels of cytokines, chemokines and endocannabinoids may help explain this paradoxal response. Partial agonism / inverse agonism activity and receptor desensitization is another explanation for these responses.

Keywords: angiogenesis, inflammation, cannabinoid receptors, cytokines

RESUMO

A angiogênese é controlada por uma complexa rede de células e mediadores. A ativação ou bloqueio de receptores canabinóides demonstram ser uma interessante estratégia farmacológica para atenuar a resposta angiogênica e/ou inflamatória em vários modelos experimentais. Aqui investigamos como esta estratégia pode interferir na angiogênese inflamatória. Esponjas de polyester-poliuretana foram implantadas em camundongos C57BL/6. Os animais receberam doses diárias (10 mg/Kg, s.c.) dos antagonistas canabinóides SR141716A (CB₁) and SR144528 (CB₂), separadamente, ou 3 e 10 mg/Kg (30 ou 100 µg/animal, para o tratamento local) (s.c.) do agonista CB₁/CB₂ WIN 55,212-2, por 7 ou 14 dias. Os implantes foram coletados para análises por ELISA, hemoglobina, mieloperoxidase e *N*-acetilglicosaminidase, utilizadas, respectivamente, como *index* para mediadores protéicos, angiogênese e acúmulo de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. O tratamento com os antagonistas CB₁ ou CB₂ levou à redução do influxo celular para a matriz esponjosa nos dias 7 e 14, com padrões distintos para macrófagos e neutrófilos. O agonista CB₁/CB₂ também reduziu o influxo celular. Ambos os tratamentos interferiram na angiogênese. Estas alterações foram acompanhadas por mudanças nos níveis de TNF- α , VEGF, CXCL1-3/KC, CCL2/JE e RANTES, dependendo do tratamento. Todas as mudanças apresentam padrões similares na análise histológica. A ativação ou bloqueio de receptores canabinóides parece ser efetivo em reduzir as respostas angiogênica e inflamatória. Embora agindo de forma similar, níveis de citocinas, quimiocinas e endocanabinóides podem explicar esta resposta paradoxal. Desensibilização dos receptores e atividade agonista parcial / agonista inverso são outras explicações plausíveis para estas respostas.

Palavras chave: angiogênese, inflamação, receptores canabinóides, citocinas

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. INFLAMAÇÃO

1.1.1. O processo inflamatório

A inflamação, o mecanismo filogenético e ontogeneticamente mais antigo, (MAGOR, B. & MAGOR, K., 2001). É uma designação generalista para o conjunto elaborado de reações que ocorrem em tecidos vascularizados após lesão (mecânica, física ou química), infecções ou estimulação imunológica, com o objetivo de eliminar o agente agressor e restaurar a integridade tecidual (ABBAS *et al.*, 2000).

Os principais eventos do processo inflamatório são a ativação do endotélio vascular e o recrutamento e a ativação de leucócitos (MANTOVANI *et al.*, 1997), eventos estes regulados pela produção de mediadores também responsáveis pela iniciação, amplificação e finalização da resposta inflamatória. Apesar de possuir um caráter fundamentalmente protetor (objetivando levar à restauração do tecido lesado), a resposta inflamatória pode ser potencialmente nociva, causando doenças debilitantes (ex. artrite reumatóide, esclerose múltipla e fibrose pulmonar) ou mesmo levando ao óbito (BUCKLE & HEDGECOCK, 1997; McINTYRE *et al.*, 1997).

Após a exposição do tecido ao estímulo inflamatório, mediadores derivados de células residentes e da desgranulação de plaquetas desencadeiam uma cascata inflamatória que culmina com o recrutamento de leucócitos para o sítio de lesão (WEYRICH *et al.*, 2003; GARCÍA-RAMALLO, *et al.*, 2002). A reação inflamatória local caracteriza-se, inicialmente, por vasoconstrição arteriolar transitória (causada

pela contração do músculo liso vascular), seguida por vasodilatação e por aumento da permeabilidade da microvasculatura (devido a alterações no endotélio vascular), resultando em aumento no fluxo sanguíneo local (hiperemia) e na exsudação de líquido rico em proteínas (edema). Segue-se, então, nas vênulas pós-capilares, alterações na capacidade adesiva do endotélio, com conseqüente aumento do rolamento de leucócitos ao longo deste e posterior migração direcional e seletiva destes da circulação sanguínea para o sítio lesado (Figura 1) (CARA *et al.*, 2000; BUTCHER, 1991).

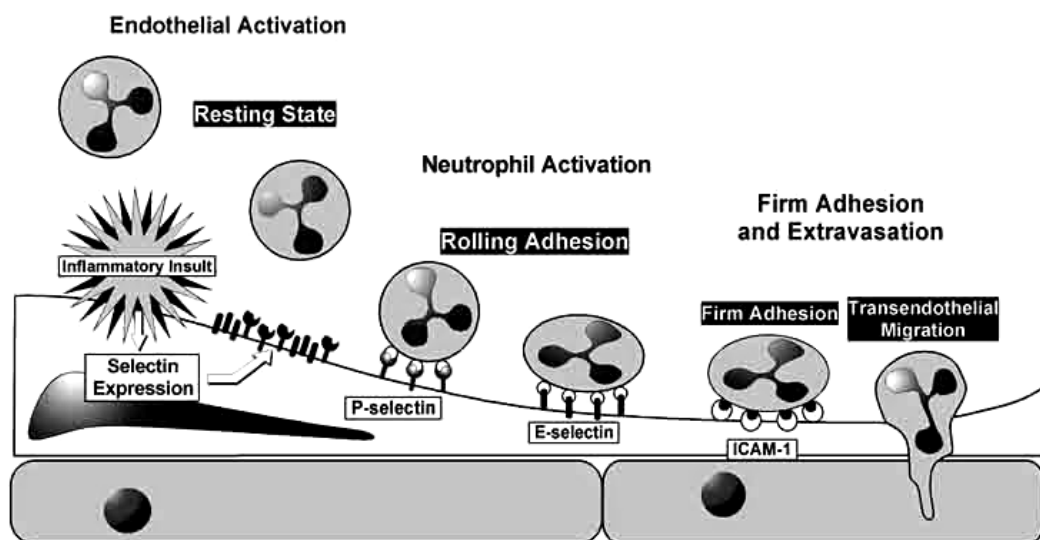


FIGURA 1: Esquema simplificado mostrando as etapas do recrutamento leucocitário, mais precisamente de neutrófilos.

Neutrófilo, em repouso, após insulto inflamatório, margeia o endotélio ativado, expressando selectinas (P-selectina, E-selectina) e começa o rolamento. O processo rolamento / adesão favorece a ativação celular. Adesão firme da célula ao endotélio mediada por ICAM-1 / VCAM-1. Migração através do endotélio. (Adaptado de LAROUX, 2004).

Dentre os tipos celulares predominantes, os neutrófilos são particularmente prevalentes e importantes produtores de mediadores inflamatórios durante a fase inicial do processo. São responsáveis pela resposta fagocítica imediata e pela ação potencialmente destrutiva de seus conteúdos granulares (THEILGAARD-MÖNCH *et al.*, 2004; FAURSCHOU & BORREGAARD, 2003). Os fagócitos mononucleares e as

linhagens linfocitárias se acumulam no sítio lesado em um segundo momento e, uma vez ativados, também produzem moléculas inflamatórias responsáveis pela amplificação e potencial cronicidade do processo. Os macrófagos exercem importante atividade fagocítica envolvida na destruição celular e na remoção de restos celulares e teciduais. Estes macrófagos fagocíticos desaparecerão, posteriormente, por apoptose ou deslocamento para os vasos linfáticos (CHERTOV, 2000; D'AMBROSIO *et al.*, 2000).

1.1.2. Resolução do processo inflamatório e reparo tecidual

Ao final de uma resposta inflamatória aguda, de curta duração, se o agente que desencadeou o processo for eliminado, ocorrerá a resolução do processo inflamatório. Isto implica no término do recrutamento leucocitário, na reversão da vasodilatação e da permeabilidade vascular, na remoção dos restos celulares e teciduais e na restauração da função fisiológica tecidual normal (GILROY *et al.*, 2004).

Embora essencialmente benéfica ao organismo, a inflamação pode se prolongar como resultado da persistência do estímulo inflamatório e causar destruição tecidual, podendo, inclusive, evoluir para um processo crônico. Quando há pouca destruição tecidual, ocorre a reposição das células do parênquima por novas células do mesmo tipo (processo de regeneração). Por outro lado, como decorrência de lesão tissular mais extensa, acontecem tentativas de restauração da arquitetura normal mediante substituição do tecido não regenerado por tecido conjuntivo em um processo denominado "reparo funcional". No entanto, a resposta fibroproliferativa característica do reparo tecidual pode, em condições patológicas,

resultar em cicatrização excessiva (ex. Fibrose pulmonar), pobre (ex. Diabetes) ou mesmo ausente (ex. Tumores sólidos) (GILROY *et al.*, 2004; NATHAN, 2002; WALSH & PEARSON, 2001).

O reparo tecidual é um processo dinâmico, regulado por mediadores solúveis e elementos da matriz extracelular, com coordenada ativação, migração, proliferação e/ou diferenciação de diversos tipos celulares, entre eles células inflamatórias, células endoteliais e fibroblastos (Figura 2). Ao mesmo tempo, vigorosa resposta angiogênica é essencial para a reparação tecidual normal, pois, além de prover nutrientes e mais células inflamatórias para o tecido lesado, contribuindo para a inflamação crônica, os novos vasos sanguíneos facilitam a remoção de material tecidual e auxiliam no desenvolvimento do tecido de granulação (LINGEN, 2001; NISSEN *et al.*, 1998).

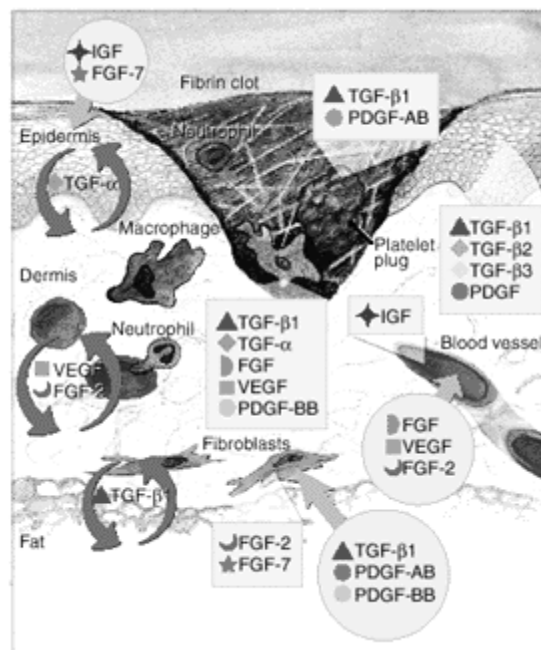


FIGURA 2: Mediadores e células envolvidas no processo de reparo tecidual e formação do tecido de granulação após lesão inflamatória (neutrófilos, macrófagos, plaquetas e fibroblastos).

Observar a participação de diversos fatores de crescimento (FGF: fator de crescimento de fibroblastos; TGF: fator de crescimento transformador; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular). (Adaptado de www.rndsystems.com).

1.1.3. Mediadores do processo inflamatório

Os mediadores inflamatórios são moléculas solúveis que atuam localmente, no sítio da lesão (ou, em maior amplitude, sistemicamente), desencadeando, controlando e/ou modificando a inflamação. Estes mediadores podem se originar do plasma, de células inflamatórias ou dos próprios tecidos lesados e apresentam considerável redundância funcional (GILROY, *et al.* 2004, NATHAN, 2002).

Após lesão tecidual, alguns dos primeiros mediadores atuantes são as aminas vasoativas, as quais são liberadas a partir de grânulos secretores pré-formados de mastócitos, basófilos e/ou plaquetas (DVORAK *et al.*, 1986). Além disso, sistemas enzimáticos derivados do plasma como o sistema do complemento (CARROL, 1998), o sistema de coagulação/fibrinolítico (BECKER *et al.*, 2000; BROWDER *et al.*, 2000) e o sistema de cininas (MARGOLIUS, 1995) são ativados e seus produtos de clivagem serão mediadores, propriamente ditos, responsáveis pela expressão das propriedades inflamatórias inerentes a estes sistemas (Chertov, Yang *et al.* 2000).

Em paralelo, mediadores derivados de células como, por exemplo, mediadores lipídicos (ex. prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas e PAF), citocinas (ex. TNF- α , IFN- γ e IL-1), quimiocinas inflamatórias (MCP's e GRO's) e óxido nítrico (NO) são sintetizados *de novo* e liberados para o meio extracelular. Ainda, neutrófilos e macrófagos, entre outras células, quando ativados podem liberar seus conteúdos granulares e espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio diretamente no meio extracelular ou no interior de fagolisossomas (PETERS-GOLDEN *et al.*, 2004; D'AMBROSIO *et al.*, 2003; SCHWENTKER *et al.*, 2002; SERHAN *et al.*, 1996; ARAI *et al.*, 1990; WEISS, 1989).

1.2. ANGIOGÊNESE

Angiogênese é o termo utilizado em referência ao processo de neoformação de estruturas vasculares a partir de capilares e vênulas pós-capilares pré-existentes em resposta a diversos estímulos, denominados estímulos angiogênicos (FOLKMAN & HAUDENSCHILD, 1980; FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987).

O fenômeno angiogênico é fundamental em uma variedade de processos biológicos e a neovascularização desregulada é um fato importante na patogênese e na progressão de várias doenças (CARMELIET, 2003). Durante processos fisiológicos, como, por exemplo, o desenvolvimento embrionário (ex. vascularização do cérebro e do rim) (AUERBACH, R. & AUERBACH, W, 1997), o ciclo reprodutivo feminino (ex. proliferação endometrial, desenvolvimento do folículo ovariano e formação da rede capilar placentária) (FREDERICK *et al.*, 1984) e processos (ex. cicatrização de feridas) (NISSEN *et al.* 1998), os neovasos contribuem para o suprimento de oxigênio e de nutrientes, bem como para a remoção de produtos de excreção (WHALEN & ZETTER, 1992).

O crescimento excessivo e persistente de neovasos, entretanto, é característico de várias condições patológicas categorizadas como “doenças angiogênicas” (FOLKMAN & KLAGSBRUN, 1987) e, neste caso, está geralmente associado à continuidade e à cronicidade de tais enfermidades. Dentre estas se incluem a artrite reumatóide (CLAVEL *et al.*, 2003), os tumores sólidos (CARMELIET & JAIN, 2000), os tumores hematológicos (PEREZ-ATAYDE *et al.*, 1997), a psoríase (CREAMER *et al.*, 1997) e a retinopatia diabética (RUDERMAN *et al.*, 1992).

Por outro lado, diversas outras condições patológicas estão associadas à vascularização insuficiente. Exemplos destas são as doenças isquêmicas cardíacas (ex. infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva), a diabetes, a doença

oclusiva vascular e as malformações congênitas decorrentes de falhas na vascularização durante a embriogênese (CARMELIET, 2003; HENRY, 1999; FOLKMAN, 1998).

1.2.1. Etapas do processo de neovascularização

O crescimento vascular requer essencialmente migração e proliferação de células endoteliais, porém, estes eventos ocorrem em baixas taxas no organismo adulto normal, quando comparados com as altas taxas de renovação dos tecidos epitelial e hematopoiético (HOBSON & DENEKAMP, 1984). Apesar disso, o amplo espectro funcional do endotélio reflete sua pronta responsividade a programas de ativação e diferenciação (SUMPIO *et al.*, 2002; van HINSBERGH, 2001; BECKER *et al.*, 2000)

O desenvolvimento vascular obedece a uma seqüência altamente organizada de eventos os quais requerem coordenado aparecimento espacial e temporal de células e de moléculas específicas (LIEKENS *et al.*, 2001). Após estímulo desencadeador da resposta angiogênica, a primeira fase desta está associada com a alteração das interações adesivas entre células endoteliais adjacentes e células murais (pericitos) (SCHLINGEMANN *et al.*, 1991). As células endoteliais tornam-se ativadas e começam, então, a produzir novas moléculas como, por exemplo, enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação da membrana basal e da matriz extracelular (Figura 3) (STETLER-STEVENSON, 1999; MOSES, 1997).

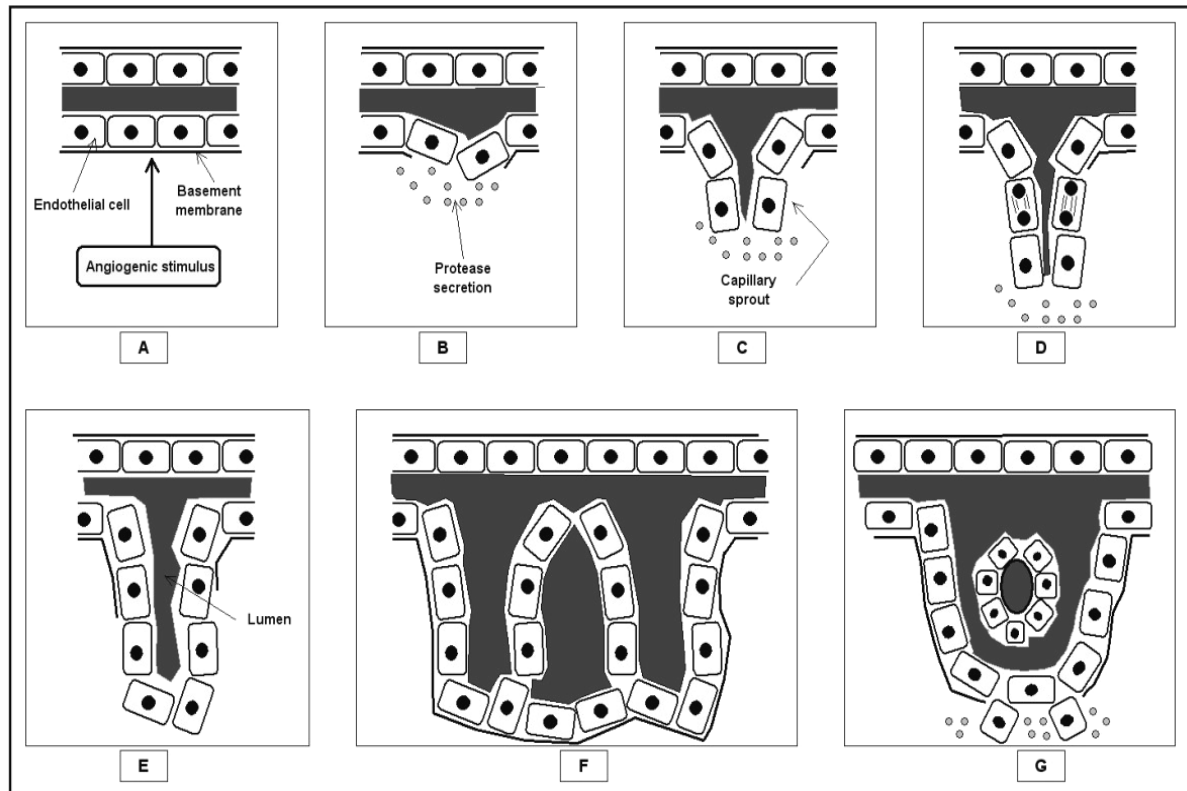


FIGURA 3: Esquema simplificado das etapas envolvidas na neovascularização.

A: Células endoteliais são ativadas por estímulo angiogênico; B: Células endoteliais secretam proteases para degradação da membrana basal e matriz extracelular; C: Broto capilar é formado como resultado da migração direcional de células endoteliais; D: Crescimento por mitose e migração celular; E: Formação de um lúmen e de uma nova membrana basal; F: Dois brotos se juntam para a formação de um *loop* capilar; G: Brotos capilares de segunda geração começam a se formar. (Adaptado de GRIZZI *et al*, 2005).

Em seguida as células endoteliais microvasculares migram em direção ao sítio de origem do estímulo angiogênico, ocasionando a formação de brotos capilares. Conseqüente a estas células migratórias, as células endoteliais proliferam e se diferenciam, alinhando-se para a formação do lúmen tubular (PAPETTI & HERMAN, 2002; BUSSOLINO *et al.*, 1997).

Durante a fase de maturação e estabilização do novo vaso sanguíneo, novos componentes da matriz extracelular são produzidos e depositados sob a forma de

nova membrana basal e os pericitos migram para o local do vaso neoformado, associando-se intimamente à superfície das células endoteliais, provendo suporte estrutural e contribuindo para o controle do crescimento deste. O fluxo sanguíneo é, então, estabelecido e a neovasculatura pode persistir como capilares, diferenciar-se em vênulas ou arteríolas maduras ou sofrer regressão (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000; BECK Jr & D'AMORE, 1997).

1.2.2. Regulação do processo angiogênico

Considerando a complexidade dos processos biológicos, a angiogênese, como tal, implica na presença de vários sistemas de controle (positivos ou negativos), os quais podem se alternar ou mesmo agirem simultaneamente, mas sempre com a prevalência de algum deles em determinado momento. A aquisição do fenótipo angiogênico é dependente do balanço local entre fatores pró- e antiangiogênicos. Embora a estimulação de fatores angiogênicos seja necessária para o desencadeamento do processo, simultâneo controle por fatores antiangiogênicos também é necessário para a precisa continuidade do processo (CAO, 2001; IRUELA-ARISPE & DVORAK, 1997).

Os diversos fatores que regulam a angiogênese se alternam entre mediadores solúveis e moléculas de ligação à membrana celular. Estes fatores podem atuar diretamente nas células endoteliais ou podem atuar indiretamente em outras células-alvo (ex. células inflamatórias e fibroblastos), estimulando a liberação de mediadores por estas (LIEKENS *et al.*, 2001; BEN-AV *et al.*, 1995).

Dentre os mediadores solúveis, as citocinas e quimiocinas são capazes de modular direta ou indiretamente todas as etapas da angiogênese (ROSENKILDE &

SCHWARTZ, 2004; ROMAGNANI *et al.*, 2004). Também podemos ainda citar os fatores de crescimento, dentre os quais o VEGF (vascular endothelial growth factor) é considerado uma das principais moléculas responsáveis pela iniciação e progressão da angiogênese (D'AMORE & SMITH, 1993; HOEBEN *et al.*, 2004), além das proteinases e seus inibidores (uPA, PAI, MMP's e TIMP's), a angiostatina e a endostatina (CAO, 2001; IOZZO & SAN ANTONIO, 2001; HENRIET *et al.*, 1999; STETLER-STEVENSON, 1999; BLEI *et al.*, 1993;).

Além disso, integrinas (ex: $\alpha_v\beta_3$) e moléculas de adesão celular (ex. VE-caderina) contribuem para a migração e a proliferação das células endoteliais, sendo responsáveis por mediar interações célula-célula e célula-matriz extracelular, além de sinais antiapoptóticos (STORGARD *et al.*, 1999; BISCHOFF, 1995; BROOKS *et al.*, 1994). Ainda é importante se frisar que a força mecânica mediada pelo fluxo sanguíneo é capaz de estabilizar o vaso sanguíneo neoformado (LIEKENS *et al.*, 2001).

1.2.3. Relação entre leucócitos e a resposta angiogênica

Leucócitos e células vasculares podem se influenciar reciprocamente de várias maneiras. Por exemplo, durante o reparo tecidual, a angiogênese, além de auxiliar na restauração da perfusão vascular do tecido lesado, facilita o acesso de leucócitos, tais como neutrófilos e macrófagos, para o local da inflamação. Estes leucócitos, por sua vez, são capazes de produzir uma grande quantidade de moléculas reguladoras da angiogênese, incluindo proteinases (como as metaloproteinases), VEGF, TGF- β , TNF- α , quimiocinas e angiostatina. Importante ressaltar que, além de sustentar a indução do crescimento de novos vasos

sanguíneos, os quais sustentam o recrutamento de mais leucócitos para o local inflamado, estes tipos celulares exercem importante papel na inibição do crescimento dos novos vasos sanguíneos, uma vez que podem secretar mediadores que contribuem para a regressão dos vasos neoformados (CROWTHER et al., 2001; BENELLI et al., 2002; LINGEN, 2001).

1.2.4. Modelos experimentais para o estudo da angiogênese

A angiogênese pode ser mensurada qualitativa e quantitativamente por uma variedade de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (JAIN et al., 1997). A maioria das etapas da cascata angiogênica pode ser monitorada *in vitro*, utilizando-se cultura de células endoteliais. Os ensaios mais utilizados são o de migração celular em câmara de Boyden (e suas variações) e o de proliferação, cujos estudos se baseiam, geralmente, na contagem celular, incorporação de timidina ou técnicas de coloração para proliferação ou morte celular (MAIER et al., 1999; LYNCH et al., 1999). Além disso, ensaios para o estudo de processos mais complexos baseados na dissolução de matrizes e na diferenciação de vasos (ex. formação de estruturas parecidas com tubos a partir de células endoteliais cultivadas sobre géis de colágeno ou fibrina) também são utilizados (BISCHOFF, 1995; FOLKMAN & HAUDENSCHILD, 1980). Entretanto, apesar da grande contribuição na identificação de moléculas que estimulam ou inibem essas etapas da angiogênese, nestes ensaios *in vitro*, as células endoteliais precisam ser removidas dos seus microambientes naturais, podendo ter as suas propriedades fisiológicas alteradas (GRIFFIOEN & MOLEMA, 2000).

No caso dos modelos *in vivo*, estes geralmente fornecem informações mais quantitativas. Dentre esses modelos, os mais utilizados são as câmaras transparentes em roedores (orelha de coelho, dorso de camundongo, bochecha de hamster e câmaras cranianas); as preparações teciduais exteriorizadas, cuja mais utilizada é a da membrana corioalantóica de embriões de galinha. As preparações *in situ*, das quais os principais modelos são a córnea de roedores, as bolsas de ar subcutâneas, a cicatrização de feridas cutâneas e a isquemia coronariana e de membros inferiores, além dos modelos de implantes de matrizes de polímeros biocompatíveis, os quais permitem o estudo da contribuição relativa de processos inflamatórios precedentes (CARMELIET *et al.*, 1998; ENGELHARDT *et al.*, 1998; JAIN *et al.*, 1997; COLVILLE-NASH *et al.*, 1995; ROESEL & NANNEY, 1995; ANDRADE *et al.*, 1987).

1.2.4.1. Modelo de implantação subcutânea de esponja

O modelo de implantação subcutânea de esponjas em animais foi descrito inicialmente por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade *et al.* (1987). A implantação de matrizes sintéticas, inicialmente acelulares, induz uma reação inflamatória com conseqüente formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos, representando um sistema interessante para o estudo da angiogênese inflamatória. Dessa maneira, por exemplo, processos naturais como a vascularização de feridas em cicatrização podem ser mimetizados utilizando este modelo. Além disso, uma vez que o estímulo inflamatório é persistente, é presumível o estudo de processos inflamatórios crônicos.

Ainda, o modelo de implante de esponjas permite o estudo temporal do infiltrado inflamatório, a análise bioquímica dos fluidos coletados, o efeito de drogas sobre o processo, além de estudos histológicos e morfométricos (JAIN et al., 1997; BAILEY, 1988). Este modelo é bastante utilizado por ser facilmente reprodutível e possibilitar objetividade na avaliação da neovascularização, bem como o monitoramento contínuo e a investigação morfo-funcional do processo em condições fisiológicas e patológicas, além de possibilitar a avaliação da contribuição relativa do processo inflamatório instalado na matriz esponjosa (JAIN et al., 1997; FORD et al., 1989).

1.3. CANABINÓIDES

1.3.1. Visão geral

O estudo da farmacologia dos canabinóides como conhecemos hoje começou há aproximadamente quarenta anos, quando o delta-9-tetrahidrocanabinol (Δ -9-THC) foi isolado e sintetizado (GAONI & MECHOULAN, 1964), revelando-se o principal componente químico com propriedades psicoativas presente na *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como “marijuana” ou maconha (Figura 4). Uma série de compostos análogos foram sintetizados e têm sido testados em diversos modelos animais, incluindo aqueles para avaliação da antinocicepção, da resposta inflamatória, da memória, do aprendizado, entre outros (HOWLETT et al., 2004).

A *Cannabis sativa* é a droga ilícita mais comumente usada nos Estados Unidos e Europa, assim como em outras partes do mundo, com mais de 46,1% dos jovens entre 17 e 18 anos sendo usuários. Embora a taxa de uso da *Cannabis* seja

inferior a de drogas legais, como o tabaco ou o álcool, ela é significativamente maior do que a de outras drogas ilícitas, como a cocaína e o ecstasy (KLEIN, 2005).

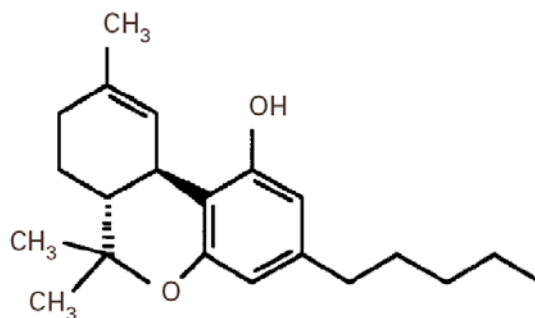


FIGURA 4: Estrutura molecular do fitocanabinóide Δ -9-THC.

Suas aplicações terapêuticas continuam a crescer, tanto que, no início do século vinte, a terapia com a maconha era sendo utilizada para aliviar os sintomas de uma variedade de doenças, da epilepsia a gonorréia (BAKER, *et al.*, 2003). Entretanto, a popularidade da *Cannabis* na terapêutica declinou assim que novos fármacos, mais potentes e específicos, foram sintetizados, e também quando a *Cannabis* foi reconhecida como potencial droga de abuso, sendo seu uso como fármaco abolido ainda no início dos anos quarenta (KLEIN, 2005; BAKER, *et al.*, 2003). As propriedades psicoativas do Δ -9-THC foram prontamente reconhecidas, mas a estrutura química peculiar da droga não oferecia nenhuma pista quanto ao seu mecanismo de ação. A natureza hidrofóbica do Δ -9-THC indicava que o composto provavelmente agiria interferindo na fluidez da membrana plasmática e não atuando sobre um receptor específico. Este impasse foi resolvido com o desenvolvimento de novas classes de análogos potentes e seletivos do Δ -9-THC, o que levou à eventual identificação farmacológica de sítios de ligação “sensíveis a canabinóides” no cérebro (DEVANE *et al.*, 1988; MELVIN & JOHNSON, 1987).

O receptor canabinóide CB₁ foi molecularmente clonado do cérebro de rato em 1990, já o receptor CB₂ foi identificado por homologia de seqüência três anos mais tarde (MATSUDA *et al.*, 1990; MUNRO *et al.*, 1993). Tais descobertas não somente estabeleceram o mecanismo de ação do Δ -9-THC, estimulando o desenvolvimento de antagonista e agonistas seletivos para cada subtipo de receptor, como também iniciou a busca por ligantes endógenos desta classe de receptores. De forma surpreendente, a primeira substância Δ -9-THC-*like* a ser isolada foi um lípido, sendo que o esperado, com base nos precedentes existentes para a morfina e encefalinas, seria um peptídeo. A molécula foi identificada como a amida do ácido araquidônico com uma etanolamina, sendo nomeada anandamida, com base na palavra *ananda*, do sânscrito “bem-aventurança” (DEVANE *et al.*, 1992).

Apesar de não se assemelhar a nenhum dos neurotransmissores conhecidos, a anandamida compartilha afinidades com os eicosanóides, importantes mediadores na inflamação e na dor, com importantes funções na comunicação neuronal. Embora inicialmente controverso, o papel da anandamida na sinalização foi confirmado pela elucidação de uma via metabólica única para o composto assim como a demonstração de sua liberação no cérebro vivo (Di MARZO *et al.*, 1994). Como a busca por compostos Δ -9-THC-*like* continua ativa, outros lípides bioativos foram extraídos de tecidos animais. Estes incluem o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), o éter de noladina, a virodamina e a *N*-araquidonoildopamina (MECHOULAN *et al.*, 1995; HANUS *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2002).

1.3.2. Os receptores canabinóides

A aparente baixa estereoseletividade dos canabinóides, em conjunto com sua alta lipossolubilidade, fez com que se especulasse que estes compostos não agiriam através de um receptor e sim que mudariam as propriedades das membranas lipídicas assim que interagissem com estas (GILL, 1976). Howlett & Fleming (1984), demonstraram que os canabinóides inibiam a ativação da adenilato ciclase em uma linhagem celular de neuroblastoma, com uma potência que mostrava boa correlação com efeitos comportamentais apresentados por humanos e animais. Devane *et al*, (1988), caracterizou um sítio de ligação no cérebro de rato para o [³H] CP55,940, que mostrou a seguinte ordem de potência, para ligantes não marcados: CP55,940 ≥ Δ-9-THC > canabinol. Estes dados foram consistentes com a potência observada em bioensaios para a função de canabinóides.

Herkenham *et al* (1990) demonstrou que sítios de ligação com alta afinidade para o [³H] CP55,940 no cérebro eram mais densos no gânglio basal, no hipocampo e no cerebelo, sugerindo papéis para os canabinóides na cognição e no movimento. Autorradiografias mostraram poucos sítios de ligação nos centros de controle cardiovascular e respiratório, o que é consistente com a baixa toxicidade do Δ-9-THC. Um receptor, agora designado CB₁, foi então clonado por Matsuda *et al* (1990) e por Gerard *et al* (1991), a partir de uma biblioteca de cDNA do tronco encefálico humano. Um segundo receptor, o CB₂, com 48% de homologia com o receptor CB₁, foi clonado do baço por Munro *et al* (1993). Até o momento estes são os dois únicos subtipos de receptores canabinóides reconhecidos, além de uma variante *splice* do receptor CB₁, denominada “receptor CB_{1a}”, que parece ser expressa em baixos níveis em roedores mas não em humanos (SHIRE *et al*,1995). Um terceiro receptor

canabinóide putativo, GPR55, que se liga seletivamente a ligantes canabinóides já conhecidos, foi recentemente descrito (BAKER *et al*, 2006); entretanto, é necessária uma caracterização adicional para identificar o receptor GPR55 como membro da família de receptores canabinóides, ou receptor CB₃.

A seqüência de aminoácidos do receptor CB₁ é relativamente conservada em diversas espécies, incluindo mamíferos, peixes, moluscos, hidra, sanguessuga e outros (ELPHICK & EGERTOVA, 2005), mas não parece ser expresso em insetos (McPARTLAND *et al*, 2001). Os receptores CB₁ são predominantemente encontrados nos terminais pré-sinápticos do sistema nervoso central; entretanto eles também são encontrados em baixa abundância na periferia, incluindo o sistema imune, testículos, endotélio vascular, intestino delgado, fígado e sinapses nervosas periféricas (KUNOS *et al*, 2002; BATKAI *et al*, 2001; SALIO *et al*, 2001; PERTWEE, 1997). Embora os receptores CB₁ sejam encontrados em diversos pontos do cérebro, eles são mais densos no córtex, hipocampo, gânglio basal, cerebelo e medula; esta distribuição é bastante consistente com o efeito dos canabinóides sobre a memória, cognição, movimento e nocicepção (GLASS *et al*, 1997; HERKENHAM *et al*, 1990)

Em contraste com o receptor CB₁, o receptor CB₂ é primariamente expresso em células do sistema imune na periferia e parece ter papel na modulação deste sistema (LYNN & HERKENHAM, 1994; MUNRO *et al*, 1993). Os receptores CB₂ também estão expressos em tonsilas, na medula óssea, timo, pâncreas, na retina do rato adulto e em terminais nervosos periféricos no *vas deferens* de camundongos (GRIFFIN *et al*, 1997). Altos níveis de expressão são encontrados em linfócitos B e células *natural killer* (NK).

A sinalização através de CB₂ parece mediar a inibição da proliferação de linfócitos T causada por canabinóides, modular a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a resposta de linfócitos B (HOWLETT *et al*, 2002). Embora originalmente descrito como ausente no sistema nervoso central (MUNRO *et al*, 1993), o mRNA para o receptor CB₂ foi detectado em células granulares cerebelares (SKAPER *et al*, 1996) e sua expressão é aumentada no tecido nervoso (*upregulation*) após estímulo inflamatório (BENITO *et al*, 2003; 2005). Evidências recentes sugerem, de fato, que há expressão significativa de receptores CB₂ no sistema nervoso central, particularmente em regiões do tronco cefálico (VAN SICKLE *et al*, 2005). Vários ligantes não são capazes de distinguir entre os receptores CB₁ e CB₂, mesmo havendo somente cerca 44% de afinidade entre seqüências de aminoácidos para estes receptores. Este comportamento pode ser explicado pela similaridade entre seus domínios de ligação ortostéricos (identidade de 68%).

1.3.3. Os endocannabinóides

A descoberta de que o fitocanabinóide Δ -9-THC se liga especificamente a receptores com estrutura protéica e desencadeiam eventos de sinalização foi um claro indicativo da existência de um ou mais compostos endógenos que poderiam apresentar a função de neurotransmissor ou hormônio sobre receptores CB₁ e CB₂ no sistema nervoso central ou na periferia. O endocanabinóides são agora reconhecidos como importantes moléculas lipídicas capazes de ativar vias de sinalização intracelulares ao se ligarem a receptores canabinóides presentes no

sistema nervoso central e na periferia, regulando funções fisiológicas, comportamentais e emocionais (FELDER *et al*, 2006).

Desde a descoberta da anandamida, diversas moléculas formadas por ácidos graxos com atividade agonista total ou parcial sobre o receptor CB₁ e/ou CB₂ têm sido extraídas de tecidos animais ou quimicamente sintetizadas. Estas moléculas, entretanto, não modulam diretamente a sinalização do receptor canabinóide, elas afetam uma variedade de proteínas, incluindo canais iônicos (ex: TRPV1), receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (ex: receptores para a serotonina) e enzimas (BEN-SHABAT *et al*, 1998; MECHOULAM *et al*, 1998). A formação de moléculas mensageiras lipídicas a partir de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa é reminiscente das famílias de moléculas bioativas dos prostanóides e eicosanóides. É possível que vários outros mediadores lipídicos sejam ainda descobertos com o advento do “lipidoma”.

Além da anandamida, como citado, os endocanabinóides mais estudados incluem o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), o éter de noladina, a virodamina e a *N*-araquidonoildopamina (MECHOULAN *et al.*, 1995; HANUS *et al.*, 2001; PORTER *et al*, 2002; HUANG *et al.*, 2002) (Figura 5). Os níveis de 2-AG no cérebro estão frequentemente maiores que os de anandamida em uma ou duas ordens de magnitude, embora a relevância fisiológica desta diferença de concentração seja desconhecida. Ainda é necessário se definir com precisão a relação neurotransmissor específico *versus* receptor canabinóide em termos de seletividade a uma determinada subclasse de receptor, localização das proteínas envolvidas na síntese e degradação da molécula transmissora, concentrações locais relevantes (próximas aos receptores) e *crosstalk* de sinalização com outros sistemas de neurotransmissores (FELDER *et al*, 2006).

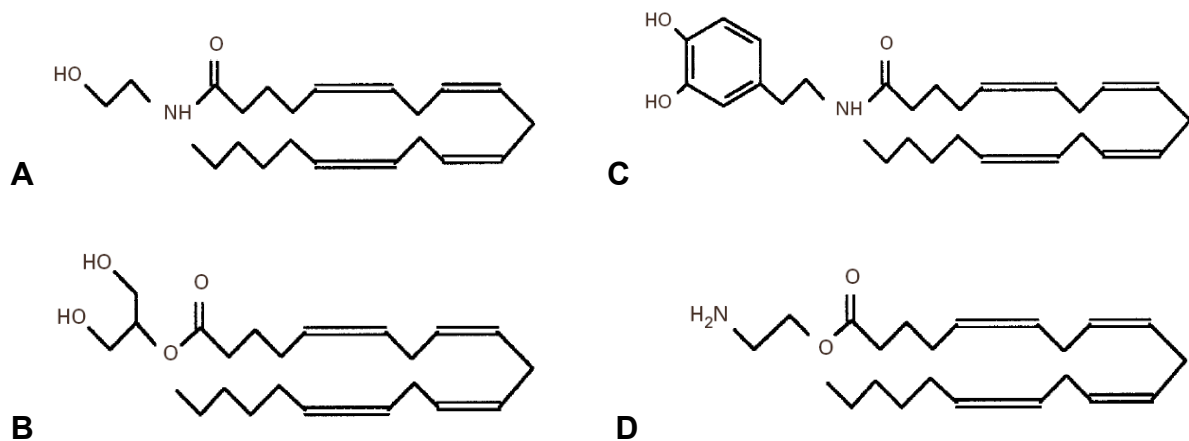


FIGURA 5: Estrutura de alguns dos endocanabinóides mais estudados. (A): anandamida; (B): 2-Araquidonoilglicerol (2-AG); (C): 2-Araquidonoildopamina; (D): Virodamina.

Ao contrário de outras moléculas neurotransmissoras, que são tipicamente armazenadas em vesículas até o momento de sua liberação, a anandamida é sintetizada por demanda, na membrana plasmática (Figura 6). Uma das vias predominantes para a síntese e liberação da anandamida começa com a transferência do ácido araquidônico da posição *sn*-1, dos fosfolípidos raros, para a posição *sn*-3 da fosfatidiletanolamina, criando-se a *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE). A reação é catalisada por uma N-acil transferase dependente de Ca^{3+} (NAT). Uma enzima específica dependente de Ca^{2+} hidrolisa a ligação fosfodiéster da NAPE, liberando a anandamida na sinapse, seja da membrana pré- ou pós-sináptica. Embora originalmente chamada NAPE-PLD, esta enzima é um membro da família das enzimas zinco metalohidrolases (OKAMOTO *et al*, 2004; WILSON & NICOLL, 2002; Di MARZO *et al*, 1999; PIOMELLI *et al*, 1998).

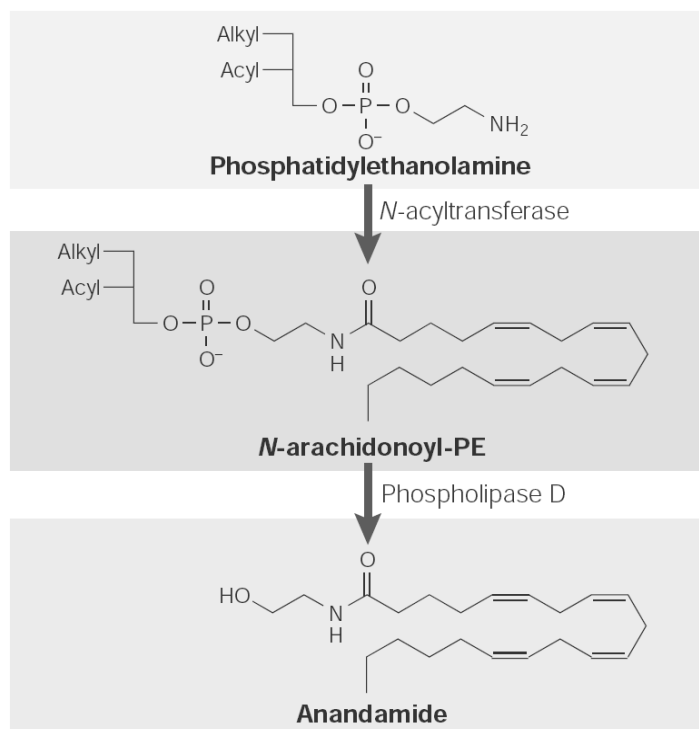


FIGURA 6: Mecanismo bioquímico de formação da anandamida em tecidos biológicos.

Observar a seqüência de reações, o substrato e a enzima responsável pela modificação subsequente. Tradução: Phosphatidylethanolamine: Fosfatidiletanolamina; *N*-acyltransferase: *N*-aciltransferase; *N*-arachidonoyl-PE: *N*-araquidonoil fosfatidiletanolamina; Phospholipase D: Fosfolipase D; Anadamide: Anandamida. (Adaptado de PIOMELLI, 2003).

Ésteres de ácidos graxos, como o 2-AG, são gerados pela remoção do grupamento inositol da cabeça da molécula através da Fosfolipase C (PLC) e subsequente desacetilação com a *sn*-1 diacilglicerol lipase. Uma segunda via utiliza as fosfolipases A1 e C para remover os constituintes em *sn*-1 e *sn*-3. Enquanto a Fosfolipase C já é conhecida há algum tempo, *sn*-1 diacilglicerol lípases importantes para a formação do 2-AG somente foram clonadas e caracterizadas recentemente (PIOMELLI, 2003). Mecanismos intracelulares de ação do 2-AG estão na figura 7.

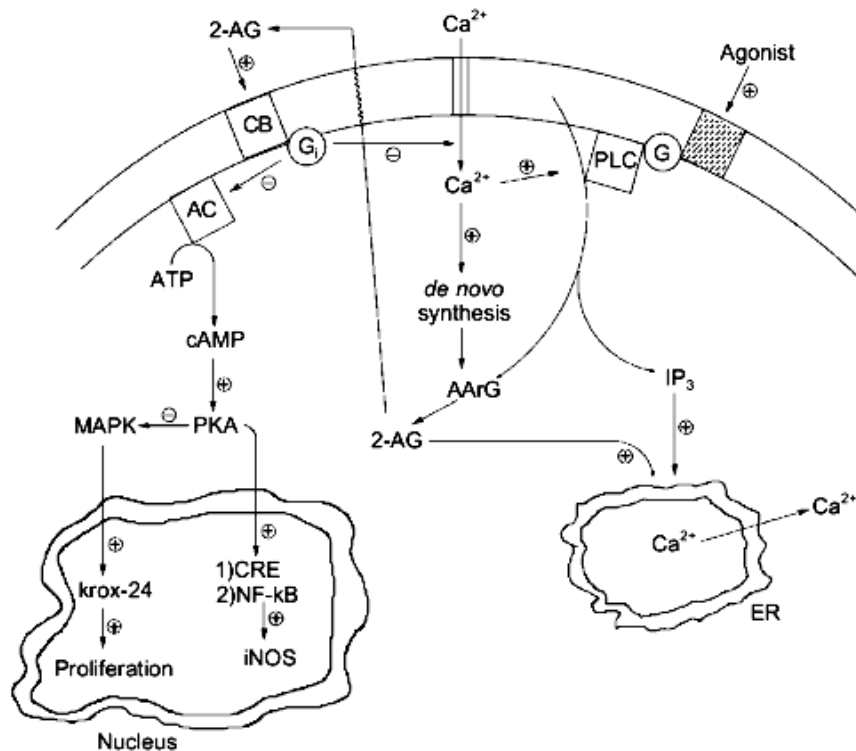


FIGURA 7: Mecanismos de ação intracelulares do endocanabinóide 2-AG (2-araquidonoilglicerol), mediados por receptor canabinóide.

Interação com IP_3 (trifosfato de inositol) e cAMP (AMP cíclico); Indução da liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (mediado principalmente por CB_1); Ativação de receptores CB_2 pode levar à inibição da formação de cAMP, fazendo com o que o 2-AG iniba ativação de MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), inibindo ativação de fatores ligados à proliferação celular, como krox-24; Inibição do cAMP também leva a inibição da ativação de PKA (proteína quinase A) e consequentemente ativação de CRE (elemento de ligação responsivo ao cAMP), NF- κ B (fator de ativação nuclear κ B) e iNOS (óxido nítrico sintase indutível). Abreviações: PLC: fosfolipase C; AArG: *sn*-1-acil-2-araquidonoil-glicerol; AC: adenilato ciclase. Adaptado de (DI MARZO, 1998).

1.3.4. Agonistas e antagonistas dos receptores canabinóides

Os canabinóides foram divididos em quatro grupos separados por estrutura química: os derivados de ácidos graxos (a maioria eicosanóides, como os endocanabinóides), canabinóides “clássicos” (dibenzopirenos tricíclicos), canabinóides “não-clássicos” (análogos bicíclicos e tricíclicos do Δ -9-THC) e os aminoalquilindóis. Os canabinóides “clássicos” são aqueles que podem ser extraídos de plantas ou então seus análogos sintéticos, que incluem o Δ -9-THC, Δ -8-THC e

HU-210 (dexabinol) ou ainda (-)-11-hidroxi- Δ -8-THC-dimetil-heptil (HILEY & FORD, 2004). Todos estes compostos são ativos tanto nos receptores CB₁ como CB₂, embora o Δ -9-THC seja agonista parcial em ambos os receptores, sendo antagonista em alguns receptores CB₂ (BAYEWITCH *et al*, 1996). Os chamados canabinóides “não clássicos” foram primeiramente sintetizados por químicos da farmacêutica Pfizer e caracterizados como sendo compostos bi- ou tricíclicos sem o anel di-hidropireno dos compostos “clássicos”. O mais utilizados destes compostos é o CP55,940, que possui alta afinidade tanto pelos receptores CB₁ como CB₂. (PACHECO *et al*, 1993). Os aminoalquilindóis, dos quais o WIN 55212,2 é o mais comumente utilizado, foram derivados da pravadolina, um inibidor da cicloxigenase com perfil farmacológico diferente dos agentes anti-inflamatórios não esteroidais clássicos (WARD *et al*, 1990). O WIN 55,212-2, o enantiômero R-(+), é ativo tanto em CB₁ como CB₂, embora mostre maior seletividade para o último (FELDER *et al*, 1995). A estrutura dos agonistas e antagonistas canabinóides mais comuns podem ser visualizadas na figura 8.

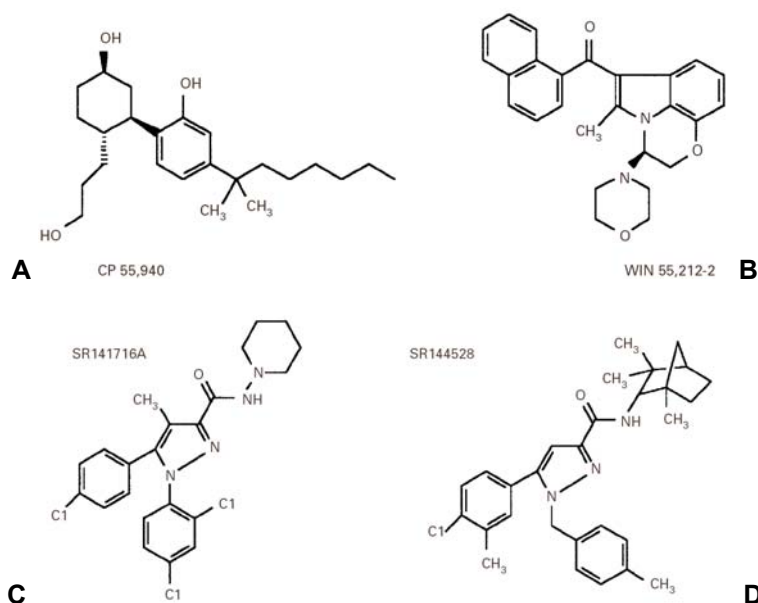


FIGURA 8: Agonistas e antagonistas canabinóides. (A) O agonista “não clássico” CP55,940; (B) O aminoalquilindóis WIN 55,212-2; Os antagonistas di-aryl-pirazóis SR141716A (C) e SR144528 (D).

Os dois antagonistas mais utilizados para se definir o subtipo de receptor envolvido em uma determinada resposta são o SR141716A (seletivo para o receptor CB₁; RINALDI-CARMONA *et al*, 1994) e o SR144528 (seletivo para o receptor CB₂; RINALDI-CARMONA *et al*, 1998). Ambos são di-aril-pirazóis, sintetizados primeiramente pela *Sanofi-Aventis*. Ambos podem atuar como agonistas inversos, exibindo efeitos biológicos opostos àqueles exercidos por agonistas na ausência de ativação do receptor canabinóide (BOUABOULA *et al*, 1997), sugerindo que os receptores possuem uma ativação tônica de mecanismos intracelulares na ausência de um agonista.

1.3.5. Sistemas de sinalização dos receptores canabinóides

Tanto o receptor CB₁ quanto o receptor CB₂ são receptores acoplados à proteína G (GPCR's), da superfamília da rodopsina. Suas respostas são sensíveis à toxina *pertussis*, o que sugere que suas ações sejam mediadas através da ativação de G_{i/o} (HOWLETT *et al*, 1986). Ensaios de marcação por fotoafinidade com o [³²P]azidoanilina GTP demonstraram que a estimulação do receptor canabinóide em membranas celulares leva à ativação de quatro subunidades G_α (G_{iα2}, G_{iα3}, G_{oα1} e G_{oα1}) (HO *et al*, 2000). Ambos são, portanto, capazes de inibir a adenilato ciclase ligada à membrana. Células de neuroblastoma N18TG2 possuem receptores CB₁ e a atividade da adenilato ciclase na membrana destas células pode ser inibida pelo endocanabinóide anandamida (CHILDERS *et al*, 1994). De forma semelhante, quando os receptores CB₂ estão expressos em células CHO, o 2-AG e o HU-210 irão inibir a estimulação da adenilato ciclase pela forskolina, embora a anandamida seja um agonista parcial fraco neste sistema e pode atuar como antagonista

(GONSIORREK *et al*, 2000). Facci *et al* (1995), documentaram que a anandamida é um antagonista funcional do receptor CB₂ em mastócitos, o que sugeriria que os endocanabinóides poderiam participar da modulação da resposta inflamatória através da regulação de receptores CB₂.

Após G_{i/o} ter sido inibida pela toxina *pertussis*, o acúmulo de AMPc pode ser estimulado pelos receptores CB₁ (GLASS & FELDER, 1997). Isso parece estar relacionado com o tipo de adenilato ciclase presente (RHEE *et al*, 1998). No caso do receptor CB₁, o efeito inibitório sobre a adenilato ciclase leva à inibição de canais de K⁺ do tipo D e aumenta a atividade de canais do tipo A. A ativação de receptores CB₁ também leva à inibição de canais de Ca²⁺ dos tipos P, Q e N, mas não do tipo L (HO *et al*, 2000). Entretanto, a anandamida e o WIN 55,212-2 inibem correntes de Ca²⁺ do tipo L em células musculares lisas de artérias cerebrais em gatos (GEBREMEDHIN *et al*, 1999). Este mecanismo é sensível tanto à toxina *pertussis* quanto ao SR141716A, e se correlaciona com o relaxamento de anéis de artérias cerebrais em gatos.

A sinalização através do receptor CB₂ parece não influenciar a atividade de canais iônicos, mas tanto este receptor como o CB₁ possuem efeitos mediados por MAP (*mitogen-activated protein*) quinases, podendo assim modular, por exemplo, a morte celular. A anandamida é capaz de tanto induzir como inibir a apoptose em células humanas de neuroblastoma e linfoma (MACCARRONE *et al*, 2000). A apoptose é induzida pela estimulação de receptores vanilóides, sendo inibida pela estimulação de receptores canabinóides sensíveis ao antagonista seletivo do receptor CB₁, SR141716A, e ao antagonista seletivo do receptor CB₂, SR144528. Uma das vias implicadas na inibição da apoptose é a ativação da PI3K (fosfoinositídeo 3'-quinase) e proteína quinase B (AKT) (AIKAWA *et al*, 2000), sendo

que a última medeia a inibição da apoptose de células cardíacas em um modelo de isquemia e reperfusão induzido por insulina (JONASSEN *et al*, 2001). Como os receptores CB₁ estão acoplados à PI3K e AKT, é possível que a inibição da apoptose seja mediada por esta via (Figura 8) (DEL PULGAR *et al*, 2000).

Um importante papel dos canabinóides na regulação da proliferação e migração celular foi identificado com a descoberta de que a ativação de receptores CB₁ expresso em uma linhagem de células endoteliais, derivadas de cordão umbilical humano, pode levar à ativação de MAP quinase, p38 quinase e c-Jun quinase (LIU *et al*, 2000). A via da ceramida parece ser a ligação entre os receptores canabinóides e a cascata de sinalização mediada por ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (GUZMÁN *et al*, 2001).

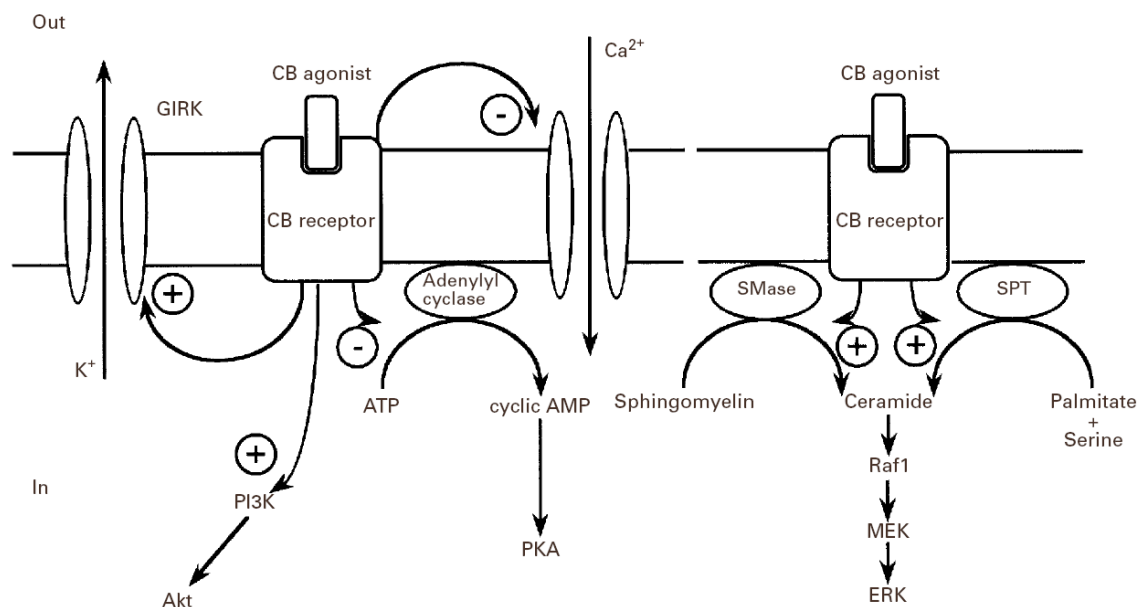


FIGURA 9: Sistema de sinalização dos receptores canabinóides.

Os receptores canabinóides são receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana. Observar os mecanismos representados à esquerda da figura, proteína-G-dependentes (ativação de canais de K⁺, PI3K/Akt; inibição da adenilato ciclase). À direita, a via da ceramida, ativada por mecanismos proteína-G-independentes (ceramida, Raf1, MEK, ERK). Abreviações: Akt: proteína quinase B; CB: canabinóide; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; GIRK: canais de K⁺ ativados por proteína G; MEK: proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PKA: proteína quinase A; SMase: esfingomielinase; SPT: serina palmitoiltransferase. (Adaptado de HILEY & FORD, 2004)

A geração de ceramida ocorre em um intervalo de tempo de minutos, dependendo da ação catalítica de esfingomielinases, as quais hidrolisam a esfingomielina a ceramida e fosforilcolina (KOLESNICK, 2002). O acoplamento funcional de receptores a esfingomielinases envolve diferentes proteínas adaptadoras. Um destes fatores é o “fator associado com a ativação neutra da esfingomielinase” ou FAN. O FAN se liga a um motivo ácido citoplasmático, com nove aminoácidos e 55 kD, no receptor do fator de necrose tumoral (TNF), acoplando o receptor, desta forma, à quebra da esfingomielina. Um papel para o FAN na hidrólise da esfingomielina mediada por CB₁ é sustentado por experimentos de co-imunoprecipitação, onde se evidencia a ligação do FAN a receptores CB₁ ativados; também se evidencia a resistência à quebra da esfingomielina mediada por canabinóides em células que não expressam FAN (SÁNCHEZ *et al*, 2001; VELASCO *et al*, 2005).

1.3.5.1. Modelos de agonismo inverso

Evidências de que os receptores canabinóides podem existir em estados intercambiáveis, “*on*” e “*off*”, são descritos em diversos experimentos com tecidos e/ou células expressando principalmente o receptor CB₁ (PERTWEE, 2005).

O agonismo inverso em receptores é explicado pelo modelo de “dois estados” (LEFF, 1995). Pelo menos alguns tipos de receptores podem existir em duas conformações intercambiáveis: um estado constitutivamente ativo ou “*on*” (R^{*}), nos quais os receptores estão acoplados aos seus mecanismos efetores, mesmo na ausência de um agonista endógeno ou exógeno, e um estado constitutivamente

inativo ou “off”, que não está espontaneamente acoplado aos mecanismos efetores do receptor. Baseado neste modelo, os agonistas aumentam a proporção de receptores no estado “on”, agonistas inversos aumentam a proporção de receptores no estado “off” e antagonistas neutros deixam inalterado o número de receptores em cada estado. Para receptores acoplados à proteína G, como os receptores canabinóides, o estado “on” pode ser representado como o receptor acoplado a uma forma ativa da proteína G (R^*G_{GTP}) e o estado “off” como o receptor acoplado a uma forma inativa da proteína G (RG_{GDP}) ou não acoplado de forma alguma a proteína G (R). Isto gera a possibilidade de duas variantes do modelo de “dois estados”, $R^*G_{GTP} \Leftrightarrow RG_{GDP}$ e $R^*G_{GTP} \Leftrightarrow R$ (VÁSQUEZ & LEWIS, 1999).

Existe boa evidência de que antagonistas canabinóides no receptor CB_1 , como o SR141716A e o AM251, podem induzir efeitos “canabimiméticos” inversos, em sistemas biológicos expressando o receptor CB_1 de forma natural ou após transfecção. Três mecanismos foram propostos para explicar tal efeito (PERTWEE, 2005):

- Antagonismo competitivo nos receptores CB_1 , impedindo a ligação de canabinóides endógenos.
- Agonismo inverso resultante de uma modulação negativa da atividade constitutiva dos receptores CB_1 , possivelmente através de um mecanismo alostérico, que faz com que os receptores CB_1 passem de um estado constitutivamente ativo “on” para um ou mais estados constitutivamente inativos “off”.
- Mecanismos CB_1 -independentes como, por exemplo, o antagonismo exercido pelo SR141716A e pelo AM251 sobre os receptores A1 de adenosina.

1.3.6. Os canabinóides na inflamação e na angiogênese

Diversas linhas de pesquisa buscam entender até que ponto os ligantes dos receptores canabinóides podem ser agentes efetivos no tratamento, por exemplo, da dor, da inflamação, de doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla e da êmese associada à AIDS e à quimioterapia do câncer. Agonistas dos receptores canabinóides foram desenvolvidos por indústrias farmacêuticas para atuarem como anti-inflamatórios não-esteroidais e analgésicos não-opioides, entretanto a sua utilidade terapêutica tem sido criticada por seus efeitos colaterais, como a sedação e a disfunção cognitiva. Até o presente momento, drogas com alta eficácia e potência, atuando tanto como agonistas como antagonistas sobre os receptores canabinóides, mas sem causar nenhum tipo de efeito psicoativo, estão em fase de desenvolvimento (ZURIER, 2003; HOWLETT *et al.*, 2002, 2004; FOX & BEVAN, 2005; KLEIN, 2005; PIOMELLI, 2005).

Quanto ao seu potencial anti-inflamatório e também anti-angiogênico / anti-tumoral, diversos trabalhos bastante recentes mostraram que análogos sintéticos potentes do Δ -9-THC, de diferentes grupos químicos ou mesmo similares, e também antagonistas específicos dos receptores canabinóides, podem modular respostas fisiológicas desempenhadas por estes em diversas condições patológicas associadas à inflamação e ao câncer (ZURIER, 2003; VELASCO *et al.*, 2004, KLEIN, 2005; PIOMELLI, 2005).

Agonistas sintéticos como o WIN 55, 212-2 (potente agonista misto em CB₁ e CB₂) e o HU-210 (potente agonista em CB₁), assim como os antagonistas SR141716A (Acomplia[®] ou Rimonabant[®]) e o SR144528, antagonistas em CB₁ e CB₂ respectivamente, podem modular negativamente a resposta inflamatória em

modelos de endotoxemia em camundongos e também em modelos de peritonite; em ambos os modelos as drogas interferem na liberação e expressão de citocinas e outras moléculas inflamatórias, assim como diretamente sobre o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (SMITH *et al.*, 2000; 2001). A participação do receptor CB₂ e sua ativação no miocárdio de camundongos já foi descrita como um mecanismo atenuante na lesão induzida por isquemia e reperfusão, fator associado à redução significativa da produção de citocinas e quimiocinas, assim como na redução do recrutamento de leucócitos (DI FILLIPO *et al.*, 2003). De forma interessante, já foi observado um efeito protetor sobre o miocárdio induzido pelo lipopolissacarídeo da parede bacteriana (LPS), onde foi sugerida a participação de endocanabinóides através do receptor CB₂, proteção esta que pode estar relacionada a um *cross-talk* com o óxido nítrico (NO^{*}) (LEGNEUX & LAMONTAGNE, 2001). Também em modelos de isquemia cerebral os receptores canabinóides, assim como os endocanabinóides, parecem modular, de forma significativa, a resposta inflamatória associada (MUTHIAN *et al.*, 2004). Estudo recente, e bastante interessante, demonstra uma redução na formação da placa aterosclerótica em camundongos, diminuição esta relacionada à administração de baixas doses de canabinóides exógenos (Δ -9-THC), efeito este mediado por uma diminuição bastante significativa da resposta inflamatória associada, incluindo a redução da produção de quimiocinas como o MCP-1 (JE/CCL2), e citocinas como o IFN- γ e IL-12, com participação predominante de receptores CB₂ (STEFFENS *et al.*, 2005)

Há também trabalhos consistentes demonstrando potente efeito de canabinóides sobre a dor inflamatória, sugerindo tanto a participação de receptores CB₁ como CB₂ (CLAYTON *et al.*, 2002; IBRAHIM, *et al.*, 2005; PIOMELLI, 2005). O sistema endocanabinóide parece participar ativamente, e de forma protetora, em

modelos de inflamação do cólon, efeito este mediado principalmente por receptores CB₁ (MASSA *et al.*, 2004). Em outros modelos de inflamação intestinal, os receptores CB₁ parecem exercer papel importante, cuja atividade anti-inflamatória parece estar relacionada à diminuição da produção da citocina TNF- α (CROCI *et al.*, 2003).

Estudos recentes demonstram que o endocanabinóide 2-AG pode induzir a migração de vários tipos celulares, como, por exemplo, eosinófilos humanos, células B Raji e células dendríticas de camundongos derivadas da medula. Acredita-se que os endocanabinóides estão envolvidos na migração celular por funcionarem como agentes quimiotáticos, juntamente com citocinas e outras proteínas classicamente descritas como “quimiocinas” (MAESTRONI, 2004; RAYMAN *et al.*, 2004; OKA *et al.*, 2004). Adicionalmente à indução da expressão de endocanabinóides e a subsequente quimiotaxia de células do sistema imune, existem evidências de que a ativação de células inflamatórias pelo LPS ou outros estímulos pode modular a expressão dos receptores canabinóides CB₁ E CB₂ nestas células (KLEIN, 2005).

Assim como podem suprimir a produção de citocinas, os canabinóides demonstraram também poder aumentar a produção de citocinas (incluindo TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10) quando administrados juntamente com bactérias ou outros antígenos, ou também, em alguns casos, quando são administrados sozinhos (DEROCQ *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2001). Portanto, *in vivo*, estes agentes podem tanto suprimir quanto aumentar a produção destas moléculas pró-inflamatórias, dependendo tanto da natureza do estímulo inflamatório como do tipo de canabinóide usado.

No que diz respeito à atividade anti-tumoral, e também anti-angiogênica dos canabinóides, vários estudos demonstram um efeito bastante significativo sobre a

proliferação de diferentes linhagens de células tumorais e também sobre a produção de substâncias responsáveis pela manutenção do tumor, efeito este mediado, por exemplo, por fatores de crescimento (HART *et al.*, 2004, RUBOVITCH *et al.*, 2004; VELASCO *et al.*, 2004). Os canabinóides parecem ter papel tanto anti-tumoral quanto pró-tumoral, efeito este que parece depender da expressão diferencial dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ nestas células (DE PETROCELLIS *et al.*, 2000; VELASCO *et al.*, 2004).

Análises funcionais e imunohistoquímicas, em modelos murinos de gliomas e de carcinoma de pele, demonstraram que a administração de canabinóides modifica a hiperplasia vascular, característica de tumores em crescimento, para um padrão de vasos sanguíneos caracterizados por capilares pequenos, impermeáveis e diferenciados. Isto é associado com uma redução na expressão de VEGF e outras citocinas pró-angiogênicas (VELASCO *et al.*, 2004). De forma interessante, a inibição farmacológica da síntese de ceramida *de novo* abole o efeito anti-tumoral dos canabinóides *in vivo*, assim como a inibição da produção de VEGF por células de gliomas. É também demonstrado que a ativação de receptores canabinóides em células endoteliais vasculares inibe sua migração e sobrevivência, o que contribui para a redução da neovascularização em processos de crescimento tumoral, por exemplo (BLÁZQUEZ *et al.*, 2003).

Estudos bastante recentes demonstram que os canabinóides parecem influenciar de maneira significativa a angiogênese tumoral em gliomas e astrocitomas. Agonistas CB₂ foram capazes de diminuir a migração de células endoteliais para o tumor e também induziram a apoptose destas células. De forma ainda mais interessante, agonistas CB₂ interferiram na produção e expressão de fatores pró-angiogênicos como o VEGF e a Angiopietina 2 (Ang2) (BLÁZQUEZ *et*

al., 2003; 2004). Um potente análogo do endocanabinóide anandamida foi capaz de inibir a expressão de VEGF, e também de um de seus receptores funcionais, através da ativação do receptor CB₁ em uma linhagem celular de carcinoma pulmonar, efeitos estes atenuados com a utilização de um antagonista CB₁ específico. Esta inibição foi associada à diminuição do crescimento do tumor e metástase, demonstrando o importante papel da ativação do sistema canabinóide na redução da progressão de tumores (PORTELLA *et al.*, 2003). Efeitos semelhantes foram observados em tumores de pele (não-melanomas), com diminuição da vascularização do tumor e diminuição da expressão de fatores pró-angiogênicos (Figura 9) (CASANOVA *et al.*, 2003).

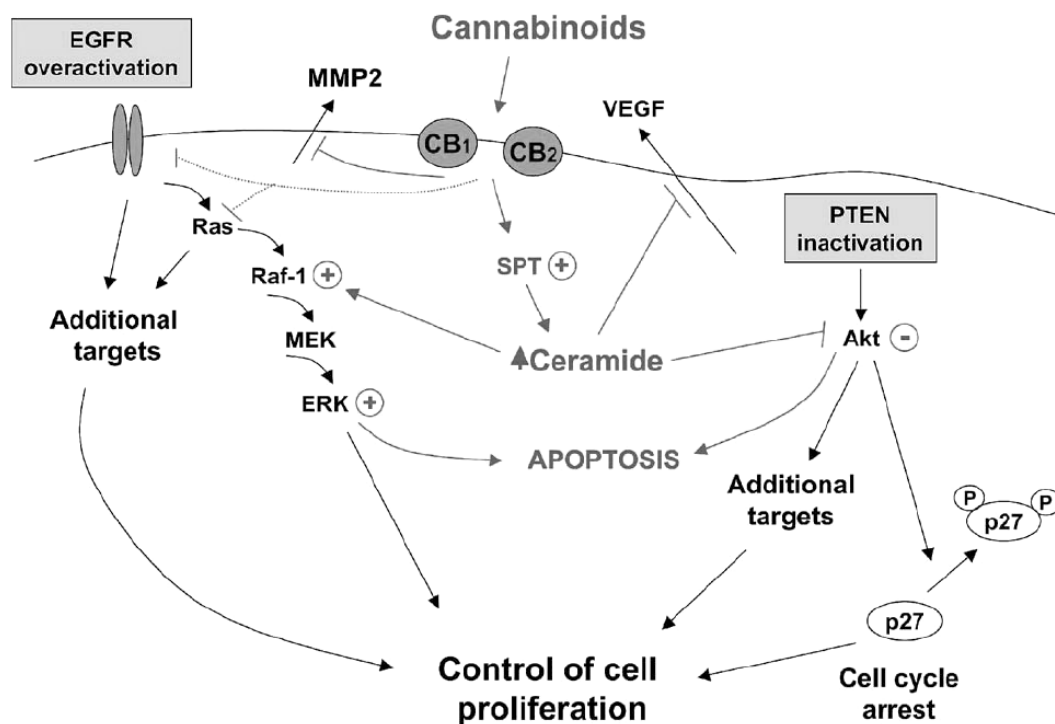


FIGURA 10: Mecanismo intracelular após ativação de receptor canabinóide em célula endotelial ou tumoral, por exemplo.

O tratamento com canabinóides pode induzir a atividade da SPT (serino palmitoiltransferase) e promovendo o acúmulo de ceramida e a inibição de Akt (proteína quinase B), o que diminuiria a fosforilação de Akt e outras moléculas *downstream*. A ceramida induz a estimulação mantida de Raf-1 / MEK / ERK, vias envolvidas na apoptose mediada por canabinóides. A ceramida também pode atenuar a produção de VEGF. (Adaptado de VELASCO *et al.*, 2004)

Já foi demonstrado também um importante papel do agonista misto WIN 55,212-2 sobre a diminuição da expressão de VEGF e outros fatores pró-angiogênicos, e também sobre a indução da apoptose, em células de adenocarcinoma de tecido prostático humano (SARFARAZ *et al.*, 2005).

Entretanto, é de importância observar que nenhum estudo estabelece um papel claro para os receptores canabinóides, e também para os endocanabinóides, no sítio inflamatório em reparo, mais precisamente seus papéis na regulação global da angiogênese e sua influência sobre moléculas envolvidas neste processo. A forma pela qual a ativação ou bloqueio destes receptores poderia influenciar a angiogênese inflamatória, sendo modulando o recrutamento de células para o sítio inflamatório, modificando a ativação de células residentes, interferindo diretamente no processo local de neovascularização ou também interferindo na produção de mediadores envolvidos nesta sobreposição de processos, é, de sobremaneira, pouco explorada.

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

**JUSTIFICATIVA
& OBJETIVOS**

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Apesar dos diversos estudos sugerindo a participação do sistema canabinóide, com seus ligantes endógenos e receptores, na inflamação e nos processos angiogênicos relacionados tanto ao processo inflamatório como ao câncer, diversas lacunas ainda devem ser preenchidas principalmente no que diz respeito aos tipos de receptor canabinóide predominantemente envolvido nestes processos, assim como sua influência na expressão e liberação de moléculas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas pelas diversas células envolvidas nestas manifestações fisiopatológicas. Estabelecer a estrutura básica na qual o sistema canabinóide modula a angiogênese relacionada à inflamação se torna um objetivo necessário para o progresso dos estudos farmacológicos sobre esta classe de mediadores com evidente potencial terapêutico.

Nosso objetivo, desta forma, é investigar o papel dos receptores canabinóides, mais precisamente sua ativação ou bloqueio, em um modelo murino de angiogênese inflamatória avaliada após implante subcutâneo de uma matriz esponjosa, explorando como a administração exógena de antagonistas e agonistas dos receptores canabinóides podem influenciar na angiogênese e no recrutamento celular para o sítio inflamatório, avaliando concomitantemente a influência destes fármacos na produção de mediadores pró-inflamatórios, e também pró-angiogênicos, por estas células.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito do tratamento sistêmico com antagonistas (SR141716A, antagonista CB₁, e SR144528, antagonista CB₂) e agonista dos receptores canabinóides (WIN 55,212-2, agonista misto CB₁/CB₂), e do tratamento local com agonista destes receptores, 7 e 14 dias após implante subcutâneo de uma matriz esponjosa, sobre a vascularização e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para a matriz onde se evidencia um processo inflamatório.
2. Investigar o efeito do tratamento sistêmico de antagonistas e agonistas dos receptores canabinóides, e do tratamento local com agonistas destes receptores, sobre a produção de mediadores inflamatórios e pró-angiogênicos pelas células endoteliais e inflamatórias recrutadas para a matriz após 7 e 14 dias, mais precisamente a citocina TNF- α , as quimiocinas CCL5/RANTES, CXCL1-3 / KC e CCL2 / JE, além do fator de crescimento VEGF, moléculas notadamente importantes neste modelo experimental (BARCELOS *et al*, 2004, 2005, dados não publicados; BELO *et al*, 2004).
3. Obter e analisar cortes histológicos da matriz esponjosa, para visualização do infiltrado celular e vascularização, após os respectivos tratamentos supracitados, 7 e 14 dias após o implante.

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

**MATERIAL
& MÉTODOS**

3. MATERIAL E MÉTODOS

Em nosso delineamento experimental, os animais receberam tratamento sistêmico (por via subcutânea), 200 µL/animal e/ou local (intra-implante), 50 µL/local, de fármacos durante 7 e 14 dias. A via de escolha para o tratamento se deveu a experimentos pilotos previamente realizados e a dados da literatura, além, inclusive, da disponibilidade dos fármacos em questão (ver tabela no item 3.8):

- **Grupo controle:** PBS (tampão fosfato de sódio pH 7.4) + Cremophor (Sigma-Aldrich) + DMSO (dimetilsulfóxido, Veco) – **Veículo (local e sistêmico), 7 e 14 dias.**
- **Grupos 1 e 2:** SR141716A (antagonista CB1, cedido pela *Sanofi-Aventis*, França) - **tratamento sistêmico, 7 e 14 dias.**
- **Grupo 3 e 4:** SR144528 (antagonista CB2, cedido pela *Sanofi-Aventis*, França) - **tratamento sistêmico, 7 e 14 dias.**
- **Grupo 5 e 6:** WIN 55,212-2 (agonista misto CB1/CB2, Sigma-Aldrich) – **tratamento sistêmico, 7 e 14 dias**
- **Grupo 7 e 8:** WIN 55,212-2 (agonista misto CB1/CB2, Sigma-Aldrich) – **tratamento local, 7 e 14 dias**

Os tempos escolhidos para avaliação dos parâmetros bioquímicos e histológico de interesse para o estudo da angiogênese inflamatória tiveram como base trabalhos anteriores do grupo que demonstram importantes fenômenos de recrutamento celular e formação de tecido fibrovascular entre os dias 7 e 14 após implante subcutâneo de esponja em camundongos C57BL/6 (BARCELOS *et al*, 2005).

A proporção de PBS (tampão fosfato de sódio pH 7.4) / Cremophor / DMSO (dimetilsulfóxido, VECO) no veículo é de 18:1:1, proporção esta que, de acordo com a literatura, não apresenta efeitos biológico apreciáveis. O mesmo veículo foi utilizado para todos os fármacos em estudo.

Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/COEP – UFMG), Protocolo nº 147/06.

3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com aproximadamente 10 semanas, pesando entre 20-25 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO, UFMG). Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia, ICB / UFMG, com livre acesso a ração e água, e sob ciclo claro/escuro, até o momento dos experimentos. O número de animais estipulado para cada grupo experimental foi de 6-8 animais.

3.2 - Implantação da matriz esponjosa

Discos de esponja de poliéster poliuretano (Vitafoam Ltda.) de 8 mm de diâmetro por 5 mm de espessura, canulados centralmente com cânulas de polivinil (PE 20 - Bio Vida) de 12 mm de comprimento, foram devidamente confeccionados e mantidos em álcool a 70% durante, pelo menos, 24 horas antes da implantação. Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com quetamina (Rompum[®])/xilazina (Calmium[®]) (respectivamente 3,2 mg/animal e 0,16 mg/animal, em solução salina a 0.9%, numa proporção de 4:1:5 (quetamina:xilazina:salina), 25-

30 μ L/animal, e submetidos a tricotomia e assepsia da região dorsal com álcool iodado. Em seguida, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm na pele de tal região e, após delicada apartação do tecido subcutâneo, foi introduzido o disco de esponja, previamente lavado em água destilada e submetido a fervura durante 15 minutos. A cânula foi exteriorizada através de um orifício na pele da região cervical, suturada junto à pele e sua extremidade superior ocluída com massa de modelagem. Finalmente, a incisão dorsal foi suturada. Após a cirurgia os animais foram mantidos sob aquecimento artificial até completo restabelecimento de suas funções vitais, sendo mais tarde distribuídos em gaiolas individuais e mantidos no Laboratório de Angiogênese, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB/UFMG, com livre acesso a ração e água.

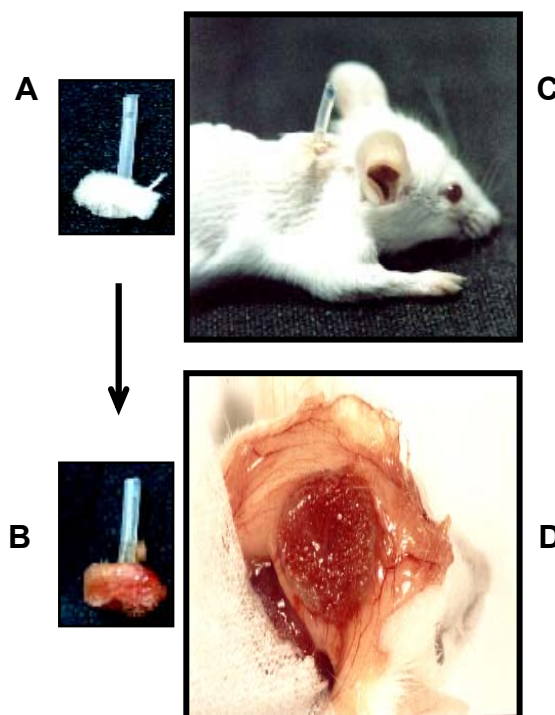


FIGURA 11: Matriz esponjosa. Aspecto da esponja antes da implantação (A) e após 14 dias de implantação (B).

Visualização do implante de esponja na região cervical de um camundongo Balb/C (C) e aspecto do implante aderido ao tecido subcutâneo, já coberto por tecido conjuntivo (14 dias após implantação).

3.3 – Quantificação da angiogênese pela dosagem de hemoglobina

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os implantes cuidadosamente removidos. A cânula foi separada e em seguida os implantes foram pesados. Cada implante foi homogeneizado em reagente de *Drabkin* (Labtest, São Paulo) e centrifugado a 10.000 g por 15 min (DRABKIN & AUSTIN, 1932). Os sobrenadantes foram filtrados em filtros de 0,22 μm (Millipore). A hemoglobina presente nas amostras foi quantificada colorimetricamente a 540 nm em um espectrofotômetro (E max – Molecular Devices). A concentração de hemoglobina foi calculada a partir de uma curva padrão. Os resultados foram expressos em μg de hemoglobina / ml / mg de tecido úmido (peso da esponja).

3.4 - Quantificação da infiltração de neutrófilos no tecido pelo método de atividade da mieloperoxidase (MPO)

Os *pellets* obtidos após a centrifugação dos homogenatos das matrizes esponjosas (ver o método para dosagem de hemoglobina) foram cuidadosamente divididos em duas porções iguais e ressuspensos em dois diferentes tampões, específicos para a medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e *N*-acetilglicosaminidase (NAG) (BAILEY, 1988; McMILLAN, 1981). Uma das porções de cada amostra foi ressuspensa em 1 ml de tampão fosfato (pH 4.7), a 4°C, sendo então homogeneizada em *vortex* e centrifugada por 15 min. a 10.000 g (4°C). Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em 1 ml de tampão fosfato (pH 5.4), contendo 0,5% de hexa-1,6-bis-deciltrimetilamônio (HTAB, Sigma-Aldrich). As suspensões foram congeladas e descongeladas por três vezes em nitrogênio líquido

(N₂) e em seguida centrifugadas por 15 min. a 10.000 g. Os sobrenadantes foram estocados a - 20°C até o momento do ensaio.

Para o ensaio foram utilizados 25 µL de 3,3'-5,5'- tetrametilbenzidina (TMB, Sigma-Aldrich), dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Veco) a uma concentração final de 1,6 mM; 100 µL de H₂O₂ dissolvida em tampão fosfato (pH 5.4), contendo HTAB, a uma concentração final de 0,003% e 25 µL das suspensões estocadas. A reação foi iniciada a 37°C por 5 min. em placas de 96 poços após a adição das suspensões e da solução de TMB. Após este período, a solução de H₂O₂ foi adicionada e a placa novamente incubada a 37°C por 5 min. A reação foi parada pela adição de 100 µL de H₂SO₄ a 4M e quantificada em espectrofotômetro a 450 nm. O conteúdo de neutrófilos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de MPO expressa em aumento de absorbância a partir de neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos mediante injeção de uma solução de caseína a 5%. O lavado peritoneal foi realizado após um tempo máximo de 6 horas pós-injeção. Os resultados foram expressos em número relativo de neutrófilos por miligrama (mg) de tecido úmido (peso da esponja). A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de neutrófilos”.

3.5 - Quantificação da infiltração de macrófagos no tecido pelo método de atividade da n-acetilglicosaminidase (NAG)

A outra porção de matriz esponjosa, de cada amostra, cuidadosamente dividida (ver ensaio para detecção da atividade de MPO), foi ressuspensa em solução salina 0,9% (4°C) contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Merck). Logo em seguida foi homogeneizada em *vortex* e centrifugada a 4°C por 10 min. a 1.500 g.

Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG.

A reação foi iniciada após a adição de 100 μ L de *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glicosaminidase (Sigma-Aldrich), dissolvida em tampão citrato/fosfato (pH 4.5), a uma concentração final de 2,24 mM, a 100 μ L do sobrenadante recolhido após centrifugação das matrizes esponjosas. A reação se processou a 37°C por 10 min, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 μ L de tampão glicina 0.2 M (pH 10,6) e quantificada em espectrofotômetro a 405 nm. O conteúdo de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, mediante injeção de uma solução de tioglicolato de sódio a 3%. O lavado peritoneal foi realizado após um tempo máximo de 4 dias pós-injeção. Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por miligrama (mg) de tecido úmido (peso da esponja). A unidade obtida por este procedimento é expressa como “número relativo de macrófagos”.

3.6 - Ensaio de ELISA para detecção de citocinas e quimiocinas

Os sobrenadantes obtidos após a centrifugação dos homogenatos das matrizes esponjosas (ver o método para dosagem de hemoglobina) foram utilizados para detectar os níveis das citocinas e quimiocinas propostas pelo projeto, respectivamente TNF- α , VEGF, CXCL1-3/KC, CCL2/JE e CCL5/RANTES. Os ensaios foram realizados utilizando-se *kits* murinos específicos (R&D systems) e seguindo as orientações do fabricante.

Basicamente, 100 μL /poço do anticorpo de captura (5,5 $\mu\text{L}/\text{ml}$), diluídos em PBS estéril (pH 7.4), foram adicionados a cada placa (NUNC FLAT, 96-poços, FALCON). Estas foram então vedadas e incubadas a 4°C *overnight*. O conteúdo de cada placa foi então retirado e esta foi lavada 3 vezes (300 μL /poço) com um tampão de lavagem (PBS/TWEEN 20 a 0,05%). Após este procedimento, foram adicionados 300 μL /poço do tampão de bloqueio (BSA - *bovine serum albumine* - 1% em PBS). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se 100 μL /poço das amostras de sobrenadante e padrões diluídos em tampão de diluição (BSA 0,1% em PBS). As placas foram novamente incubadas *overnight*. Repetiu-se o procedimento de lavagem e adicionou-se 100 μL /poço do anticorpo de detecção biotilado (5,55 $\mu\text{L}/\text{ml}$) diluído em tampão de diluição (o mesmo das amostras e padrões). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas. Após outro procedimento de lavagem, adicionou-se 100 μL /poço de estreptavidina – HRP (1:200), em tampão de diluição, e incubou-se as placas a temperatura ambiente por 20 minutos. Novamente as placas foram lavadas e adicionou-se 100 μL /poço do substrato OPD (em tampão citrato pH 5,0 com H_2O_2). As placas foram incubadas por 20-30 minutos, em temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, adicionou-se 50 μL /poço de H_2SO_4 1M para interromper a reação. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 492 nm. A concentração de citocinas e quimiocinas foi obtida partir de curvas padrões. O resultado foi expresso em pg/ml de citocinas ou quimiocinas por peso úmido de tecido em mg (peso da esponja).

3.7 - Análise histológica das matrizes esponjosas

Após 7 e 14 dias de implante, esponjas representativas de cada grupo experimental (2 a 3 esponjas por grupo) foram cuidadosamente fixadas em solução de formol a 10% em PBS (pH 7.4). Após o tempo de fixação mínimo de 48 horas, os implantes foram submetidos a etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina. Em seguida, foram realizados cortes em micrótomo (seccções de 5 μ m) e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E), para avaliação do infiltrado inflamatório, formação de conjuntivo e vascularização. Os cortes foram analisados ao microscópio óptico e registrados fotograficamente (objetiva de 20X, ocular de 10 X, aumento de 200 vezes). Cada corte teve o registro fotográfico de pelo menos 10 campos, sendo apenas uma imagem representativa do corte selecionada para fins de comparação entre grupos submetidos a tratamento farmacológico. Toda a preparação do material histológico foi realizada no Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB/UFMG).

3.8 - Análise estatística

Os resultados estão representados como a média \pm erro padrão da média. Comparações entre dois grupos foram feitas utilizando-se o teste *t* de Student, para dados não pareados. Para três ou mais grupos, as comparações foram feitas utilizando-se análise de variância (*One-way ANOVA*), e as diferenças entre os grupos foram certificadas utilizando-se o pós-teste *Newman-Keuls*. Um valor de *p* inferior a 0,05 foi considerado significativo. A análise estatística e elaboração dos

gráficos aqui representados foram realizadas utilizando-se o software *GraphPad Prism 3.0*.

3.9 – Delineamento experimental

Espécie	Grupo	Animais / grupo	Procedimento
<i>Mus musculus</i> (C57BL/6)	CONTROLE	8	Veículo, 7 dias, experimento ANTAGONISTAS
	CONTROLE	8	Veículo, 7 dias, experimento AGONISTA LOCAL
	CONTROLE	8	Veículo, 7 dias, experimento AGONISTA SISTÊMICO
	CONTROLE	8	Veículo, 14 dias, experimento ANTAGONISTAS
	CONTROLE	8	Veículo, 14 dias, experimento AGONISTA LOCAL
	CONTROLE	8	Veículo, 14 dias, experimento AGONISTA SISTÊMICO
	1	8	SR141716A, 7 dias (ANTAGONISTA CB ₁) 10 mg/Kg
	2	8	SR141716A, 14 dias (ANTAGONISTA CB ₁) 10 mg/Kg
	3	8	SR144528, 7 dias (ANTAGONISTA CB ₂) 10 mg/Kg
	4	8	SR144528, 14 dias (ANTAGONISTA CB ₂) 10 mg/Kg
	5	8	WIN 55,212-2, 7 dias (AGONISTA) SISTÊMICO 3, 10 mg/Kg
	6	8	WIN 55,212-2, 14 dias (AGONISTA) SISTÊMICO 3 mg/Kg
	7	8	WIN 55,212-2, 7 dias (AGONISTA) LOCAL 30, 100 µg/local
	8	8	WIN 55,212-2, 14 dias (AGONISTA) LOCAL 30 µg/local

FIGURA 12: Tabela esquemática para o delineamento experimental proposto. Modelo também anexado ao protocolo n^o 147/06 (CETEA/COEP – UFMG).

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do tratamento sistêmico com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂, SR141716A e SR 144528, respectivamente.

4.1.1. Efeitos sobre a concentração de hemoglobina na matriz esponjosa

O tratamento sistêmico diário (10 mg/Kg, 200 µL/animal/s.c.) com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂, SR141716A e SR144528, durante 7 e 14 dias, foi capaz de inibir de maneira significativa, a concentração de hemoglobina nos implantes avaliados. A dosagem do conteúdo de hemoglobina pelo método de *Drabkin* é utilizada como medida indireta da formação de vasos sanguíneos.

Para o antagonista CB₁, a concentração de hemoglobina estava significativamente reduzida no sétimo dia pós-implante ($P < 0.05$), sendo o perfil da resposta mantido no décimo quarto dia pós-implante ($P < 0.01$), mostrando-se um efeito anti-angiogênico considerável após bloqueio deste subtipo de receptor canabinóide. Resultado similar foi observado para o tratamento com o antagonista dos receptores CB₂, SR144528, sendo que tanto no sétimo dia ($P < 0.01$), como no décimo quarto dia ($P < 0.05$) houve diminuição significativa da resposta angiogênica nos implantes. Os resultados podem ser verificados na figura 13. Desta forma, o bloqueio de ambos os subtipos de receptores canabinóides neste modelo experimental é capaz de reduzir a angiogênese, assim quantificada pela concentração de hemoglobina na esponja. Não houve diferença entre os tratamentos com os dois antagonistas nos dois dias escolhidos para avaliação da resposta.

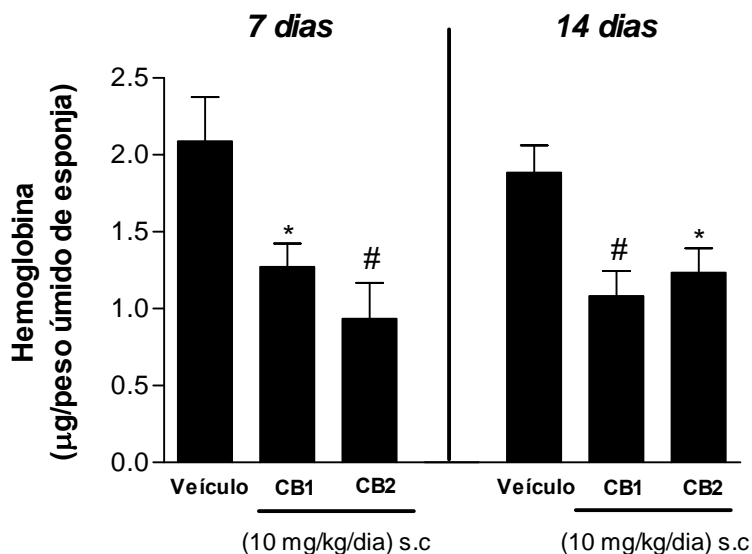


FIGURA 13: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a formação de novos vasos, quantificada através da dosagem de hemoglobina na esponja (método de *Drabkin*).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05; # p<0.01 em relação ao veículo.

4.1.2. Efeitos sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa.

A medida da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e *N*-acetilglicosaminidase (NAG) dos implantes foi utilizada como indicativo da presença de neutrófilos e de macrófagos, respectivamente, na matriz esponjosa. Há um progressivo aumento do infiltrado inflamatório ao longo das duas semanas de experimento. O pico de infiltrado neutrofílico, verificado pela atividade da mieloperoxidase, é máximo no sétimo dia, mantendo-se estável até o décimo quarto dia. O pico de atividade máxima da *N*-acetilglicosaminidase aparece após o sétimo dia, mantendo-se elevado até o décimo quarto dia (BARCELOS *et al*, 2005).

O tratamento sistêmico diário (10 mg/Kg, 200 μ L/animal/s.c.) com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂, SR141716A e SR144528, durante 7 e 14 dias, foi capaz de inibir de maneira significativa, com padrão diferenciado, o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para a matriz esponjosa, como avaliado pelos ensaios bioquímicos supracitados. Os resultados sugerem que o bloqueio dos receptores canabinóides é capaz de modular o recrutamento celular para a matriz esponjosa após implante subcutâneo.

O tratamento com o antagonista CB₁, SR141716A, foi eficaz em inibir o recrutamento de neutrófilos no sétimo dia ($p < 0.05$), sendo que o tratamento parece manter este perfil de inibição, que é semelhante no décimo quarto dia após implante ($p < 0.05$). Quanto ao antagonista CB₂, SR144528, o perfil de inibição é notadamente diferente. O tratamento com o antagonista CB₂, SR144528, leva à inibição significativa do recrutamento de neutrófilos no sétimo dia após implante ($p < 0.05$), perfil de resposta que não é observada no décimo quarto dia após implante, ao contrário do tratamento com o antagonista dos receptores CB₁. Os resultados estão ilustrados na figura 14.

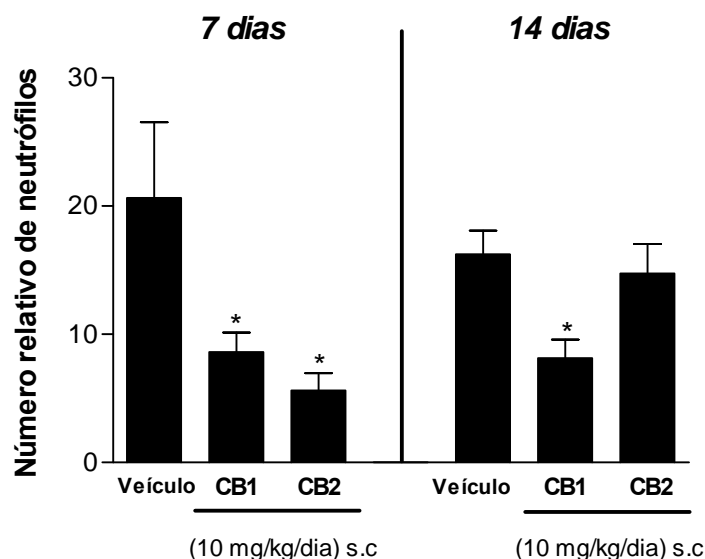


FIGURA 14: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de neutrófilos, quantificado através da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

Foi também observado, no tratamento sistêmico diário com o antagonista do receptor CB₁, SR141716A, somente após 14 dias de tratamento, a inibição do recrutamento de macrófagos para a matriz esponjosa. O tratamento com ambos os compostos não causou nenhuma alteração no perfil de recrutamento deste tipo celular no sétimo dia pós-implante, mas o tratamento com o antagonista do receptor CB₁, SR141716A, levou à diminuição significativa do recrutamento de macrófagos para a esponja no décimo quarto dia após implante (p<0.05). Os resultados estão ilustrados na figura 15.

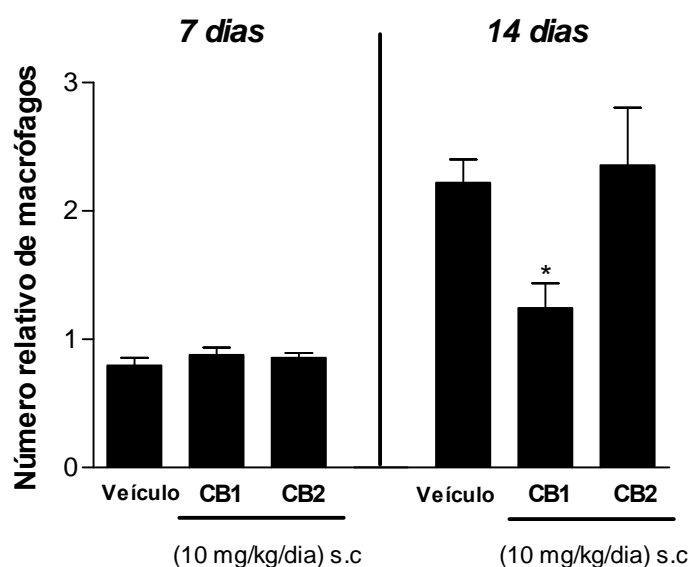


FIGURA 15: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de macrófagos, quantificado através da dosagem da atividade da *N*-acetilglicosaminidase (NAG).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

4.1.3. Efeitos sobre a concentração de citocinas e quimiocinas na matriz esponjosa.

Diversos mediadores inflamatórios são produzidos localmente após o implante subcutâneo da matriz esponjosa, notadamente quimiocinas e citocinas, moléculas notadamente importantes no processo inflamatório, assim como na neovascularização e no reparo tecidual. Neutrófilos e macrófagos são importantes fontes locais destes mediadores. As citocinas e quimiocinas são capazes de modular de forma direta e indireta o processo de angiogênese, seja influenciando o recrutamento e/ou ativação de células endoteliais, seja influenciando no recrutamento e/ou ativação de células responsáveis pela produção de mediadores também importantes para a neovascularização (BARCELOS, 2004; 2005; dados não

publicados). Foram avaliadas as concentrações de quatro importantes citocinas envolvidas na angiogênese inflamatória, a citocina TNF- α , as quimiocinas RANTES, CXCL1-3 / KC, além do fator de crescimento VEGF.

O tratamento sistêmico diário (10 mg/Kg, 200 μ L/animal/s.c.) com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂, SR141716A e SR144528, durante 7 e 14 dias, foi capaz de inibir de maneira significativa, e com padrão diferenciado, a concentração destes mediadores na matriz esponjosa, como avaliado por ELISA. Os resultados sugerem que o bloqueio dos receptores canabinóides é capaz de modular a produção local de citocinas e quimiocinas. O bloqueio dos receptores CB₁ levou à diminuição bastante significativa da concentração local de TNF- α , importante mediador pró-angiogênico e pró-inflamatório, tanto no sétimo ($p < 0.05$), quanto no décimo quarto dia ($p < 0.001$) pós-implante. Já o bloqueio dos receptores CB₂ somente se mostrou eficaz na diminuição da concentração local de TNF- α no sétimo dia pós-implante ($p < 0.01$). Estes resultados estão ilustrados na figura 16.

Quanto aos efeitos do tratamento diário com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂ sobre a concentração local de VEGF, importante mediador pró-angiogênico, é possível se observar diminuição significativa da concentração deste mediador na matriz esponjosa, após bloqueio dos receptores canabinóides, somente no sétimo dia pós-implante (CB₁, $p < 0.05$; CB₂ $p < 0.01$), momento onde está representado o pico deste mediador neste modelo experimental (BARCELOS *et al*, 2005). Não foi observado nenhum efeito do tratamento proposto sobre a concentração de VEGF no décimo quarto dia pós-implante. Observar estes resultados na figura 17.

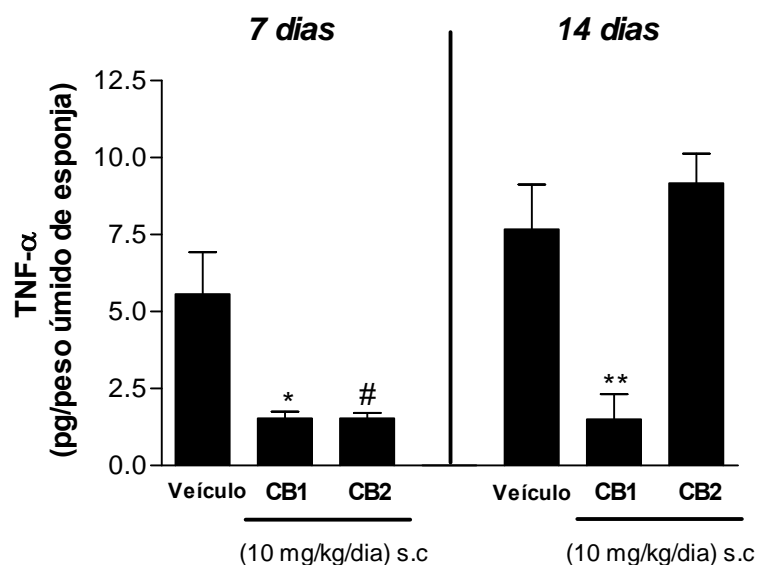


FIGURA 16: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de TNF- α , quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05; # p<0.01; ** p<0.001 em relação ao veículo.

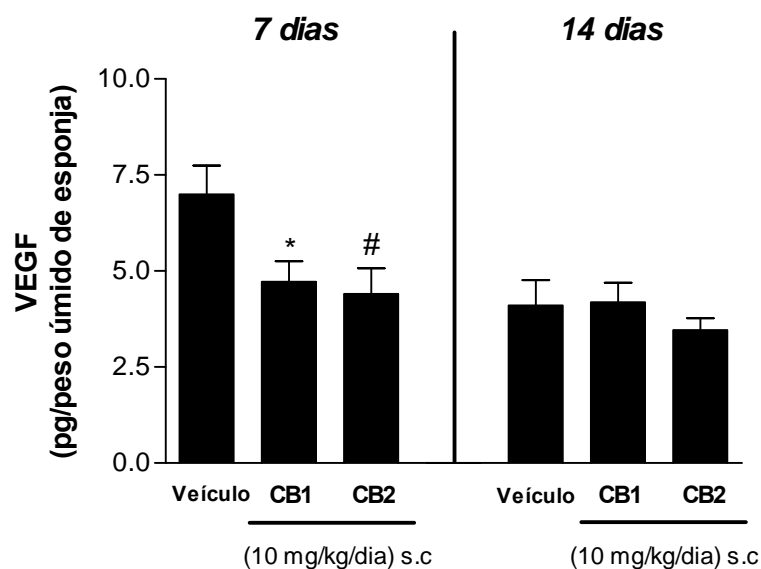


FIGURA 17: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de VEGF, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05; # p<0.01 em relação ao veículo.

O tratamento diário com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂ levou à diminuição na concentração local da quimiocina CXCL1-3/KC, quimiotática para neutrófilos, no sétimo dia pós-implante (CB₁, $p < 0.05$; CB₂ $p < 0.01$). O tratamento até o décimo quarto dia somente foi efetivo com o antagonista do receptor CB₁, SR141716A, quando houve uma diminuição bastante significativa na concentração local da quimiocina ($p < 0.05$). Figura 18.

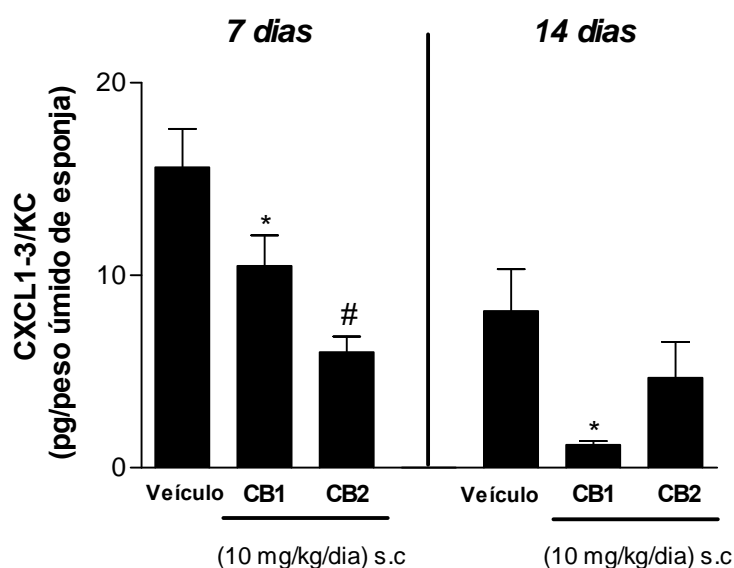


FIGURA 18: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CXCL1-3/KC, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$ em relação ao veículo.

O mesmo esquema de tratamento foi capaz de alterar as concentrações locais da quimiocina CCL5/RANTES, molécula descrita como reguladora do processo angiogênico por nosso grupo de trabalho (dados não publicados). De forma interessante, o tratamento com os antagonistas dos receptores CB₁ e CB₂ não alterou as concentrações da quimiocina no sétimo dia pós-implante, mas o

antagonista do receptor CB₂, SR144528, levou a um aumento significativo desta quimiocina no décimo quarto dia pós-implante ($p < 0.05$). Figura 19.

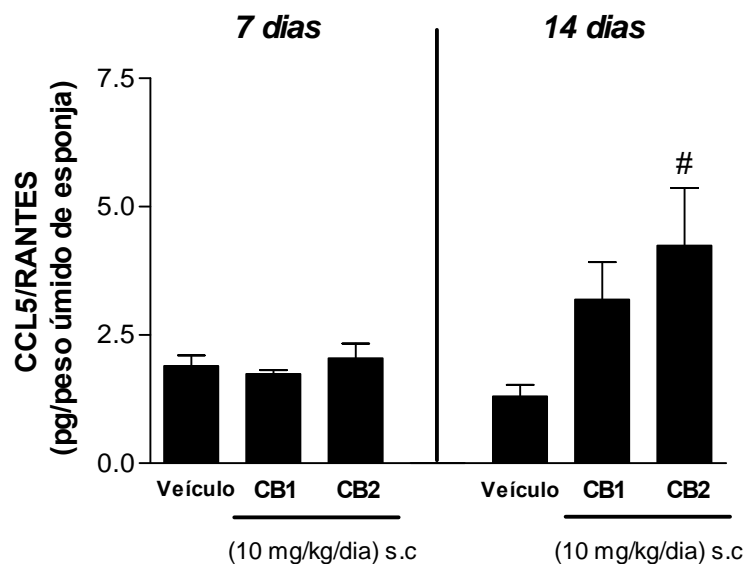


FIGURA 19: Efeito do tratamento com os antagonistas canabinóides SR141716 (CB₁) e SR144528 (CB₂), 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CCL5/RANTES, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. # $p < 0.01$ em relação ao veículo.

4.2. Efeitos do tratamento sistêmico com agonista misto dos receptores canabinóides WIN 55,212-2

Para se investigar os efeitos da ativação dos receptores canabinóides, escolheu-se aminoalquilindol WIN 55212,2, o enantiômero *R*-(+), um dos agonistas canabinóides mais comumente utilizado, com alta seletividade para CB₁ e CB₂. As doses escolhidas foram baseadas na literatura, em estudos onde se investigou o efeito anti-inflamatório, após administração sistêmica deste fármaco, em diversos modelos experimentais. Apesar de haver considerável efeito central após a administração, com os animais apresentando notável perda de tônus muscular e confusão (DREWS *et al*, 2005), estes efeitos são transitórios, desaparecendo com no máximo 2 horas após administração, sem aparente interferência em seus efeitos anti-inflamatórios e/ou anti-angiogênicos.

4.2.1. Efeitos sobre a concentração de hemoglobina na matriz esponjosa

A administração diária do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 (3 ou 10 mg/Kg, 200 µL/animal/s.c.) levou à redução na concentração de hemoglobina na matriz esponjosa, no sétimo dia pós-implante, em ambas as doses ($p < 0.05$). No décimo quarto dia pós-implante, a dose de 3 mg/Kg foi capaz de manter esta redução na concentração de hemoglobina ($p < 0.05$). Dados representados na Figura 20.

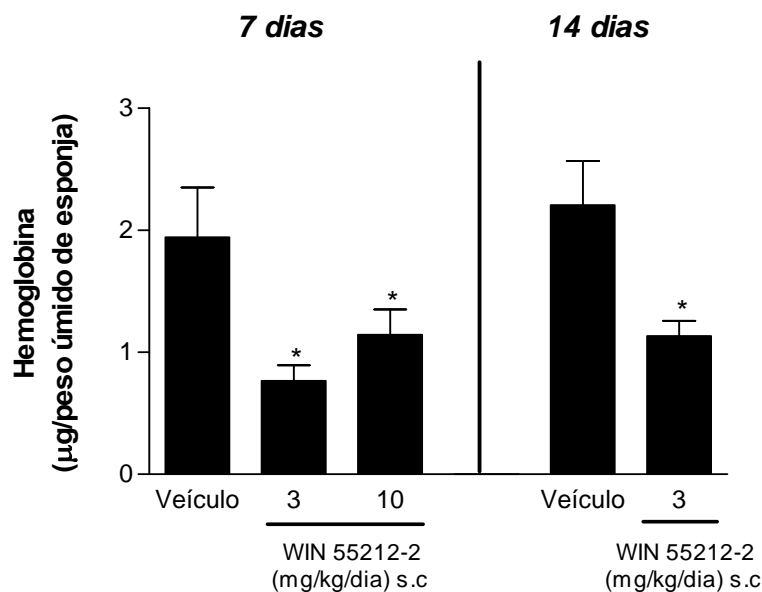


FIGURA 20: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 µL/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a formação de novos vasos, quantificada através da dosagem de hemoglobina na esponja (método de *Drabkin*).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

4.2.2. Efeitos sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa.

A administração diária do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 (3 ou 10 mg/Kg, 200 µL/animal/s.c.) levou a redução significativa, e dose-dependente, do recrutamento de neutrófilos para a matriz esponjosa no sétimo dia pós-implante (p<0.05). O mesmo efeito foi observado para a dose de 3 mg/Kg no décimo quarto dia pós-implante (p<0.05). Figura 21.

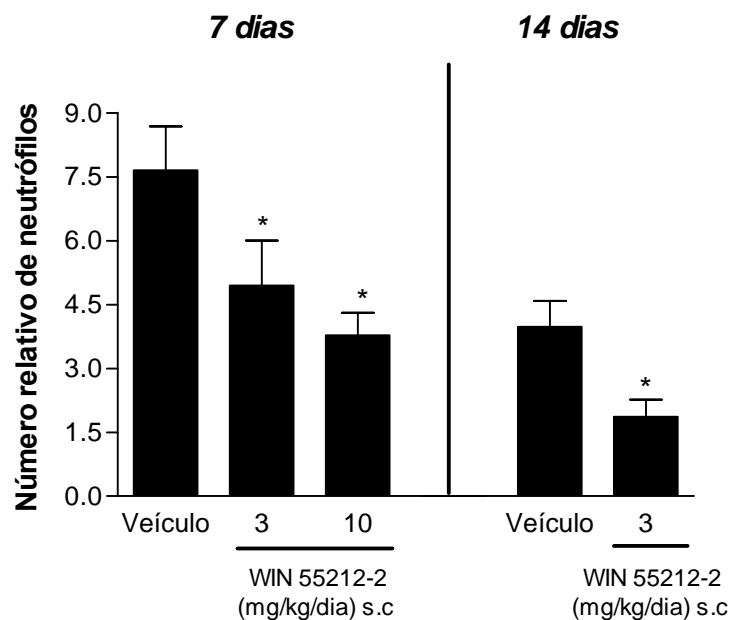


FIGURA 21: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de neutrófilos, quantificado através da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao veículo.

O mesmo sistema de tratamento levou à inibição dose-dependente do recrutamento de macrófagos para a matriz esponjosa no sétimo dia pós-implante ($p < 0.05$). Este perfil de inibição foi mantido no décimo quarto dia pós-implante, com o tratamento na dose de 3 mg/Kg ($p < 0.05$). Figura 22.

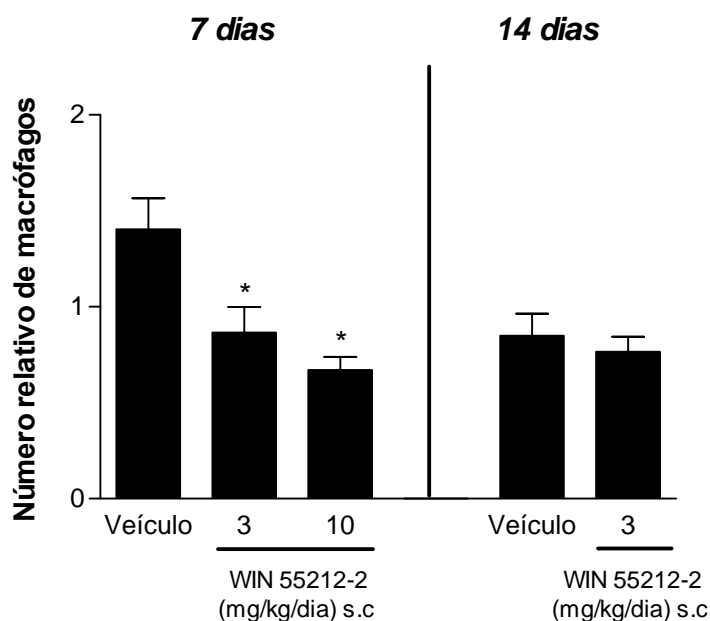


FIGURA 22: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de macrófagos, quantificado através da dosagem da atividade da *N*-acetilglicosaminidase (NAG).

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao veículo.

4.2.3. Efeitos sobre a concentração de citocinas e quimiocinas na matriz esponjosa.

Foram avaliadas as concentrações de quatro importantes citocinas envolvidas na angiogênese inflamatória, a citocina TNF- α , as quimiocinas CXCL1-3 / KC e CCL2 / JE, além do fator de crescimento VEGF. A quimiocina RANTES, ao contrário do experimento com os antagonistas dos receptores canabinóides, não foi examinada por questões meramente estratégicas, uma vez que estes experimentos foram realizados em momentos distintos durante o desenrolar do projeto.

A administração diária do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 (3 ou 10 mg/Kg, 200 μ L/animal/s.c.) levou à redução significativa, e de maneira dose-

dependente, da concentração da citocina TNF- α na matriz esponjosa no sétimo dia pós-implante, sendo este efeito observado na dose de 3 mg/Kg ($p < 0.01$) e notadamente na dose de 10 mg/Kg ($p < 0.001$). O mesmo perfil foi observado com o tratamento até o décimo quarto dia pós-implante ($p < 0.05$). Figura 23.

Perfil bastante semelhante foi observado quanto à concentração do fator de crescimento VEGF. O tratamento com o agonista misto WIN 55,212-2 é capaz de inibir a concentração do mediador na matriz esponjosa no sétimo e no décimo quarto dia pós-implante ($p < 0.05$). Figura 24.

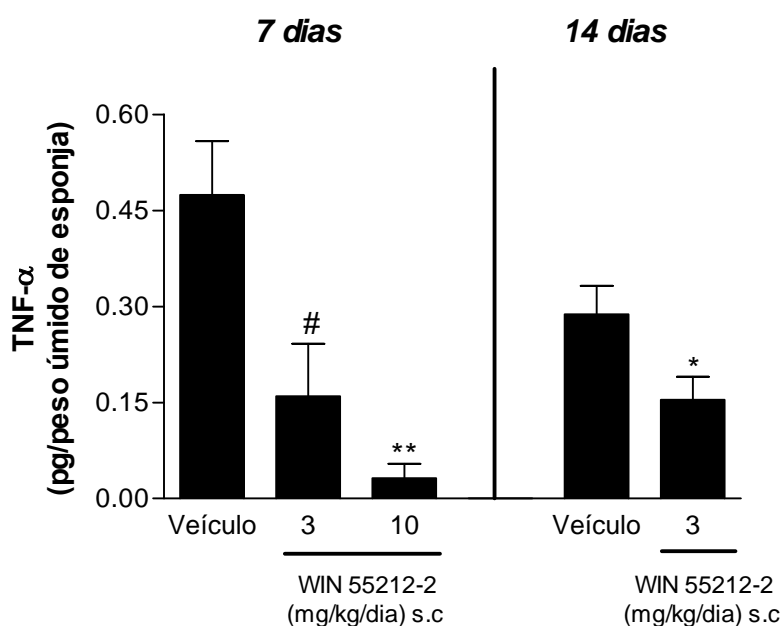


FIGURA 23: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de TNF- α , quantificada por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$ em relação ao veículo.

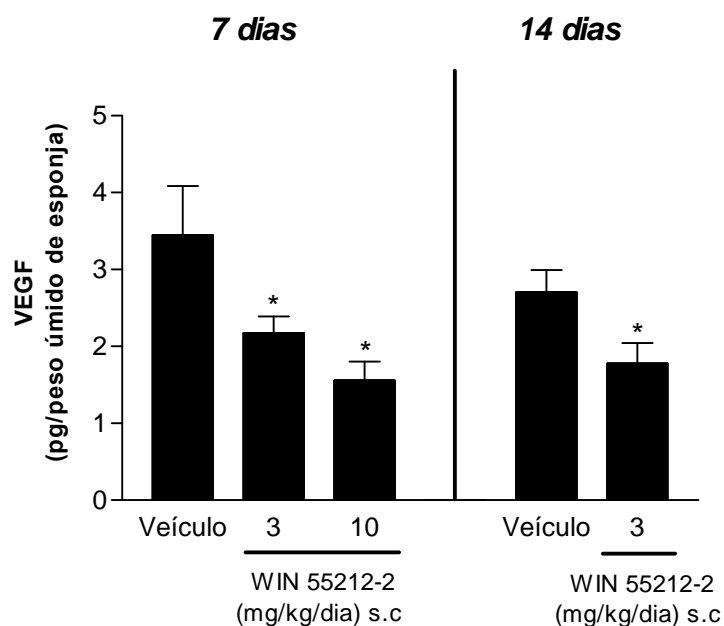


FIGURA 24: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de VEGF, quantificada por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p <0.05 em relação ao veículo.

Quanto ao efeito do tratamento diário com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 sobre a concentração de quimiocinas na matriz esponjosa, os resultados foram distintos. O tratamento é capaz de reduzir a concentração da quimiocina CXCL1-3/KC na matriz esponjosa no sétimo (de maneira dose-dependente) e décimo quarto dia pós-implante (p<0.05). Resultados ilustrados na figura 25. No que diz respeito à quimiocina responsável pelo recrutamento de mononucleares/macrófagos pra a matriz esponjosa, CCL2/JE, o tratamento com o WIN 55,212-2 não foi capaz de reduzir a concentração do mediador na matriz esponjosa nos dois momentos escolhidos para avaliação da resposta (Figura 26).

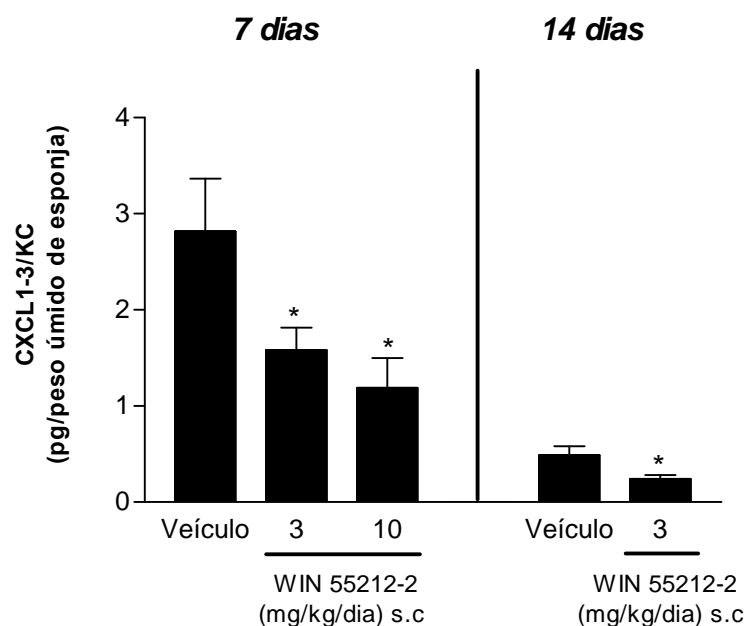


FIGURA 25: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CXCL1-3/KC, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p < 0.05 em relação ao veículo.

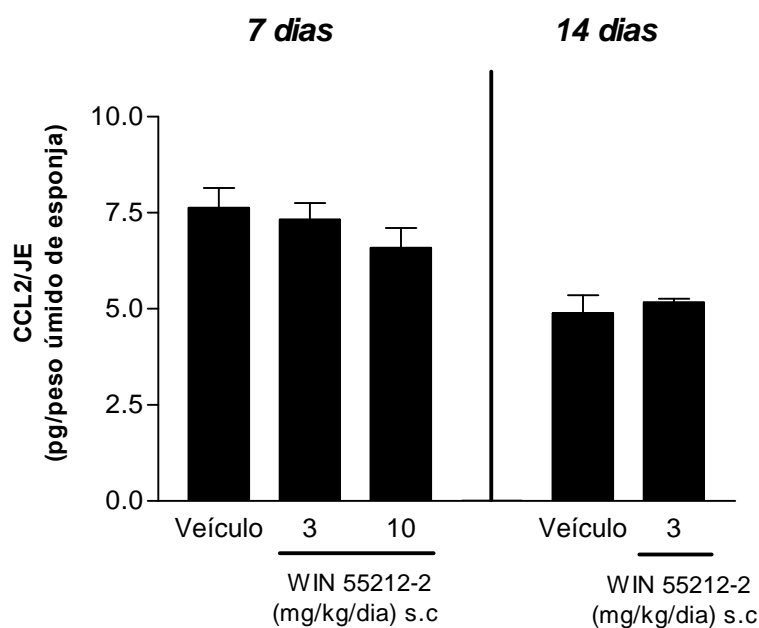


FIGURA 26: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg (200 μ L/animal/s.c.), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CCL2/JE, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo.

4.3. Efeitos do tratamento local com agonista misto dos receptores canabinóides WIN 55,212-2

Para se investigar os efeitos da ativação dos receptores canabinóides com o aminoalquilindol WIN 55,212-2, agonista misto dos receptores canabinóides, sobre a angiogênese inflamatória, sem interferência de nenhum fator sistêmico, optamos pelo tratamento local, intra-esponja, com a administração de duas concentrações do fármaco: 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{local}$ (50 $\mu\text{L}/\text{animal}/\text{local}$). A administração local, com seringa de insulina, pode causar pequena resposta inflamatória, mas o mesmo procedimento é feito com o grupo controle, descartando qualquer possibilidade de se mascarar os dados obtidos. Não foi observado nenhum efeito central aparente após a administração local do fármaco durante os 7 ou 14 dias de tratamento.

4.3.1. Efeitos sobre a concentração de hemoglobina na matriz esponjosa

A administração diária local do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 (30 ou 100 $\mu\text{g}/\text{local}$, 50 $\mu\text{L}/\text{animal}/\text{local}$) levou à redução na concentração de hemoglobina na matriz esponjosa, no sétimo dia pós-implante, em ambas as doses ($p < 0.05$). No décimo quarto dia pós-implante, a dose de 30 $\mu\text{g}/\text{local}$ foi capaz de manter esta redução na concentração de hemoglobina ($p < 0.05$). Dados representados na Figura 27.

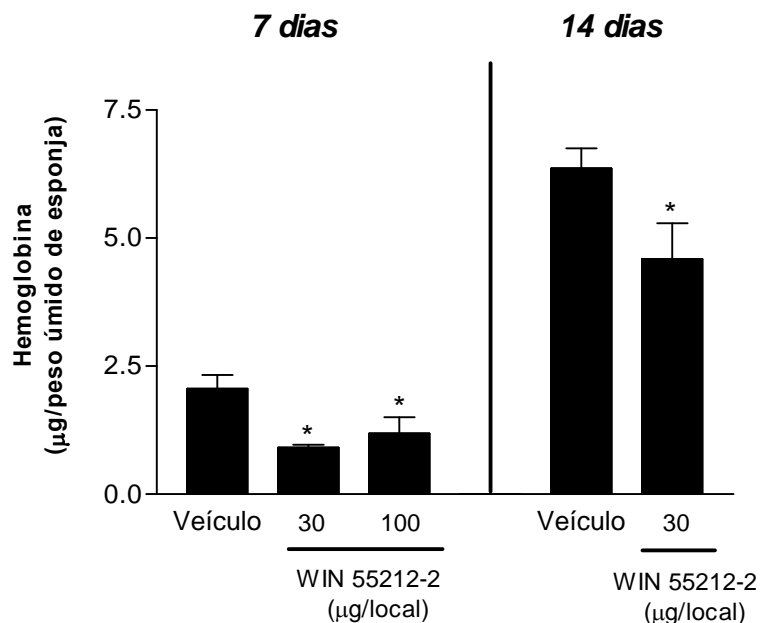


FIGURA 27: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a formação de novos vasos, quantificada através da dosagem de hemoglobina na esponja (método de *Drabkin*).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

4.3.2. Efeitos sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa.

A administração diária local do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 (30 ou 100 µg/local, 50 µL/animal/local) levou a redução significativa do recrutamento de neutrófilos para a matriz esponjosa no sétimo dia pós-implante (p<0.05). O mesmo efeito foi observado para a dose de 100 µg/local no décimo quarto dia pós-implante (p<0.05). FIGURA 28.

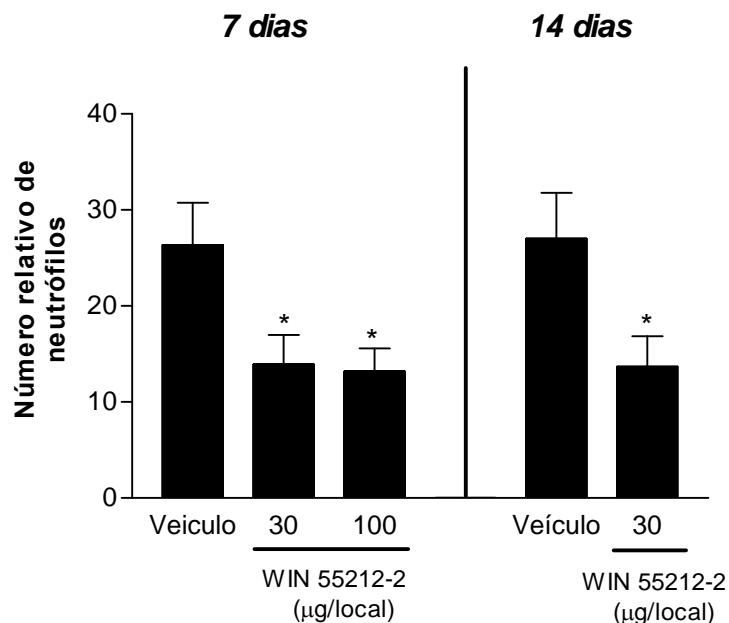


FIGURA 28: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de neutrófilos, quantificado através da dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

Diferentemente do tratamento sistêmico, a administração diária local do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 (30 ou 100 µg/local, 50 µL/animal/local) levou à inibição do recrutamento de macrófagos para a matriz esponjosa no sétimo dia pós-implante (p<0.05) somente na concentração de 30 µg/local. Este perfil de inibição não foi observado no décimo quarto dia pós-implante, com o tratamento na dose de 100 µg/local. Figura 29.

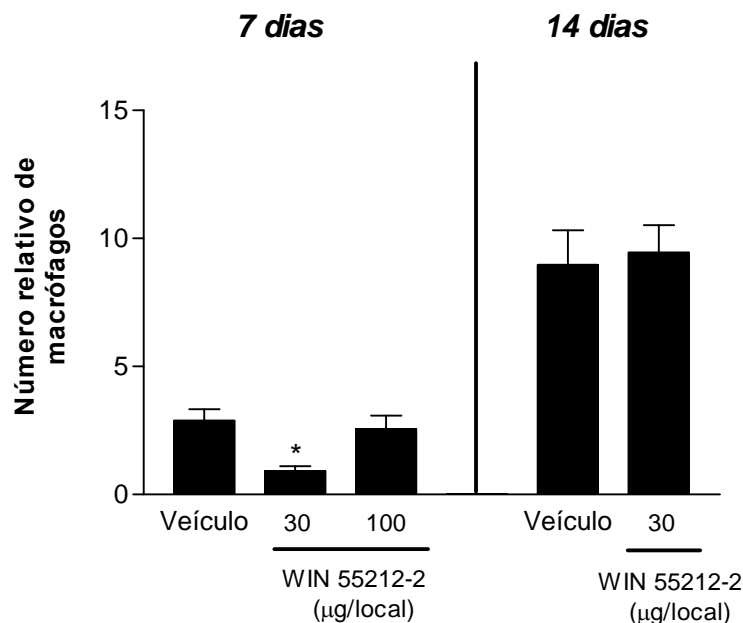


FIGURA 29: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre o recrutamento de macrófagos, quantificado através da dosagem da atividade da *N*-acetilglicosaminidase (NAG).

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

4.3.3. Efeitos sobre a concentração de citocinas e quimiocinas na matriz esponjosa.

Assim como no tratamento sistêmico, foram avaliadas as concentrações de citocinas e quimiocinas reconhecidas importantes na angiogênese inflamatória: a citocina TNF- α , as quimiocinas CXCL1-3 / KC e CCL2 / JE, e fator de crescimento VEGF. A administração diária local do agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 WIN 55,212-2 (30 ou 100 µg/local, 50 µL/animal/local) levou à redução significativa da concentração da citocina TNF- α na matriz esponjosa, no sétimo dia pós-implante, em ambas as concentrações (p<0.01). O mesmo perfil foi observado com o tratamento até o décimo quarto dia pós-implante (p<0.05). Figura 30.

Perfil bastante semelhante foi observado quanto à concentração do fator de crescimento VEGF. O tratamento local com o agonista misto WIN 55,212-2 é capaz de inibir a concentração do mediador na matriz esponjosa no sétimo e no décimo quarto dia pós-implante, nas duas concentrações estudadas ($p < 0.05$). FIGURA 31.

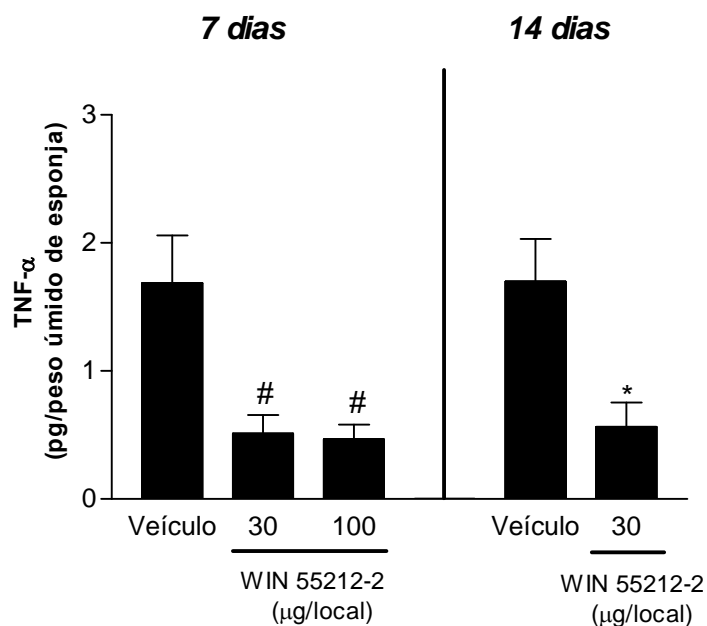


FIGURA 30: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de TNF- α , quantificada por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * $p < 0.05$; # $p < 0.01$ em relação ao veículo.

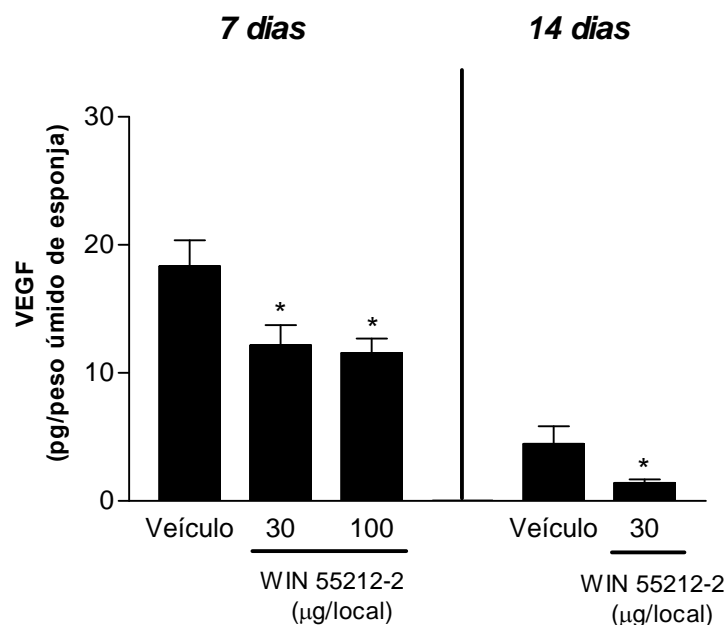


FIGURA 31: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de VEGF, quantificada por ELISA. Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

Em relação ao efeito do tratamento diário local com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2 sobre a concentração de quimiocinas na matriz esponjosa, os resultados foram distintos, mas ainda bastante similares ao tratamento sistêmico com o mesmo fármaco. O tratamento é capaz de reduzir a concentração da quimiocina CXCL1-3/KC na matriz esponjosa no sétimo e décimo quarto dia pós-implante ($p < 0.05$). Resultados ilustrados na figura 32. No que diz respeito à quimiocina CCL2/JE, o tratamento com o WIN 55,212-2 não foi capaz de reduzir a concentração do mediador na matriz esponjosa em nenhum dos dois momentos escolhidos para avaliação da resposta (Figura 33).

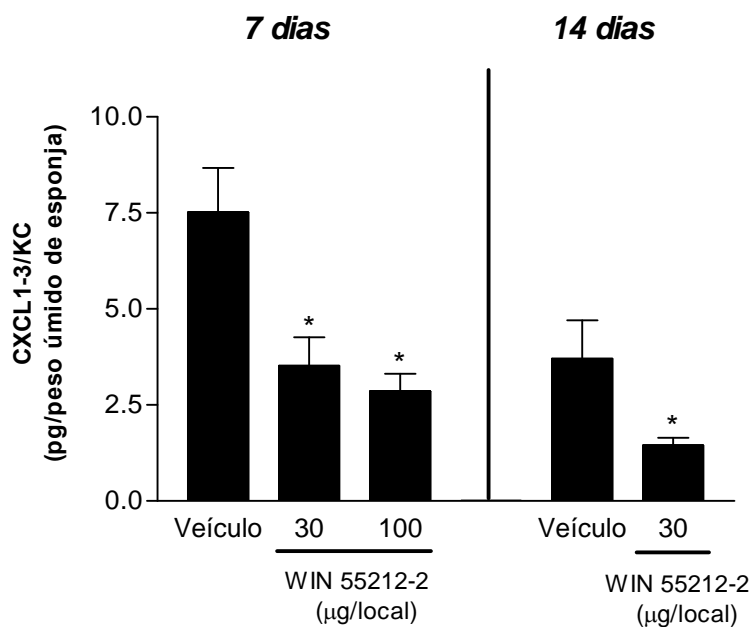


FIGURA 32: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CXCL1-3/KC, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

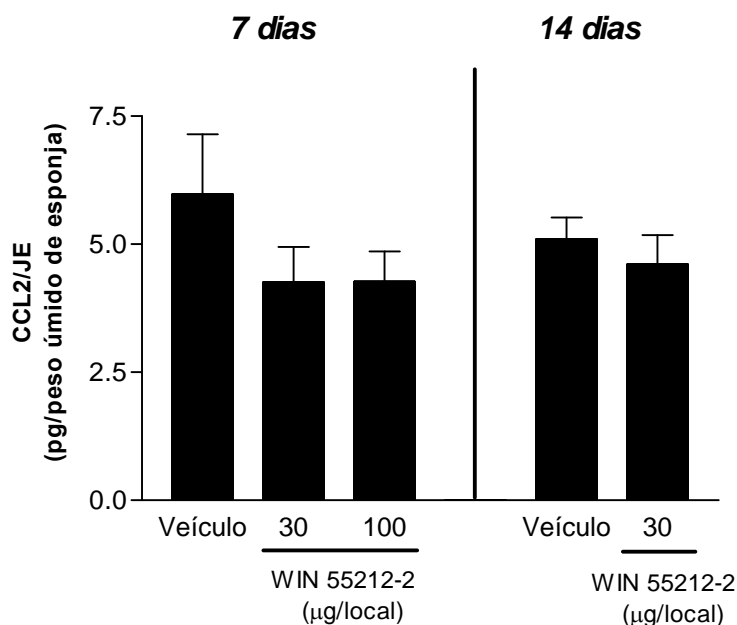


FIGURA 33: Efeito do tratamento com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2, 30 e 100 µg/local (50 µL/local/animal), durante 7 e 14 dias, sobre a concentração de CCL2/JE, quantificada por ELISA.

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média. N = 6-8 animais/grupo. * p<0.05 em relação ao veículo.

4.4. Análise histológica dos implantes de esponja após tratamentos com os antagonistas canabinóides SR141716A (CB₁) e SR144528 (CB₂), e com o agonista canabinóide misto WIN 55,212-2

A implantação da matriz esponjosa estimula progressiva infiltração de um tecido conjuntivo fibrovascular cujo perfil histológico demonstra crescente invasão de vasos sanguíneos neoformados, células inflamatórias e fibroblastos, culminando com a formação de um tecido de granulação característico de um processo de reparação tecidual. No sétimo dia pós-implantação, os implantes apresentam discreta formação vascular, com significativo infiltrado inflamatório e moderada formação colágena, encontrando-se preenchidos por um tecido conectivo frouxamente arranjado. Posteriormente, no décimo quarto dia pós-implantação, a matriz esponjosa se encontra preenchida por densa malha fibrovascular, caracterizada pela presença principal de polimorfonucleares, fibroblastos e apreciável formação neovascular. Interessantemente, pode ser observada a presença de leucócitos circulantes ou aderidos, dentro de alguns vasos neoformados. Finalmente, nos implantes de décimo quarto dia, observou-se maior organização e compactação do tecido fibrovascular, característico de reações granulomatosas crônicas, com rede neovascular madura, presença acentuada de leucócitos e matriz extracelular abundante.

4.4.1 – Efeitos do tratamento com antagonistas dos receptores canabinóides sobre o perfil histológico da matriz esponjosa após implante subcutâneo.

O tratamento com os antagonista canabinóide SR141716A (CB₁), 10 mg/Kg, até o sétimo dia após implantação da matriz esponjosa, leva a uma redução sensível do infiltrado celular para a esponja assim como a uma menor e bastante evidente formação de tecido fibrovascular, quando comparado aos animais tratados com veículo somente, onde a malha de fibras conjuntivas está bem composta. O mesmo tratamento, até o décimo quarto dia após implantação, leva a uma redução bastante significativa da formação do tecido fibrovascular na matriz esponjosa, uma vez que o grupo tratado somente com veículo apresenta rede neovascular bastante desenvolvida. Para o antagonista SR144528 (CB₂), o tratamento na dose de 10 mg/Kg levou a resultados muito semelhantes ao do tratamento com o antagonista dos receptores CB₁, SR141716A. Tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia após implantação, há uma redução do tecido fibrovascular e do infiltrado celular, sendo que para o infiltrado esta resposta é mais evidente no sétimo dia. No décimo quarto dia é notável a diminuição da rede neovascular. A análise histológica reflete com bastante clareza os resultados obtidos com os ensaios bioquímicos para avaliação do infiltrado celular e da neovascularização (ensaio de hemoglobina) (Figuras 34 e 35).

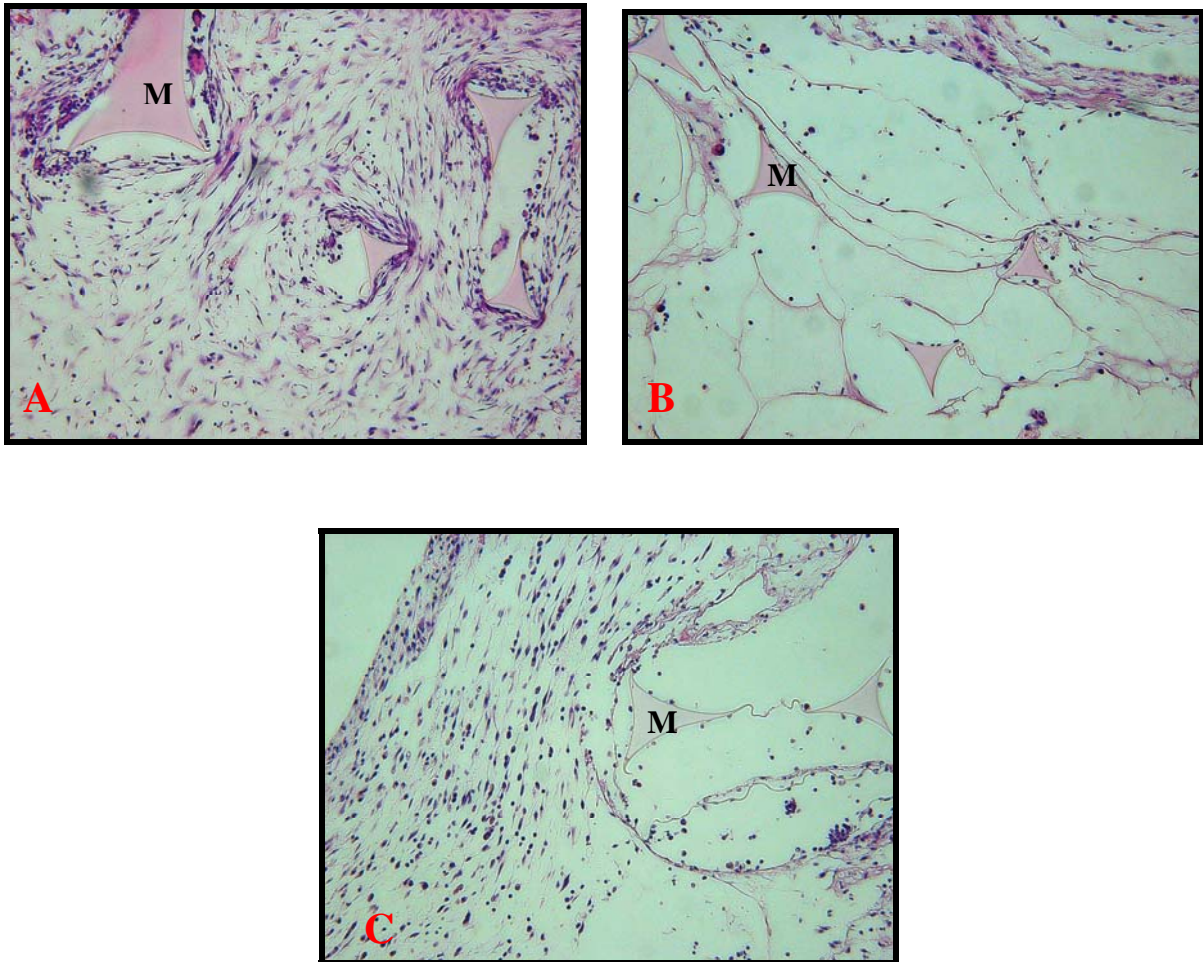


FIGURA 34: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados com os antagonistas canabinóides SR141716A e SR144528 (10 mg/Kg) por 7 dias.

(A) Corte representativo de animal tratado com veículo. (B) Corte representativo de animal tratado com SR141716A. (C) Corte representativo de animal tratado com SR144528. Aumento de 200X (objetiva de 20X). M: Matriz.

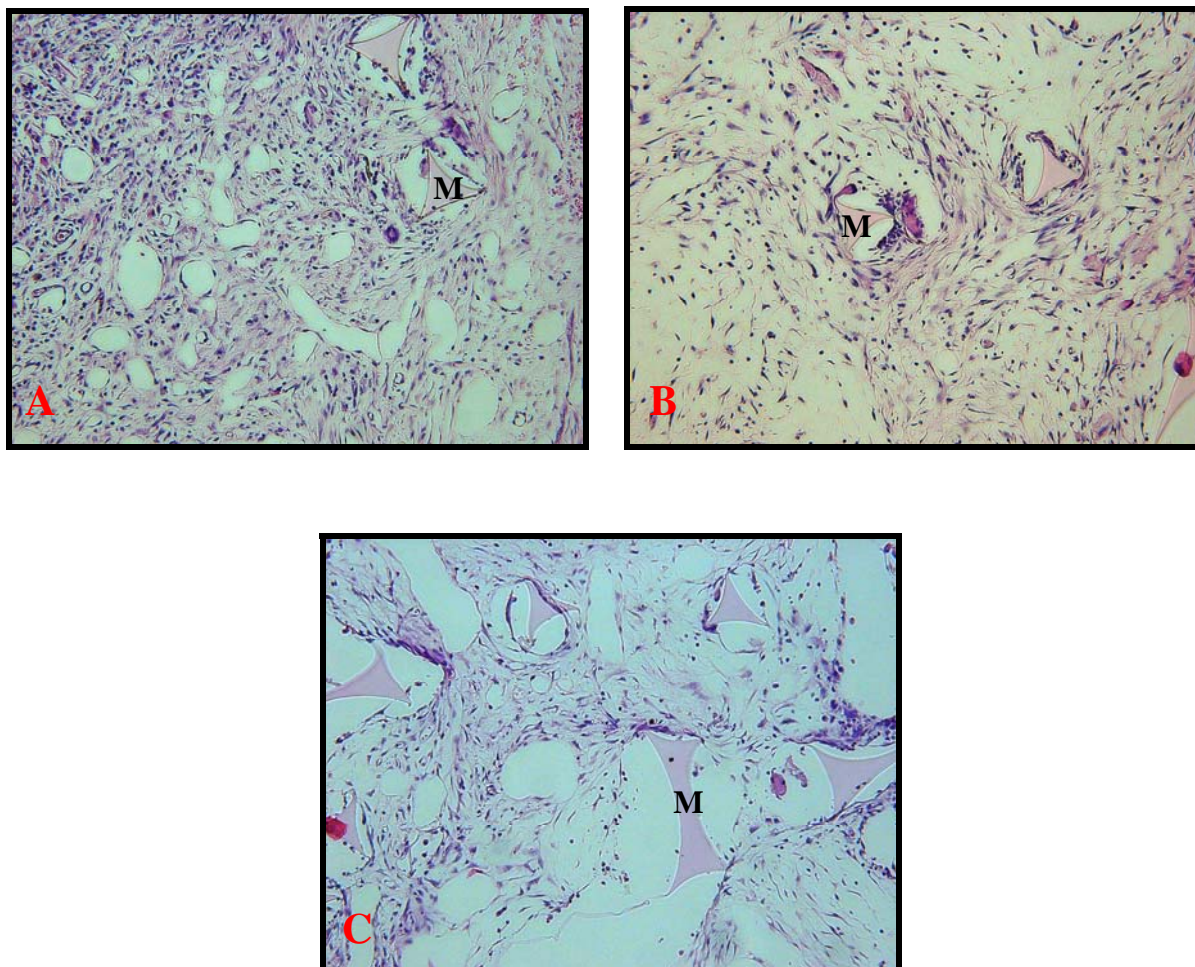


FIGURA 35: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados com os antagonistas canabinóides SR141716A e SR144528 (10 mg/Kg) por 14 dias.

(A) Corte representativo de animal tratado com veículo. (B) Corte representativo de animal tratado com SR141716A. (C) Corte representativo de animal tratado com SR144528. Aumento de 200X (objetiva de 20X).

4.4.2 – Efeitos do tratamento com o agonista misto dos receptores canabinóides sobre o perfil histológico da matriz esponjosa após implante subcutâneo.

O tratamento sistêmico com o agonista misto WIN 55,212-2, 3 e 10 mg/Kg, até o sétimo dia após implantação da matriz esponjosa leva a notável redução do infiltrado celular para a esponja. A formação de tecido fibrovascular, característica deste momento, está bastante reduzida quando comparada aos animais tratados com veículo somente, onde a malha de fibras conjuntivas está bem definida. O tratamento, até o décimo quarto dia após implantação, na dose de 3 mg/Kg, leva a uma redução marcante da formação do tecido fibrovascular na matriz esponjosa, uma vez que o grupo tratado somente com veículo apresenta rede neovascular bastante desenvolvida (Figuras 36 e 37).

Para o tratamento local com o mesmo agonista, nas concentrações de 30 e 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$, os resultados apresentados foram muito semelhantes ao do tratamento sistêmico como o mesmo fármaco. Tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia após implantação (concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{animal}$), há redução do tecido fibrovascular e também do infiltrado celular, sendo que para o infiltrado esta resposta é mais evidente no sétimo dia, quando este fenômeno é exacerbado. No décimo quarto dia é evidente a diminuição da rede neovascular. A análise histológica reflete com bastante clareza os resultados obtidos com os ensaios bioquímicos para avaliação do infiltrado celular e da neovascularização (ensaio de hemoglobina) (Figuras 38 e 39).

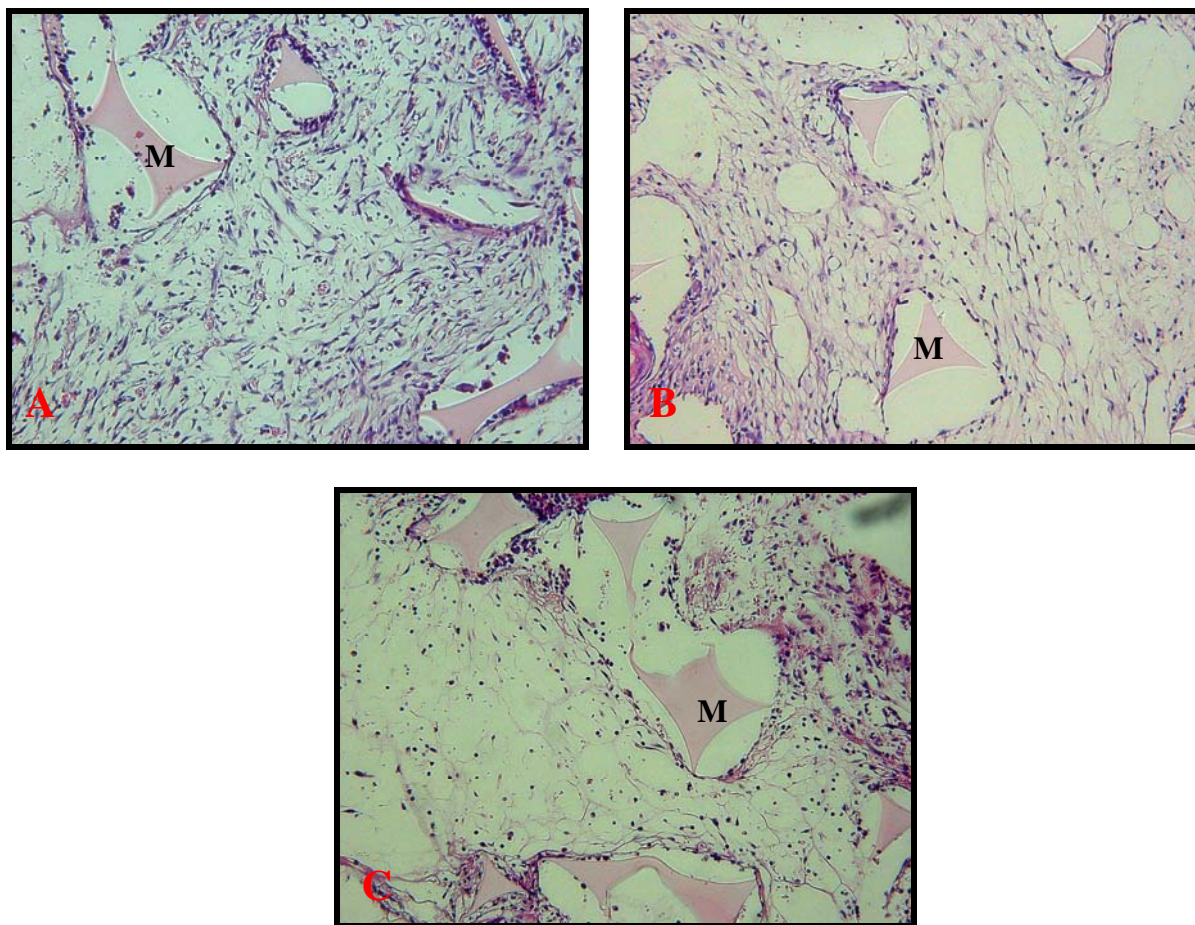


FIGURA 36: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados sistemicamente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 7 dias.

(A) Corte representativo de animal tratado com veículo. (B) Corte representativo de animal tratado com WIN 55,212-2 (3 mg/Kg). (C) Corte representativo de animal tratado com WIN 55,212-2 (10 mg/Kg). Aumento de 200X (objetiva de 20X). M: Matriz.

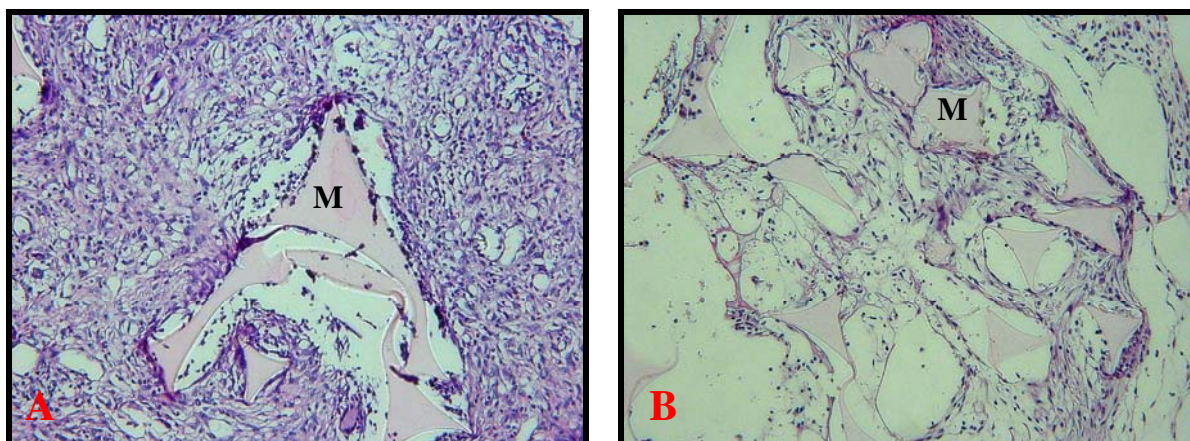


FIGURA 37: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados sistemicamente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 14 dias.

(A) Corte representativo de animal tratado com veículo. (B) Corte representativo de animal tratado com WIN 55,212-2 (3 mg/Kg). Aumento de 200X (objetiva de 20X). M: Matriz.

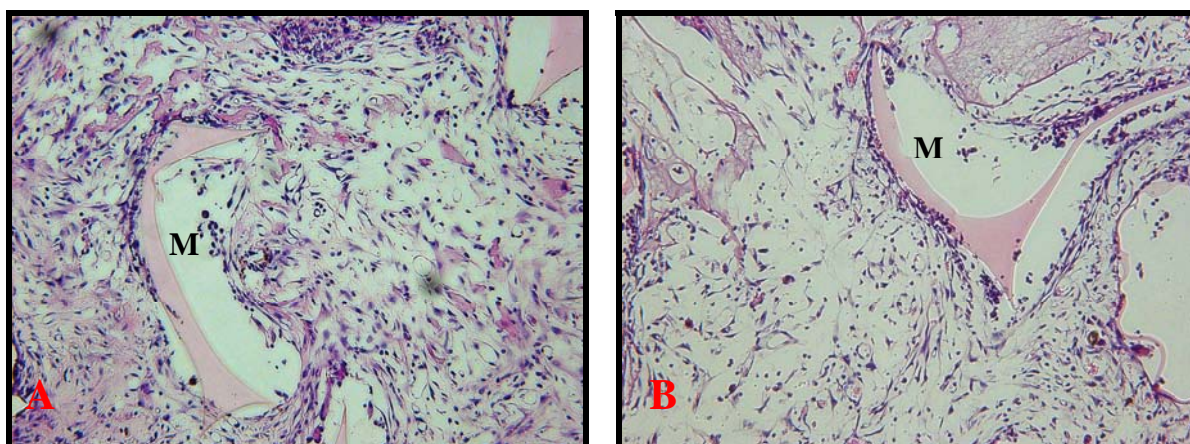


FIGURA 38: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados localmente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 14 dias.

(A) Corte representativo de animal tratado com veículo. (B) Corte representativo de animal tratado com WIN 55,212-2 (30 µg/local/animal). Aumento de 200X (objetiva de 20X). M: Matriz.

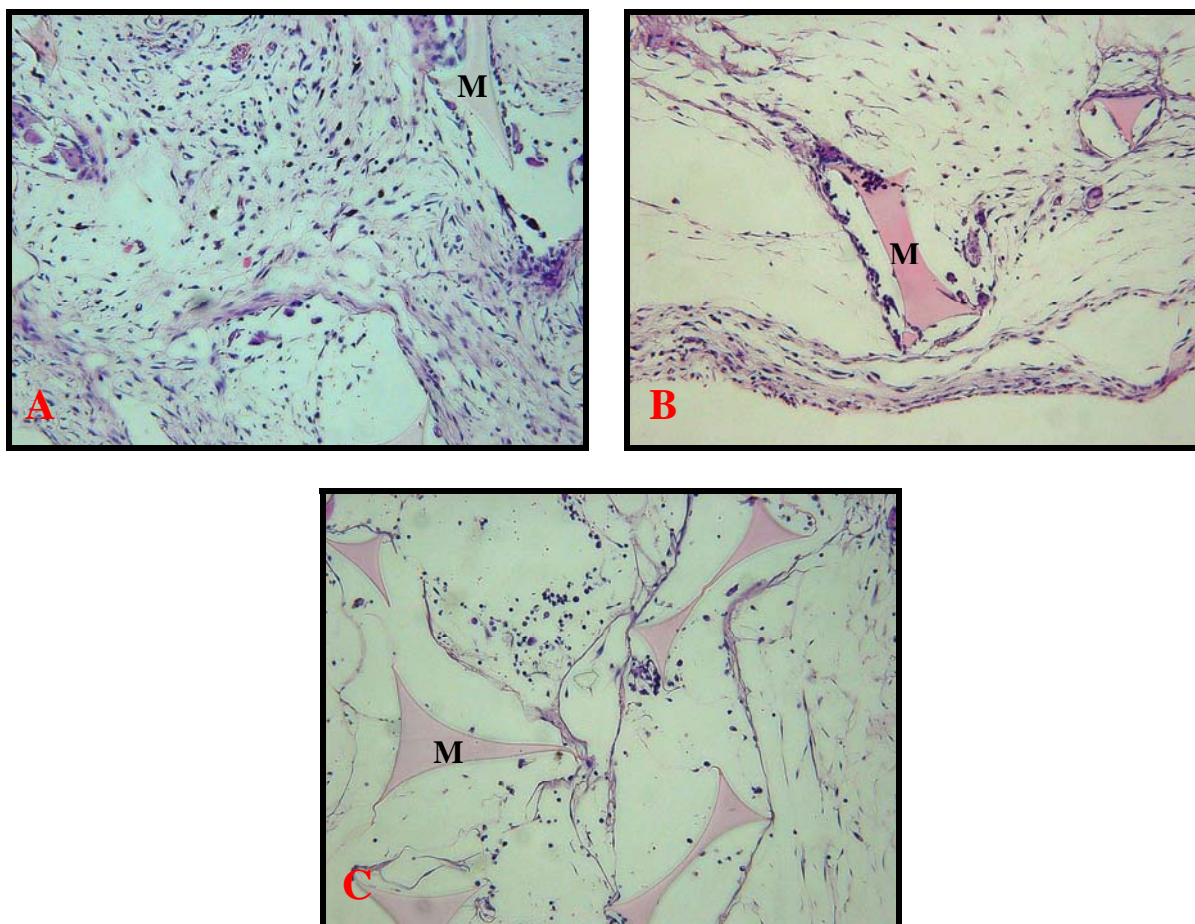


FIGURA 39: Cortes histológicos, corados por H.E., representativos do tecido fibrovascular induzido, em implantes subcutâneos de matriz esponjosa, em animais tratados localmente com o agonista canabinóide WIN 55,212-2 por 7 dias.

(A) Corte representativo de animal tratado com veículo. (B) Corte representativo de animal tratado com WIN 55,212-2 (30 µg/local/animal). (C) Corte representativo de animal tratado com WIN 55,212-2 (100 µg/local/animal). Aumento de 200X (objetiva de 20X). M: Matriz.

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Durante processos inflamatórios crônicos, a angiogênese é considerada essencial não apenas para a manutenção da perfusão tecidual adequada, mas também contribuindo para o aumento do recrutamento celular para o sítio de inflamação (FOLKMAN, 1995). Embora a participação das citocinas como moléculas mediadoras tanto no processo inflamatório como angiogênico seja amplamente discutida na literatura, pouco se conhece sobre o papel destas na modulação da rede molecular e também dos eventos celulares envolvidos na regulação do fenótipo angiogênico durante a angiogênese inflamatória.

No presente estudo, investigou-se como a ativação ou bloqueio dos receptores canabinóides CB₁ e CB₂, seja pela administração sistêmica de antagonistas destes receptores, seja pela administração local e também sistêmica de um agonista misto tanto em CB₁ quanto em CB₂, buscando entender como a ativação ou inativação deste sistema (considerando que este esteja exercendo uma função ativa, uma vez que canabinóides endógenos podem estar sendo produzidos no local), influenciaria a ativação e/ou recrutamento celular pra o local estudado, assim como a intervenção neste sistema influenciaria a produção de mediadores importantes no controle da angiogênese inflamatória.

Utilizando o modelo de implantação subcutânea de discos de esponja em camundongos (ANDRADE *et al*, 1987), os dados obtidos indicam que o influxo de células inflamatórias e a angiogênese, como quantificado pela dosagem de hemoglobina, estão bastante reduzidos em relação ao grupo controle, tanto quando há tratamento com os antagonistas como quando há tratamento com o agonista misto. Alguns importantes mediadores da angiogênese inflamatória, como a

quimiocina CXCL1-3/KC, o TNF- α e o VEGF apresentaram redução significativa de suas concentrações na matriz esponjosa após os tratamentos, no momento em que estão em seu pico de produção (BARCELOS *et al*, 2004)

A lesão promovida pela introdução da esponja no compartimento subcutâneo dos camundongos induziu resposta local similar àquela observada em processos inflamatórios crônicos e de cicatrização de feridas, onde se observa o desencadeamento de uma cascata complexa e organizada de eventos, resultando no acúmulo celular e vascular no local da lesão (WITTE & BARBUL, 1997).

Juntamente com os eventos celulares, a angiogênese é controlada pela complexa interação entre inibidores e ativadores, cujo balanço apropriado leva à iniciação e à manutenção do processo (IRUELA-ARISPE & DVORAK, 1997). A maioria das moléculas angiogênicas conhecidas são citocinas (incluindo os fatores de crescimento e as quimiocinas) que, além de serem importantes mediadores inflamatórios, são capazes de regular diretamente o recrutamento e ativação de células endoteliais (BENELLI *et al*, 2006).

O delta-9-THC e seus análogos sintéticos exibem uma série de efeitos biológicos através de seu potente efeito sobre receptores denominados “receptores canabinóides”. Dois receptores canabinóides específicos, CB1 e CB2, ambos acoplados à proteína G, foram clonados e caracterizados em tecidos de mamíferos. Os receptores CB1 são abundantes no cérebro, mas também presentes na periferia, como no endotélio vascular e no baço. Os receptores CB2 estão presentes principalmente em células do sistema imune. Estudos moleculares e farmacológicos demonstraram que a ativação dos receptores canabinóides pode levar à inibição ou ativação da adenilato ciclase (dependendo do tipo de proteína G acoplado ao receptor), sendo que a ativação de CB1 também leva à modulação do

funcionamento de canais iônicos. Os receptores canabinóides também modulam diversas vias de sinalização, principalmente aquelas envolvidas na proliferação celular e na sobrevivência, como, por exemplo, ERK, MAP e PI3K (HOWLETT *et al.*, 2004; DE PETROCELLIS *et al.*, 2004).

A existência de receptores canabinóides específicos apontou imediatamente para a possibilidade de o organismo sintetizar ligantes endógenos para estes receptores. Os assim chamados “endocanabinóides”, compostos eicosanóides derivados do ácido araquidônico, mostraram ser um grupo relativamente diversificado, com pelo menos 2 membros já bastante estudados: a anandamida e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Estes dois compostos são tanto produzidos no cérebro como em tecidos periféricos, além de serem secretados por diversos tipos celulares. Os endocanabinóides são produzidos e ativam os receptores canabinóides em diversas condições fisiológicas, sendo que a maioria destas ainda carece de detalhes em nível molecular e celular (DE PETROCELLIS *et al.*, 2004).

No presente estudo, escolhemos duas estratégias farmacológicas para averiguarmos de qual maneira o sistema canabinóide estaria envolvido nos processos de reparo tecidual e angiogênese inflamatória, abordagem esta a que se propõe o modelo experimental de implante de esponja. Quanto ao bloqueio dos receptores canabinóides, com dois antagonistas específicos destes receptores, já bem representados na literatura especializada, observamos um potente efeito anti-inflamatório e também anti-angiogênico, tendo escolhido como momentos para avaliação os dias 7 e 14 após a implantação, com tratamento sistêmico diários, pontos estes já demonstrados em trabalhos do grupo (BARCELOS *et al.*, 2004; 2005) como sendo ideais para avaliação das respostas requeridas.

O bloqueio tanto de CB₁ como de CB₂ levou a uma diminuição da resposta angiogênica, como avaliados nos dias 7 e 14 após implantação, pela dosagem do conteúdo de hemoglobina. O mesmo perfil é observado nas análises de cortes histológicos nestes mesmos momentos, onde há diminuição sensível da rede neovascular e do tecido fibrovascular adjacente. Este perfil de diminuição é acompanhado por uma redução sensível dos níveis de VEGF no sétimo dia pós-implante. Barcelos *et al.* (2005) mostra o pico de VEGF no sétimo dia de implantação. Uma redução sensível nos níveis deste mediador poderia de forma contundente retardar a neovascularização dos implantes, refletindo na diminuição da concentração de hemoglobina nos mesmos. A diminuição do recrutamento neutrofílico para o foco inflamatório é nítida, como analisado por MPO. Neutrófilos são produtores potenciais de VEGF e TNF- α , duas moléculas reconhecidamente pró-angiogênicas (BENELLI *et al.*, 2006; FOLKMAN *et al.*, 1995).

O recrutamento celular para a esponja está reduzido, e de forma diferencial, após o tratamento com os antagonistas CB₁ e CB₂. Ambas as estratégias levam à redução do infiltrado neutrofílico após o sétimo dia de tratamento. Já para o décimo quarto dia, apenas o antagonista CB₁, SR141716A é capaz de levar a uma inibição deste recrutamento, mesmo que no décimo quarto dia este fenômeno já não seja tão importante para os eventos marcantes neste modelo experimental, como a formação do tecido fibrovascular. Em relação ao recrutamento de macrófagos para a matriz esponjosa, somente o antagonista CB₁, SR141716A, foi capaz de reduzir o influxo deste tipo celular. Os níveis da quimiocina CCL2/JE, essencial para o recrutamento de macrófagos nos momentos iniciais pós-implante (BARCELOS *et al.*, 2005), não se mostram alterados em nenhum momento após o tratamento (dados não mostrados), demonstrando que a interferência sobre o recrutamento de macrófagos para a matriz

esponjosa parece não depender desta quimiocina. Outras quimiocinas, como, por exemplo, CCL3/MIP-1 α , e, até em um outro momento, CCL5/RANTES, poderiam também ser os moduladores do recrutamento de macrófagos para a matriz neste modelo experimental.

Os níveis da citocina TNF- α estão bastante reduzidos após o tratamento com os antagonistas CB₁ e CB₂, 7 e 14 dias pós-implantação. Somente o antagonista CB₂ não foi capaz de levar a uma redução da concentração da citocina após o décimo quarto dia. A citocina TNF- α , reconhecidamente pró-angiogênica, pode levar à liberação de controladores da resposta angiogênica dependendo do local e da concentração desta no meio. A citocina pode controlar a angiogênese, por exemplo, regulando a síntese de VEGF e CXCL1-3/KC (YOSHIDA *et al*, 1997). É interessante observar que os baixos níveis desta citocina estão correlacionados, nos resultados apresentados, com os baixos níveis de VEGF e CXCL1-3/KC, e conseqüentemente, a uma menor neovascularização e também menor recrutamento para o sítio inflamatório. O mecanismo do TNF- α neste sistema poderia ser, justamente, através do sinergismo com estas moléculas relacionadas, ou, em certo ponto, com a ativação local de células inflamatórias, como o neutrófilo. A idéia central, desta forma, seria: Menos infiltrado celular, pela redução da concentração de CXCL1-3/KC, menos produção de TNF- α e moléculas associadas (incluindo uma menor indução da produção de outras moléculas pelo próprio TNF- α) ou o antagonista seria capaz de, diretamente, reduzir a produção de TNF- α pelos tipos celulares na matriz esponjosa (local), o que já foi citado na literatura para o infiltrado celular em um modelo de resposta inflamatória sistêmica (CROCI *et al*, 2003). A última hipótese é menos válida, uma vez que a análise histológica já revela uma nítida redução no infiltrado celular após tratamento com os fármacos.

O influxo celular para a esponja está bastante reduzido, como avaliado pela análise histológica (e pelas análises bioquímicas relacionadas). Os níveis, principalmente da quimiocina fundamental para o recrutamento de neutrófilos, CXCL1-3/KC, está bastante reduzido, o que justifica não somente a menor presença de neutrófilos no sítio, assim como também, e diretamente, a neovascularização, uma vez que esta quimiocina é capaz de regular a angiogênese *per se* (BELPERIO *et al*, 2000). Interessante observar que somente o tratamento com o antagonista CB₁ mantém baixos os níveis da quimiocina CXCL1-3/KC e da citocina TNF- α após o décimo quarto dia de tratamentos. Estes dados se correlacionam perfeitamente com o menor influxo neutrofílico no décimo quarto dia.

A análise histológica demonstra uma notável redução na formação de tecido fibrovascular, com o menor acúmulo de fibras conjuntivas e menor neovascularização após o tratamento com ambos os antagonistas. Estas alterações fisiopatológicas estão diretamente ligadas aos pontos discutidos anteriormente, e também à discussão subsequente, onde a menor presença de infiltrado celular leucocitário, notadamente o produtor da maior quantidade de mediadores pró-inflamatórios, e a conseqüente diminuição da concentração local de fatores pró-angiogênicos e pró-fibróticos, seja pelo menor recrutamento celular, seja também pelo efeito direto sobre a produção destes mediadores pelas células residentes, leva a um menor rearranjo da matriz em formação.

A quimiocina RANTES, até então pouco avaliada como mediador fundamental no processo de angiogênese inflamatória, vem sendo uma quimiocina de interesse em nossos trabalhos (BARCELOS *et al*, dados não publicados). CCL5/RANTES pode levar à indução de sinais pró-apoptóticos em células inflamatórias através de sua ligação ao receptor CCR1 e CCR5 (VLAHAKIS *et al*, 2002; BARCELOS *et al*,

dados não publicados). De forma interessante, a neovascularização corneal está inibida em camundongos *knock out* para o receptor CCR5 (AMBATI *et al*, 2003). No presente estudo observamos um aumento na concentração de RANTES no décimo quarto dia após implantação e tratamento, fenômeno este que poderia contribuir para a menor formação de tecido fibrovascular na matriz esponjosa. Dados de nosso grupo demonstram que CCL5/RANTES exógeno é capaz de inibir a neovascularização através do receptor CCR5, já a atividade anti-angiogênica endógena deste receptor parece ser redundante com a atividade do receptor CCR1. O tratamento com o antagonista canabinóide CB₂ leva a um aumento significativo na concentração desta quimiocina na esponja, sugerindo que este efeito é mediado pelo mesmo mecanismo que modula a produção de outros mediadores em nosso estudo. Esta elevação contribuiria sinergisticamente para a redução da resposta angiogênica também relacionada ao tratamento com este antagonista.

A compreensão de eventos celulares envolvidos na angiogênese inflamatória e da regulação molecular desses eventos possui extensas implicações clínicas. A multiplicidade de alvos existentes, os quais estão envolvidos em uma complexa rede de interações, provê alvos terapêuticos para o tratamento de uma variedade de doenças dependentes deste processo. O número de alvos potenciais e de compostos em estudo para uma “terapia anti-angiogênica”, por exemplo, está em constante expansão, mas, ainda, em estágios iniciais (TARABOLETTI & MARGOSIO, 2001).

O tratamento com os antagonistas canabinóides CB₁ e CB₂ se mostrou uma estratégia eficaz na redução da resposta inflamatória e angiogênica associadas a um modelo experimental de implante de matriz esponjosa. A administração sistêmica dos fármacos leva à redução do infiltrado celular, da angiogênese e à menor

produção de mediadores relacionados a estes fenômenos. É de importância lembrar que o antagonista CB₁, SR141716A, já se encontra no mercado farmacêutico como *Rimonabant* ou *Acomplia*, indicado para o tratamento da obesidade, fenômeno este que também possui uma resposta inflamatória associada (FANTUZZI *et al*, 2005).

Importante frisar que, até o momento, pouco é discutido na literatura especializada sobre um relevante papel pró-inflamatório para os endocanabinóides em diversas condições patológicas, seja pela discrepância existente entre alguns estudos referentes à concentração destas moléculas no sítio inflamatório em questão, seja pela variedade de modelos experimentais utilizados, impossibilitando a construção exata de um mecanismo de ação para esta classe de moléculas (CROXFORD & YAMAMURA, 2005; KLEIN, 2005). O 2-AG é o endocanabinóide com a participação na resposta inflamatória melhor estabelecida, principalmente no que diz respeito a sua influência sobre o recrutamento de tipos celulares e indução da produção de moléculas pró-inflamatórias, como as citocinas. A anandamida parece não ser o endocanabinóide mais atuante na resposta inflamatória, pelo menos na periferia, uma vez que no sistema nervoso central esta molécula é capaz de regular diversas respostas celulares, mediadas principalmente por células da glia (KARANIAN & BAHR, 2006; GOKOH *et al*, 2005; KLEIN, 2005; OKA *et al*, 2005).

A expressão de receptores canabinóides está aumentada em células inflamatórias como neutrófilos, linfócitos T *helper*, monócitos/macrófagos, células dendríticas, dentre outras. A maioria destes tipos celulares é capaz de sintetizar endocanabinóides no sítio inflamatório, e estas moléculas são capazes de agir de forma autócrina, regulando a atividade destas células na resposta inflamatória (CROXFORD & YAMAMURA, 2005; KLEIN, 2005; SUGIURA *et al*, 2004).

Em nossa estratégia experimental, é plausível sugerir que o bloqueio tanto dos receptores CB₁ quanto dos receptores CB₂ levaria à ruptura da interação entre endocanabinóides no sítio inflamatório, no caso, a matriz esponjosa, uma vez que todos os tipos celulares ali presentes são passíveis de terem suas respostas moduladas por esta classe de moléculas (KLEIN, 2005; PIOMELLI, 2003). O receptor CB₁ já foi reconhecido na periferia, principalmente em terminações nervosas, já o receptor CB₂ é abundante tanto no endotélio vascular quanto em células do sistema imune, notadamente - e de nosso interesse - em macrófagos e neutrófilos (AMAYA *et al*, 2006; KLEIN, 2005; KELLY *et al*, 2003).

Os endocanabinóides, através da ativação do receptor CB₂, poderiam estimular vias relacionadas ao recrutamento celular e à mobilização do citoesqueleto, como a AKT/PI3K (SELVATICI *et al*, 2006). Uma vez que em nosso modelo experimental o recrutamento neutrofílico e a consequente produção local de mediadores inflamatórios por este tipo celular, como as quimiocinas CXCL1-3/KC, a citocina TNF- α e o fator de crescimento VEGF, todos importantes reguladores da angiogênese inflamatória, é plausível sugerir que o bloqueio dos receptores CB₂ geraria uma resposta da forma supracitada, por inibição da ligação de endocanabinóides. É também descrito que a ativação de CB₂ por mediadores endógenos é capaz de levar à ativação da via MAP quinase (p42/44 MAP quinase) dependente de PKC, e a MEK, o que levaria à transcrição, por exemplo, de moléculas pró-inflamatórias (BOUABOULA *et al*, 1996). Todos os fenômenos supracitados foram capazes de serem revertidos após administração de antagonista seletivo para CB₂ nestes modelos experimentais.

A sinalização mediada pela ativação CB₁ difere em alguns aspectos daquela mediada por CB₂. A ativação de CB₁, acoplado a proteína G_s, pode levar ao acúmulo

considerável de AMPc em células inflamatórias, assim como modular a atividade de canais de K⁺ sensíveis a ATP e também canais Ca²⁺, diferentemente dos receptores CB₂, fenômenos estes relacionados a um perfil anti-inflamatório em diversos modelos experimentais, seja influenciando no recrutamento celular para o sítio inflamatório, seja pela influência na liberação de mediadores inflamatório no local (como a relação acúmulo de AMPc *versus* menor produção de TNF- α e outros mediadores). Já foi relatado também que a anandamida é capaz de ativar a PLC através da sua ligação a receptores CB₁, o que, de certa forma, levaria a sua biossíntese através da liberação de NAPE, seu precursor, presente na membrana plasmática de macrófagos e outras células inflamatórias. O PAF, mediador inflamatório lipídico de importância, é capaz de induzir, através da ativação de seu receptor, a biossíntese do 2-AG, criando uma alça sinérgica pró-inflamatória (POMPERMAYER *et al*, 2007; LIU *et al*, 2006; DEMUTH & MOLLEMAN, 2005; BERDYSHEV *et al*, 2001; ESCOFIER *et al*, 1999; CALANDRA *et al*, 1999).

A escolha da dose dos antagonistas a ser administrada sistemicamente foi baseada na literatura (RINALDI-CARMONA *et al*, 1994; 1998), de maneira que não se esperasse um efeito inespecífico do fármaco relacionado à dose de escolha. A escolha da via sistêmica para administração dos fármacos supracitados reflete na abordagem mais coerente quando se tenta estreitar a relação “terapêutica *versus* ciência básica”. Com alta afinidade pelos receptores canabinóides CB₁ e CB₂ em mamíferos, o SR141716A (K_i = 2 nM) e o SR144528 (K_i = 0.04 nM) (valores de K_i para estes receptores em camundongos) não possuem afinidade biologicamente significativa por nenhum outro receptor até então relatado (PERTWEE, 1997). De qualquer forma, a literatura para o intrincado sistema canabinóide, como ele hoje se apresenta, aponta para outros possíveis mecanismos de ação para estes

antagonistas, uma vez que a ativação dos receptores canabinóides, seja por agonistas sintéticos ou mesmo por endocannabinóides, *in vitro* ou *in vivo*, por muito tempo esteve relacionada à modulação negativa da resposta inflamatória, seja pela inibição do recrutamento celular para diversos sítios inflamatório, seja pela inibição da expressão e secreção de diversos mediadores inflamatórios, entre eles citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. A divergência existente na literatura recente, desta forma, aponta para outros mecanismos de ação destes antagonistas. (FELDER *et al*, 2006; KLEIN, 2005; HOWLETT *et al*, 2004; BAKER *et al*, 2003; PERTWEE, 1997).

Alguns estudos demonstram que a administração do SR141716A ou do SR144528 é capaz, por si só, de induzir respostas centrais e periféricas, principalmente sobre a produção de citocinas, de forma quantitativa e qualitativamente similar aos efeitos imunossupressores do HU-210 e do WIN 55,212-2 (ROCHE *et al*, 2006). Efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios do SR141716A já foram descritos (CROCI *et al*, 2003; SMITH *et al*, 2000). Croci *et al* (2003) demonstraram uma diminuição da concentração de TNF- α induzida por LPS em camundongos após tratamento com SR141716A (10 mg/Kg). Smith *et al*. (2000) observaram efeitos similares, fazendo com que estes autores sugerissem um efeito agonista parcial para o SR141716A sobre os receptores CB₁. Roche *et al*. (2006) observaram efeitos similares, tanto no sistema nervoso central como na periferia, onde o SR141716A é capaz, por si só, de levar a uma redução na concentração de citocinas pró-inflamatórias após estímulo com LPS. Pouco se sabe a respeito do potencial efeito “agonista parcial” para o antagonista CB₂ SR144528, mas Smith *et al* (2001) descrevem um efeito similar para o SR144528, após administração

intracerebroventricular do fármaco, uma vez que este contribui para a diminuição dos níveis séricos de IL-12 e TNF- α após estímulo com LPS.

Hurst *et al.* (2002) e Bouaboula *et al.* (1997) descrevem um mecanismo de ação diferenciado para o SR141716, sendo que o fármaco atuaria como agonista inverso no receptor CB₁. Considerando que o receptor CB₁ existiria em algumas conformações e tipos celulares em um estado pré-ativado, acoplado à proteína G_{i/o}, a ligação do antagonista CB₁ levaria a uma inibição da via ERK / MAP quinase, fenômeno que estimularia a inibição da transcrição de diversos fatores pró-inflamatórios por alguns tipos celulares comuns, incluindo a inibição da produção de citocinas e quimiocinas. Hurst *et al.* (2002) demonstram que o SR141716A tem alta afinidade pelo estado R do receptor CB₁, e que esta afinidade é devido a uma ligação do tipo ponte de hidrogênio entre um substituinte C3 do fármaco e um resíduo K3.28 (192), apresentado pelo receptor CB₁ somente quando este está no estado R. De qualquer forma, descartando qualquer mecanismo não-antagonista para o SR141716A ou para o SR144528, e possível também que ao inibir a ligação de endocanabinóides a seus receptores, considerando que estas moléculas apresentariam um perfil pró-inflamatório, os antagonistas estariam mascarando o efeito de endocanabinóides sobre sítios não-cannabinóides, como os receptores vanilóides TRPV1 e os receptores PPAR-gama, uma vez que estas moléculas estariam em concentrações elevadas no sítio inflamatório, não havendo receptores cannabinóides disponíveis para ligação.

Neste caso, por exemplo, a ligação de 2-AG em PPAR-gama levaria a um efeito anti-inflamatório para a molécula (inibição da síntese de IL-2, por exemplo), contribuindo para um efeito anti-inflamatório global e sinérgico se considerarmos um provável efeito agonista inverso, ou agonista parcial, para o antagonista

canabinóide (importante frisar que ao se ligar ao receptor canabinóide ele também exibiria um efeito “antagonista neutro”, competindo com o 2-AG pelo sítio de ligação, e no caso, por maior afinidade, impedindo que o 2-AG se ligue ao receptor canabinóide em questão) (CRISTINO *et al*, 2006; ROCKWELL *et al*, 2006; PERTWEE, 2005).

De forma paradoxal, mas não menos importante, ao avaliarmos de que forma a resposta angiogênica e inflamatória em nosso modelo experimental seria afetada após a ativação tanto do receptor CB₁ como do receptor CB₂, com o agonista misto WIN 55,212-2, observamos efeitos bastante similares àqueles observados para os antagonistas canabinóides. A estratégia de tratamento escolhida, por via sistêmica e local, procurou excluir fatores que pudessem intervir na resposta desejada, uma vez que o agonista é capaz de causar alterações centrais consideráveis, mesmo em baixas doses, assim como efeitos cardiovasculares apreciáveis (DREWS *et al*, 2005; PFITZER *et al*, 2004). Não foi observado nenhum efeito central após a administração local do fármaco, ao contrário do que foi observado para a administração sistêmica, onde há notável efeito central, mesmo que transitório. O efeito central permanece mesmo após os 14 dias de tratamento por via sistêmica, mostrando que o fármaco, pelo menos a nível central, não apresenta aparente tolerância.

O tratamento diário com o WIN 55,212-2 por via sistêmica foi capaz de inibir a angiogênese, como avaliado pelo conteúdo de hemoglobina na matriz esponjosa, tanto no sétimo quanto no décimo quarto dia após implantação. Fenômeno semelhante foi observado para o influxo de neutrófilos, inibido de forma significativa nos dois tempos de avaliação. O influxo de macrófagos também está reduzido no sétimo dia após implantação. Estes resultados estão diretamente relacionados com

a concentração de quimiocinas e citocinas avaliadas na matriz esponjosa, onde observamos inibição significativa da concentração da citocina TNF- α e da quimiocina CXCL1-3/KC (estas duas relacionadas diretamente a ativação e recrutamento neutrofílico, assim como à resposta angiogênica) e também do fator de crescimento VEGF (relacionado diretamente com a estimulação da resposta angiogênica e comumente produzido por neutrófilos sob influência do TNF- α). Não foi observada nenhuma alteração para os níveis de CCL2/JE, sendo que desta forma apontamos o provável envolvimento de outra quimiocina relacionada a mononucleares (ex. CCL3/MIP-1 α).

A análise histológica após tratamento sistêmico com o WIN 55,212-2 apresenta perfil bastante semelhante àquele observado para o tratamento com antagonistas canabinóides. Uma vez que o influxo celular está bastante reduzido, assim como os mediadores envolvidos neste processo (e também a resposta angiogênica consequentemente se encontra prejudicada) a formação do tecido fibrovascular, com a neovascularização e a deposição de fibras colágenas e elementos de matriz, apresenta-se reduzida nos animais tratados com as duas doses do agonista misto.

O tratamento local buscou eliminar qualquer efeito anti-inflamatório mediado por vias centrais, como o eixo HPA (Hipotálamo – Pituitária - Adrenal), importante na liberação de corticosteróides e susceptível à ação de canabinóides (ROCHE *et al*, 2006). A estratégia acabou por revelar resultados bastante semelhantes àqueles observados para o tratamento sistêmico. As concentrações escolhidas foram baseadas em dados experimentais onde não foram observadas lesões teciduais e nenhum tipo de resposta local atípica (OKA *et al*, 2006).

Tanto a resposta angiogênica (em menor extensão), quanto o infiltrado neutrofílico e macrófágico encontram-se reduzidos em ambas as concentrações estudadas. O infiltrado de macrófagos apenas apresenta discreta inibição no sétimo dia de tratamento, efeito este provavelmente relacionado à inibição discreta de fatores quimiotáticos para este tipo celular, incluindo quimiocinas cuja inibição local se torna ineficaz em reter o influxo celular. Para os mediadores TNF- α , VEGF e CXCL1-3/KC os tratamentos se mostram eficazes em manter estas moléculas em baixas concentrações na matriz esponjosa, explicando, da mesma forma pela qual justificamos os dados anteriores para os outros fármacos, o porquê do menor influxo celular, da menor resposta angiogênica e da menor formação de tecido fibrovascular na matriz esponjosa.

O agonista misto WIN 55,212-2 apresenta maior afinidade pelo receptor CB₂ do que pelo receptor CB₁ (SONG *et al*, 1999). O mecanismo pelo qual o agonista misto pode exibir sua atividade anti-inflamatória já é bastante descrito, apesar de não totalmente elucidado. Sinalizando principalmente através de CB₂, o receptor canabinoide mais abundante na periferia, principalmente em células inflamatórias e órgãos linfóides, o WIN 55,212-2 é capaz de reduzir a translocação do fator de transcrição NF κ B, importante para a produção de moléculas pró-inflamatórias com o TNF- α e o CXCL1-3/KC, e também é capaz de inibir a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas induzida por IL-1 em células inflamatórias, assim como inibir o recrutamento de neutrófilos ativados por TNF- α após adição de IL-8 *in vitro* (MORMINA *et al*, 2006; NILSSON *et al*, 2006; CURRAN *et al*, 2005).

Estes mecanismos contribuem tanto para a ativação como para o recrutamento de células inflamatórias para um determinado sítio após estímulo, o que justificaria parte dos resultados apresentados neste trabalho no que diz respeito,

principalmente, à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos e, conseqüentemente, a influência desta inibição sobre o recrutamento celular para a matriz esponjosa e também sobre a redução da neovascularização. Importante frisar novamente que, uma vez no sítio inflamatório, os tipos celulares são capazes de secretar mediadores em momentos distintos, capazes, assim, de atuar em sinergismo, mantendo a progressiva resposta inflamatória que culminará com o desenvolvimento de um sistema de reparo e formação de tecido fibrovascular característico de um processo crônico.

O WIN 55,212-2 é também capaz de influenciar diretamente a resposta angiogênica. A ativação tanto de receptores CB₁ como CB₂ em células tumorais, e também no endotélio vascular, pode levar ao aumento dos níveis intracelulares de ceramida, molécula sinalizadora capaz de, diretamente, inibir a síntese de VEGF por estes tipos celulares, fenômeno mediado pela ativação intracelular de AKT/PI3K, assim como ativar a via de controle de proliferação celular Raf-1 / MEK / ERK (VELASCO *et al*, 2004; 2005; CASANOVA *et al*, 2003). Este perfil de resposta pode variar com o tipo de proteína G acoplado ao receptor canabinóide em questão. Desta forma, através de seu combinado potencial anti-inflamatório e anti-angiogênico, o WIN 55,212-2 é capaz de reduzir o fenômeno global da angiogênese inflamatória no modelo experimental de implante de matriz esponjosa.

De forma importante, convém atestar que, até este ponto, é intrigante notar que a ativação dos receptores canabinóides por um agonista misto pode levar a um perfil de resposta anti-inflamatória / anti-angiogênica assim como o bloqueio destes. Como citado anteriormente, endocanabinóides atuariam neste sistema estimulando a resposta inflamatória, seja pela indução da liberação de mediadores inflamatórios, seja pela influência direta sobre o recrutamento celular, ou até mesmo levando ao

aumento da expressão de mais receptores canabinóides nas células do sistema imune, no endotélio vascular e em órgãos linfóides, construindo toda a arquitetura necessária para o desenvolvimento da resposta inflamatória.

Em alguns modelos experimentais, demonstrou-se que o WIN 55,212-2 é capaz de inibir o recrutamento de células HL-60 induzido pelo endocanabinóide 2-AG (KURIHARA *et al*, 2006). O agonista misto também foi capaz de reduzir a inflamação tópica induzida pelo TPA e pelo 2-AG em orelha de camundongo (OKA *et al*, 2006). O WIN 55,212-2 é capaz de agir como agonista total sobre o receptor CB₂ (SUGIURA *et al*, 2000), e é de certa forma surpreendente que este agonista misto seja capaz, assim como o antagonista SR 144528, de inibir a resposta induzida pelo 2-AG em alguns modelos experimentais. Uma possível explicação para este fenômeno é a ocorrência de uma condição anérgica prolongada, causada pela dessensibilização e subsequente internalização do receptor canabinóide, o que ocorreria após a estimulação com o WIN 55,212-2. Estudos recentes com células HL-60 demonstram o perfil de restauração dos receptores após o estado de anergia induzido pelo WIN 55,212-2, até o momento em que as células se tornam novamente responsivas ao 2-AG. O 2-AG é uma molécula metabolicamente lábil, enquanto o WIN 55,212-2 é uma molécula estável, e, por este motivo, mantém o estado anérgico por tempo prolongado. Esta é uma possível razão pela qual o WIN 55,212-2 poderia interferir na ação de endocanabinóides, como o 2-AG, e se comportar como um antagonista sobre os receptores canabinóides em algumas situações *in vivo*. Considerando o tratamento prolongado com o agonista misto WIN 55,212-2, em doses onde há considerável ativação tanto dos receptores CB₁ quanto CB₂, não podemos excluir a possibilidade deste fármaco estar atuando como um antagonista em função da dessensibilização e internalização dos receptores

canabinóides, onde no final obteríamos uma resposta bastante similar àquela observada para os antagonistas estudados. Assim, os endocanabinóides participariam como mediadores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos neste modelo experimental.

De qualquer forma, ainda é impreciso afirmar qual mediador estaria envolvido nestes perfis de resposta, assim como qual receptor canabinóide seria predominante neste complexo sistema.

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere o claro envolvimento dos receptores canabinóides nos fenômenos de recrutamento celular e produção de mediadores pró-inflamatórios e pró-angiogênicos em um modelo experimental de angiogênese inflamatória. Tanto a ativação quanto o bloqueio destes receptores parece modular negativamente as respostas associadas à inflamação, à neovascularização e à formação de tecido fibrovascular associada. Apesar de não ser possível elucidar qual endocanabinóide, ou mediador molecularmente relacionado, estaria envolvido nestas respostas, assim como qual receptor canabinóide é predominante neste sistema, é coerente apontar que intervenções farmacológicas no sistema endocanabinóide podem revelar um potencial terapêutico apreciável em fisiopatologias de caráter inflamatório e/ou angiogênico.

Apesar da dificuldade em se determinar o mecanismo de ação dos fármacos em estudo, uma vez que a plasticidade do sistema canabinóide permite uma multiplicidade de interações, os resultados apontam para um sistema onde a resposta está sendo mediada por endocanabinóides, e onde o impedimento funcional destes receptores, seja por antagonismo direto, seja por dessensibilização de receptores, parece ser a estratégia farmacológica de escolha para o estudo desta rede de eventos celulares e moleculares.

*PAPEL DOS RECEPTORES CANABINÓIDES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA*

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAI, K.I., LEE, F., MIYAJIMA, A., MIYATAKE, S., ARAI, N. & YOKOTA, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*, **59**, 783-836.
- ABBAS, AK, LICHTMAN, AH, POBER, JS. (2000) Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia: WB. Saunders Company.
- AIKAWA, R., NAWANO, M., GU, Y., KATAGIRI, H., ASANO, T., ZHU, W., NAGAI, R. & KOMURO, I. (2000). Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation*, **102**, 2873-9.
- AMAYA, F., SHIMOSATO, G., KAWASAKI, Y., HASHIMOTO, S., TANAKA, Y., JI, R.R. & TANAKA, M. (2006). Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain*, **124**, 175-83.
- AMBATI, B.K., ANAND, A., JOUSSEN, A.M., KUZIEL, W.A., ADAMIS, A.P. & AMBATI, J. (2003). Sustained inhibition of corneal neovascularization by genetic ablation of CCR5. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 590-3.
- ANDRADE SP, FAN TP, LEWIS GP. (1987) Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. *Br J Exp Pathol*. Dec;**68**(6):755-66.
- ARAI, K.I., LEE, F., MIYAJIMA, A., MIYATAKE, S., ARAI, N. & YOKOTA, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*, **59**, 783-836.
- AUERBACH, R. & AUERBACH, W. (1997). Profound effects on vascular development caused by perturbations during organogenesis. *Am J Pathol*, **151**, 1183-6.
- BAILEY, P.J. (1988). Sponge implants as models. *Methods Enzymol*, **162**, 327-34.
- BAKER, D., PRYCE, G., DAVIES, W.L. & HILEY, C.R. (2006). In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 1-4.
- BAKER, D., PRYCE, G., GIOVANNONI, G. & THOMPSON, A.J. (2003). The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol*, **2**, 291-8.
- BARCELOS, L.S., TALVANI, A., TEIXEIRA, A.S., CASSALI, G.D., ANDRADE, S.P. & TEIXEIRA, M.M. (2004). Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. *Inflammation Research*, **53**, 576-584.

- BARCELOS, L.S., TALVANI, A., TEIXEIRA, A.S., VIEIRA, L.Q., CASSALI, G.D., ANDRADE, S.P. & TEIXEIRA, M.M. (2005). Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, **78**, 352-358.
- BATKAI, S., JARAI, Z., WAGNER, J.A., GOPARAJU, S.K., VARGA, K., LIU, J., WANG, L., MIRSHAHI, F., KHANOLKAR, A.D., MAKRIYANNIS, A., URBASCHEK, R., GARCIA, N., JR., SANYAL, A.J. & KUNOS, G. (2001). Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med*, **7**, 827-32.
- BAYEWITCH, M., RHEE, M.H., AVIDOR-REISS, T., BREUER, A., MECHOULAM, R. & VOGEL, Z. (1996). (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, **271**, 9902-5.
- BECK, L., JR. & D'AMORE, P.A. (1997). Vascular development: cellular and molecular regulation. *Faseb J*, **11**, 365-73.
- BECKER, R.C. (2000). Key references: anticoagulants and coagulation monitoring. *J Thromb Thrombolysis*, **9**, 69-76.
- BELO AV, BARCELOS LS, FERREIRA MA, TEIXEIRA MM, ANDRADE SP. (2004) Inhibition of inflammatory angiogenesis by distant subcutaneous tumor in mice. *Life Sci. Apr 23*;74(23):2827-37.
- BELPERIO, J.A., KEANE, M.P., ARENBERG, D.A., ADDISON, C.L., EHLERT, J.E., BURDICK, M.D. & STRIETER, R.M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, **68**, 1-8.
- BEN-AV, P., CROFFORD, L.J., WILDER, R.L. & HLA, T. (1995). Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, **372**, 83-7.
- BENELLI R, MORINI M, CARROZZINO F, FERRARI N, MINGHELLI S, SANTI L, CASSATELLA M, NOONAN DM, ALBINI A. (2002) Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J. Feb*;16(2):267-9.
- BENITO, C., KIM, W.K., CHAVARRIA, I., HILLARD, C.J., MACKIE, K., TOLON, R.M., WILLIAMS, K. & ROMERO, J. (2005). A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis. *J Neurosci*, **25**, 2530-6.
- BENITO, C., NUNEZ, E., TOLON, R.M., CARRIER, E.J., RABANO, A., HILLARD, C.J. & ROMERO, J. (2003). Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci*, **23**, 11136-41.

- BEN-SHABAT, S., FRIDE, E., SHESKIN, T., TAMIRI, T., RHEE, M.H., VOGEL, Z., BISOGNO, T., DE PETROCELLIS, L., DI MARZO, V. & MECHOULAM, R. (1998). An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol*, **353**, 23-31.
- BERDYSHEV, E.V., SCHMID, P.C., KREBSBACH, R.J. & SCHMID, H.H. (2001). Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *Faseb J*, **15**, 2171-8.
- BISCHOFF, J. (1995). Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol*, **5**, 69-74.
- BISOGNO T, LIGRESTI A, DI MARZO V. (2005) The endocannabinoid signalling system: biochemical aspects. *Pharmacol Biochem Behav*. Jun;**81**(2):224-38.
- BLÀZQUEZ C, CASANOVA ML, PLANAS A, DEL PULGAR TG, VILLANUEVA C, FERNANDEZ-ACENERO MJ, ARAGONES J, HUFFMAN JW, JORCANO JL, GUZMAN M. (2003) Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J*. Mar;**17**(3):529-31.
- BLÀZQUEZ C, GONZALEZ-FERIA L, ALVAREZ L, HARO A, CASANOVA ML, GUZMAN M. (2004) Cannabinoids inhibit the vascular endothelial growth factor pathway in gliomas. *Cancer Res*. Aug 15;**64**(16):5617-23.
- BLEI, F., WILSON, E.L., MIGNATTI, P. & RIFKIN, D.B. (1993). Mechanism of action of angiostatic steroids: suppression of plasminogen activator activity via stimulation of plasminogen activator inhibitor synthesis. *J Cell Physiol*, **155**, 568-78.
- BOUABOULA, M., POINOT-CHAZEL, C., MARCHAND, J., CANAT, X., BOURRIE, B., RINALDI-CARMONA, M., CALANDRA, B., LE FUR, G. & CASELLAS, P. (1996). Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem*, **237**, 704-11.
- BOUABOULA, M., PERRACHON, S., MILLIGAN, L., CANAT, X., RINALDICARMONA, M., PORTIER, M., BARTH, F., CALANDRA, B., PECCEU, F., LUPKER, J., MAFFRAND, J.P., LEFUR, G. & CASELLAS, P. (1997). A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1 - Evidence for a new model of receptor/ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 22330-22339.
- BROOKS, A.R., LELKES, P.I. & RUBANYI, G.M. (2004). Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: relevance for focal susceptibility to atherosclerosis. *Endothelium*, **11**, 45-57.

- BROWDER, T., FOLKMAN, J. & PIRIE-SHEPHERD, S. (2000). The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem*, **275**, 1521-4.
- BUCKLE, D.R. & HEDGECOCK, C.J.R. (1997). Drug targets in inflammation and immunomodulation. *Drug Discovery Today*, **2**, 325-332.
- BUSSOLINO, F., MANTOVANI, A. & PERSICO, G. (1997). Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci*, **22**, 251-6.
- BUTCHER, E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, **67**, 1033-6.
- CALANDRA, B., PORTIER, M., KERNEIS, A., DELPECH, M., CARILLON, C., LE FUR, G., FERRARA, P. & SHIRE, D. (1999). Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol*, **374**, 445-55.
- CAO, Y (2001) Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol*. Apr;**33**(4):357-69.
- CARA, D.C., KAUR, J., FORSTER, M., MCCAFFERTY, D.M. & KUBES, P. (2001). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in chemokine-induced emigration and chemotaxis in vivo. *J Immunol*, **167**, 6552-8.
- CASANOVA ML, BLAZQUEZ C, MARTINEZ-PALACIO J, VILLANUEVA C, FERNANDEZ-ACENERO MJ, HUFFMAN JW, JORCANO JL, GUZMAN M. (2003) Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. Jan;**111**(1):43-50.
- CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, **9**, 653-60.
- CARMELIET, P. & JAIN, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, **407**, 249-57.
- CARMELIET, P., MOONS, L. & COLLEN, D. (1998). Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res*, **39**, 8-33.
- CARROLL, M.C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, **16**, 545-68.
- CHERTOV, O., YANG, D., HOWARD, O.M. & OPPENHEIM, J.J. (2000). Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*, **177**, 68-78.
- CHILDERS, S.R., SEXTON, T. & ROY, M.B. (1994). Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes. *Biochem Pharmacol*, **47**, 711-5.
- CLARK, RAF. (1996) Wound repair. The molecular and cellular biology of wound repair. 2ª edição. Plenum press, pp.3-50.

- CLAVEL, G., BESSIS, N. & BOISSIER, M.C. (2003). Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, **70**, 321-6.
- CLAYTON N, MARSHALL FH, BOUNTRA C, O'SHAUGHNESSY CT. (2002) CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. *Pain*. Apr;**96**(3):253-60.
- COLVILLE-NASH, P.R., ALAM, C.A., APPLETON, I., BROWN, J.R., SEED, M.P. & WILLOUGHBY, D.A. (1995). The pharmacological modulation of angiogenesis in chronic granulomatous inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, **274**, 1463-72.
- CREAMER, D., ALLEN, M.H., SOUSA, A., POSTON, R. & BARKER, J.N. (1997). Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, **136**, 859-65.
- CRISTINO, L., DE PETROCELLIS, L., PRYCE, G., BAKER, D., GUGLIELMOTTI, V. & DI MARZO, V. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, **139**, 1405-15.
- CROCI T, LANDI M, GALZIN AM, MARINI P. (2003) Role of cannabinoid CB1 receptors and tumor necrosis factor-alpha in the gut and systemic anti-inflammatory activity of SR 141716 (rimonabant) in rodents. *Br J Pharmacol*. Sep;**140**(1):115-22.
- CROWTHER M, BROWN NJ, BISHOP ET, LEWIS CE. (2001) Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*. Oct;**70**(4):478-90. Review.
- CURRAN, N.M., GRIFFIN, B.D., O'TOOLE, D., BRADY, K.J., FITZGERALD, S.N. & MOYNAGH, P.N. (2005). The synthetic cannabinoid R(+)-WIN 55,212-2 inhibits the interleukin-1 signaling pathway in human astrocytes in a cannabinoid receptor-independent manner. *J Biol Chem*, **280**, 35797-806.
- D'AMBROSIO, D., IELLEM, A., COLANTONIO, L., CLISSI, B., PARDI, R. & SINIGAGLIA, F. (2000). Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunol Today*, **21**, 183-6.
- D'AMORE, P.A. & SMITH, S.R. (1993). Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. *Growth Factors*, **8**, 61-75.
- DE PETROCELLIS L, MELCK D, BISOGNO T, DI MARZO V. (2000) Endocannabinoids and fatty acid amides in cancer, inflammation and related disorders. *Chem Phys Lipids*. Nov;**108**(1-2):191-209. Review.
- DE PETROCELLIS L, CASCIO MG, DI MARZO V. (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol*. Mar;**141**(5):765-74. Review.

- DEL PULGAR, T., VELASCO, G. & GUZMAN, M. (2000). The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochemical Journal*, **347**, 369-373.
- DEMUTH, D.G. & MOLLEMAN, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sci*, **78**, 549-63.
- DEROCQ, J.M., JBILO, O., BOUABOULA, M., SEGUI, M., CLERE, C. & CASELLAS, P. (2000). Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation. *J Biol Chem*, **275**, 15621-8.
- DEVANE, W.A., DYSARZ, F.A., 3RD, JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S. & HOWLETT, A.C. (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*, **34**, 605-13.
- DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. Dec 18;**258**(5090):1946-9.
- DI FILIPPO C, ROSSI F, ROSSI S, D'AMICO M. (2003) Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury: involvement of cytokine/chemokines and PMN. *J Leukoc Biol*. Mar;**75**(3):453-9.
- DI MARZO, V., BISOGNO, T., DE PETROCELLIS, L., MELCK, D., ORLANDO, P., WAGNER, J.A. & KUNOS, G. (1999). Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem*, **264**, 258-67.
- DI MARZO, V., BISOGNO, T., SUGIURA, T., MELCK, D. & DE PETROCELLIS, L. (1998). The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J*, **331 (Pt 1)**, 15-9.
- DI MARZO, V., FONTANA, A., CADAS, H., SCHINELLI, S., CIMINO, G., SCHWARTZ, J.C. & PIOMELLI, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, **372**, 686-91.
- DRABKIN, D.L., AUSTIN, J.H. (1932) Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constants for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. **98**, p. 719-733
- DREWS, E., SCHNEIDER, M. & KOCH, M. (2005). Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **80**, 145-50.
- DVORAK, H.F., GALLI, S.J. & DVORAK, A.M. (1986). Cellular and vascular manifestations of cell-mediated immunity. *Hum Pathol*, **17**, 122-37.

- ELPHICK, M.R. & EGERTOVA, M. (2005). The phylogenetic distribution and evolutionary origins of endocannabinoid signalling. *Handb Exp Pharmacol*, 283-97.
- ENGELHARDT, E., TOKSOY, A., GOEBELER, M., DEBUS, S., BROCKER, E.B. & GILLITZER, R. (1998). Chemokines IL-8, GROalpha, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. *Am J Pathol*, **153**, 1849-60.
- ESCOFIER, N., BOICHOT, E., GERMAIN, N., SILVA, P.M., MARTINS, M.A. & LAGENTE, V. (1999). Effects of interleukin-10 and modulators of cyclic AMP formation on endotoxin-induced inflammation in rat lung. *Fundam Clin Pharmacol*, **13**, 96-101.
- FACCI, L., DAL TOSO, R., ROMANELLO, S., BURIANI, A., SKAPER, S.D. & LEON, A. (1995). Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 3376-80.
- FAURSCHOU, M. & BORREGAARD, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*, **5**, 1317-27.
- FELDER, C.C., DICKASON-CHESTERFIELD, A.K. & MOORE, S.A. (2006). Cannabinoids biology: the search for new therapeutic targets. *Mol Interv*, **6**, 149-61.
- FELDER, C.C., JOYCE, K.E., BRILEY, E.M., MANSOURI, J., MACKIE, K., BLOND, O., LAI, Y., MA, A.L. & MITCHELL, R.L. (1995). Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol*, **48**, 443-50.
- FOLKMAN, J & HAUDENSCHILD, C. (1980) Angiogenesis in vitro. *Nature*. Dec 11;**288**(5791):551-6.
- FOLKMAN, J & KLAGSBRUN, M. (1987) Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*. Oct 22-28;**329**(6141):671-2.
- FOLKMAN, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. Jan;1(1):27-31.
- FOLKMAN, J. (1998). Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation*, **97**, 1108-10.
- FORD, H.R., HOFFMAN, R.A., WING, E.J., MAGEE, D.M., MCINTYRE, L. & SIMMONS, R.L. (1989). Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg*, **124**, 1422-8.
- FREDERICK, J.L., SHIMANUKI, T. & DIZEREGA, G.S. (1984). Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. *Science*, **224**, 389-90.

- FOX A, BEVAN S. (2005) Therapeutic potential of cannabinoid receptor agonists as analgesic agents. *Expert Opin Investig Drugs*. Jun;14(6):695-703.
- GAONI, Y, MECOULAN, R. (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc*. 86, 1646-1647
- GARCIA-RAMALLO, E., MARQUES, T., PRATS, N., BELETA, J., KUNKEL, S.L. & GODESSART, N. (2002). Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *J Immunol*, **169**, 6467-73.
- GEBREMEDHIN, D., LANGE, A.R., CAMPBELL, W.B., HILLARD, C.J. & HARDER, D.R. (1999). Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol*, **276**, H2085-93.
- GERARD, C.M., MOLLEREAU, C., VASSART, G. & PARMENTIER, M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, **279 (Pt 1)**, 129-34.
- GILL, E.W. (1976). The effects of cannabinoids and other CNS depressants on cell membrane models. *Ann N Y Acad Sci*, **281**, 151-61.
- GILROY DW, LAWRENCE T, PERRETTI M, ROSSI AG. (2004) Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. May;3(5):401-16. Review.
- GRINDLAY JH, WAUGH JM. (1951) Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *AMA Arch Surg*. Sep;63(3):288-97.
- GLASS, M., DRAGUNOW, M. & FAULL, R.L. (1997). Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*, **77**, 299-318.
- GLASS, M. & FELDER, C.C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci*, **17**, 5327-33.
- GOKOH, M., KISHIMOTO, S., OKA, S., METANI, Y. & SUGIURA, T. (2005). 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, enhances the adhesion of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett*, **579**, 6473-8.
- GONSIOREK, W., LUNN, C., FAN, X., NARULA, S., LUNDELL, D. & HIPKIN, R.W. (2000). Endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol*, **57**, 1045-50.

- GRIFFIN, G., FERNANDO, S.R., ROSS, R.A., MCKAY, N.G., ASHFORD, M.L., SHIRE, D., HUFFMAN, J.W., YU, S., LAINTON, J.A. & PERTWEE, R.G. (1997). Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol*, **339**, 53-61.
- GRIFFIOEN, A.W. & MOLEMA, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*, **52**, 237-68.
- GRINDLAY, J.H. & WAUGH, J.M. (1951). Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. *AMA Arch Surg*, **63**, 288-97.
- GRIZZI, F., RUSSO, C., COLOMBO, P., FRANCESCHINI, B., FREZZA, E.E., COBOS, E. & CHIRIVA-INTERNATI, M. (2005). Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. *BMC Cancer*, **5**, 14.
- GUZMAN, M., GALVE-ROPERH, I. & SANCHEZ, C. (2001). Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 19-22.
- HANUS, L., ABU-LAFI, S., FRIDE, E., BREUER, A., VOGEL, Z., SHALEV, D.E., KUSTANOVICH, I. & MECHOULAM, R. (2001). 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3662-5.
- HART S, FISCHER OM, ULLRICH A. (2004) Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res*. Mar 15;64(6):1943-50.
- HENRIET P, BLAVIER L, DECLERCK YA. (1999) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation. *APMIS*. Jan;107(1):111-9.
- HENRY, T.D. (1999). Therapeutic angiogenesis. *Bmj*, **318**, 1536-9.
- HERKENHAM, M., LYNN, A.B., LITTLE, M.D., JOHNSON, M.R., MELVIN, L.S., DE COSTA, B.R. & RICE, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1932-6.
- HILEY, C.R. & FORD, W.R. (2004). Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **79**, 187-205.
- HILEY, C.R. & FORD, W.R. (2004). Cannabinoid pharmacology in the cardiovascular system: potential protective mechanisms through lipid signalling. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **79**, 187-205.

- HO, B.Y., STADNICKA, A., PRATHER, P.L., BUCKLEY, A.R., CURRENT, L.L., BOSNJAK, Z.J. & KWOK, W.M. (2000). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of prolactin release and signaling mechanisms in GH4C1 cells. *Endocrinology*, **141**, 1675-85.
- HOBSON, B. & DENEKAMP, J. (1984). Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*, **49**, 405-13.
- HOEBEN, A., LANDUYT, B., HIGHLEY, M.S., WILDIERS, H., VAN OOSTEROM, A.T. & DE BRUIJN, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*, **56**, 549-80.
- HOWLETT, A.C. & FLEMING, R.M. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, **26**, 532-8.
- HOWLETT, A.C., QUALY, J.M. & KHACHATRIAN, L.L. (1986). Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol*, **29**, 307-13.
- HOWLETT AC, BARTH F, BONNER TI, CABRAL G, CASELLAS P, DEVANE WA, FELDER CC, HERKENHAM M, MACKIE K, MARTIN BR, MECHOULAM R, PERTWEE RG. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*. Jun;**54**(2):161-202. Review.
- HOWLETT AC, BREIVOGEL CS, CHILDERS SR, DEADWYLER SA, HAMPSON RE, PORRINO LJ. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. **47** Suppl 1:345-58. Review.
- HUANG, S.M., BISOGNO, T., TREVISANI, M., AL-HAYANI, A., DE PETROCELLIS, L., FEZZA, F., TOGNETTO, M., PETROS, T.J., KREY, J.F., CHU, C.J., MILLER, J.D., DAVIES, S.N., GEPPEPPI, P., WALKER, J.M. & DI MARZO, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8400-5.
- HURST, D.P., LYNCH, D.L., BARNETT-NORRIS, J., HYATT, S.M., SELTZMAN, H.H., ZHONG, M., SONG, Z.H., NIE, J., LEWIS, D. & REGGIO, P.H. (2002). N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A) interaction with LYS 3.28(192) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB1 receptor. *Mol Pharmacol*, **62**, 1274-87.
- IBRAHIM MM, PORRECA F, LAI J, ALBRECHT PJ, RICE FL, KHODOROVA A, DAVAR G, MAKRIYANNIS A, VANDERAH TW, MATA HP, MALAN TP JR. (2005) CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 22;**102**(8):3093-8.

- IOZZO, R.V. & SAN ANTONIO, J.D. (2001). Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest*, **108**, 349-55.
- IRUELA-ARISPE, M.L. & DVORAK, H.F. (1997). Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb Haemost*, **78**, 672-7.
- JAIN RK, SCHLENGER K, HOCKEL M, YUAN F. (1997) Quantitative angiogenesis assays: progress and problems. *Nat Med*. Nov;**3**(11):1203-8.
- JONASSEN, A.K., SACK, M.N., MJOS, O.D. & YELLON, D.M. (2001). Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res*, **89**, 1191-8.
- KARANIAN, D.A. & BAHR, B.A. (2006). Cannabinoid drugs and enhancement of endocannabinoid responses: strategies for a wide array of disease states. *Curr Mol Med*, **6**, 677-84.
- KELLY, S., JHAVERI, M.D., SAGAR, D.R., KENDALL, D.A. & CHAPMAN, V. (2003). Activation of peripheral cannabinoid CB1 receptors inhibits mechanically evoked responses of spinal neurons in noninflamed rats and rats with hindpaw inflammation. *Eur J Neurosci*, **18**, 2239-43.
- KOLESNICK, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest*, **110**, 3-8.
- KUNOS, G., BATKAI, S., OFFERTALER, L., MO, F., LIU, J., KARCHER, J. & HARVEY-WHITE, J. (2002). The quest for a vascular endothelial cannabinoid receptor. *Chem Phys Lipids*, **121**, 45-56.
- KLEIN TW. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol*. May;**5**(5):400-11. Review.
- KURIHARA, R., TOHYAMA, Y., MATSUSAKA, S., NARUSE, H., KINOSHITA, E., TSUJIOKA, T., KATSUMATA, Y. & YAMAMURA, H. (2006). Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J Biol Chem*, **281**, 12908-18.
- LAGNEUX, C & LAMONTAGNE, D. (2001) Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*. Feb;**132**(4):793-6.
- LEFF, P. (1995). Inverse agonism: theory and practice. *Trends Pharmacol Sci*, **16**, 256.
- LIEKENS, S., DE CLERCQ, E. & NEYTS, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, **61**, 253-70.
- LINGEN, M.W. (2001). Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med*, **125**, 67-71.

- LIU, J., GAO, B., MIRSHAHI, F., SANYAL, A.J., KHANOLKAR, A.D., MAKRIYANNIS, A. & KUNOS, G. (2000). Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J*, **346 Pt 3**, 835-40.
- LIU, J., WANG, L., HARVEY-WHITE, J., OSEI-HYIAMAN, D., RAZDAN, R., GONG, Q., CHAN, A.C., ZHOU, Z., HUANG, B.X., KIM, H.Y. & KUNOS, G. (2006). A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13345-50.
- LYNCH, C.N., WANG, Y.C., LUND, J.K., CHEN, Y.W., LEAL, J.A. & WILEY, S.R. (1999). TWEAK induces angiogenesis and proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem*, **274**, 8455-9.
- LYNN, A.B. & HERKENHAM, M. (1994). Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther*, **268**, 1612-23.
- MADRI, JA & MARX M. (1992) Matrix composition, organization and soluble factors: modulators of microvascular cell differentiation in vitro. *Kidney Int*. Mar;**41**(3):560-5.
- MACCARRONE, M., LORENZON, T., BARI, M., MELINO, G. & FINAZZI-AGRO, A. (2000). Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem*, **275**, 31938-45.
- MAESTRONI, G.J. (2004). The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein. *Faseb J*, **18**, 1914-6.
- MAGOR, BG & MAGOR, KE. (2001) Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Dev Comp Immunol*. 25(8-9):651-82
- MAIER, J.A., MORELLI, D., LAZZERINI, D., MENARD, S., COLNAGHI, M.I. & BALSARI, A. (1999). Inhibition of fibronectin-activated migration of microvascular endothelial cells by interleukin-1alpha, tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. *Cytokine*, **11**, 134-9.
- MANTOVANI A, BUSSOLINO F, INTRONA M. (1997) Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today*. May;**18**(5):231-40.
- MARGOLIUS, H.S. (1995). Theodore Cooper Memorial Lecture. Kallikreins and kinins. Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension*, **26**, 221-9.

- MASSA F, MARSICANO G, HERMANN H, CANNICH A, MONORY K, CRAVATT BF, FERRI GL, SIBAEV A, STORR M, LUTZ B. (2004) The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest.* Apr;**113**(8):1202-9.
- MATSUDA LA, LOLAIT SJ, BROWNSTEIN MJ, YOUNG AC, BONNER TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* Aug 9;**346**(6284):561-4.
- MCINTYRE, T.M., MODUR, V., PRESCOTT, S.M. & ZIMMERMAN, G.A. (1997). Molecular mechanisms of early inflammation. *Thrombosis and Haemostasis*, **78**, 302-305.
- MCMILLAN, R.M., HASSELBACHER, P., HAHN, J.L. & HARRIS, E.D., JR. (1981). Interactions of murine macrophages with monosodium urate crystals: stimulation of lysosomal enzyme release and prostaglandin synthesis. *J Rheumatol*, **8**, 555-62.
- MCPARTLAND, J., DI MARZO, V., DE PETROCELLIS, L., MERCER, A. & GLASS, M. (2001). Cannabinoid receptors are absent in insects. *J Comp Neurol*, **436**, 423-9.
- MECHOULAM R, BEN-SHABAT S, HANUS L, LIGUMSKY M, KAMINSKI NE, SCHATZ AR, GOPHER A, ALMOG S, MARTIN BR, COMPTON DR, *et al.* (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol.* Jun 29;**50**(1):83-90.
- MECHOULAM, R., FRIDE, E. & DI MARZO, V. (1998). Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol*, **359**, 1-18.
- MELVIN, L.S. & JOHNSON, M.R. (1987). Structure-activity relationships of tricyclic and nonclassical bicyclic cannabinoids. *NIDA Res Monogr*, **79**, 31-47.
- MORMINA, M.E., THAKUR, S., MOLLEMAN, A., WHELAN, C.J. & BAYDOUN, A.R. (2006). Cannabinoid signalling in TNF-alpha induced IL-8 release. *Eur J Pharmacol*, **540**, 183-90.
- MOSES, M.A. (1997). The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells*, **15**, 180-9.
- MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* Sep 2;**365**(6441):61-5.
- MUTHIAN S, RADEMACHER DJ, ROELKE CT, GROSS GJ, HILLARD CJ. (2004) Anandamide content is increased and CB1 cannabinoid receptor blockade is protective during transient, focal cerebral ischemia. *Neuroscience.* **129**(3):743-50.

- NATHAN, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, **420**, 846-52.
- NILSSON, O., FOWLER, C.J. & JACOBSSON, S.O. (2006). The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 inhibits TNF-alpha-induced neutrophil transmigration across ECV304 cells. *Eur J Pharmacol*, **547**, 165-73.
- NISSEN C, TICHELLI A, GRATWOHL A, SPECK B, MILNE A, GORDON-SMITH EC, SCHAEDELIN, J. (1988) Failure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in aplastic anemia patients with very severe neutropenia. *Blood*. Dec;**72**(6):2045-7
- OKA, S., IKEDA, S., KISHIMOTO, S., GOKOH, M., YANAGIMOTO, S., WAKU, K. & SUGIURA, T. (2004). 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J Leukoc Biol*, **76**, 1002-9.
- OKA, S., YANAGIMOTO, S., IKEDA, S., GOKOH, M., KISHIMOTO, S., WAKU, K., ISHIMA, Y. & SUGIURA, T. (2005). Evidence for the involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation in mouse ear. *J Biol Chem*, **280**, 18488-97.
- OKAMOTO, Y., MORISHITA, J., TSUBOI, K., TONAI, T. & UEDA, N. (2004). Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem*, **279**, 5298-305.
- PACHECO, M.A., WARD, S.J. & CHILDERS, S.R. (1993). Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells. *Brain Res*, **603**, 102-10.
- PAPETTI, M. & HERMAN, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C947-70.
- PAPETTI, M. & HERMAN, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282**, C947-70.
- PEREZ-ATAYDE, A.R., SALLAN, S.E., TEDROW, U., CONNORS, S., ALLRED, E. & FOLKMAN, J. (1997). Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*, **150**, 815-21.
- PERTWEE, R.G. (2005). Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci*, **76**, 1307-24.
- PERTWEE, R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther*, **74**, 129-80.
- PETERS-GOLDEN, M. (2004). The alveolar macrophage: the forgotten cell in asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **31**, 3-7.

- PFITZER, T., NIEDERHOFFER, N. & SZABO, B. (2004). Central effects of the cannabinoid receptor agonist WIN55212-2 on respiratory and cardiovascular regulation in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol*, **142**, 943-52.
- PIOMELLI, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 873-84.
- PIOMELLI, D., BELTRAMO, M., GIUFFRIDA, A. & STELLA, N. (1998). Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis*, **5**, 462-73.
- PIOMELLI D. (2005) The endocannabinoid system: a drug discovery perspective. *Curr Opin Investig Drugs*. Jul;**6**(7):672-9.
- POMPERMAYER, K., AMARAL, F.A., FAGUNDES, C.T., VIEIRA, A.T., CUNHA, F.Q., TEIXEIRA, M.M. & SOUZA, D.G. (2007). Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, **556**, 215-22.
- PORTELLA G, LAEZZA C, LACCETTI P, DE PETROCELLIS L, DI MARZO V, BIFULCO M. (2003) Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis. *FASEB J*. 2003 Sep;**17**(12):1771-3.
- PORTER, A.C., SAUER, J.M., KNIERMAN, M.D., BECKER, G.W., BERNA, M.J., BAO, J., NOMIKOS, G.G., CARTER, P., BYMASTER, F.P., LEESE, A.B. & FELDER, C.C. (2002). Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **301**, 1020-4.
- RAYMAN, N., LAM, K.H., LAMAN, J.D., SIMONS, P.J., LOWENBERG, B., SONNEVELD, P. & DELWEL, R. (2004). Distinct expression profiles of the peripheral cannabinoid receptor in lymphoid tissues depending on receptor activation status. *J Immunol*, **172**, 2111-7.
- RHEE, M.H., BAYEWITCH, M., AVIDOR-REISS, T., LEVY, R. & VOGEL, Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem*, **71**, 1525-34.
- RINALDI-CARMONA, M., BARTH, F., HEAULME, M., SHIRE, D., CALANDRA, B., CONGY, C., MARTINEZ, S., MARUANI, J., NELIAT, G., CAPUT, D. & ET AL. (1994). SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett*, **350**, 240-4.
- RINALDI-CARMONA, M., BARTH, F., MILLAN, J., DEROCQ, J.M., CASELLAS, P., CONGY, C., OUSTRIC, D., SARRAN, M., BOUABOULA, M., CALANDRA, B., PORTIER, M., SHIRE, D., BRELIERE, J.C. & LE FUR, G.L. (1998). SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **284**, 644-50.

- ROCHE, M., DIAMOND, M., KELLY, J.P. & FINN, D.P. (2006). In vivo modulation of LPS-induced alterations in brain and peripheral cytokines and HPA axis activity by cannabinoids. *J Neuroimmunol*, **181**, 57-67.
- ROCKWELL, C.E., SNIDER, N.T., THOMPSON, J.T., VANDEN HEUVEL, J.P. & KAMINSKI, N.E. (2006). Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Mol Pharmacol*, **70**, 101-11.
- ROESEL, J.F. & NANNEY, L.B. (1995). Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res*, **58**, 449-59.
- ROMAGNANI, P., LASAGNI, L., ANNUNZIATO, F., SERIO, M. & ROMAGNANI, S. (2004). CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*, **25**, 201-9.
- ROSENKILDE MM, SCHWARTZ TW. (2004) The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS*. 2004 Jul-Aug;**112**(7-8):481-95. Review.
- RUBOVITCH V, GAFNI M, SARNE Y. (2004) The involvement of VEGF receptors and MAPK in the cannabinoid potentiation of Ca²⁺ flux into N18TG2 neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*. Jan 5;**120**(2):138-44.
- RUDERMAN, N.B., WILLIAMSON, J.R. & BROWNLEE, M. (1992). Glucose and diabetic vascular disease. *Faseb J*, **6**, 2905-14.
- SALIO, C., FISCHER, J., FRANZONI, M.F., MACKIE, K., KANEKO, T. & CONRATH, M. (2001). CB1-cannabinoid and mu-opioid receptor co-localization on postsynaptic target in the rat dorsal horn. *Neuroreport*, **12**, 3689-92.
- SANCHEZ, C., RUEDA, D., SEGUI, B., GALVE-ROPERH, I., LEVADE, T. & GUZMAN, M. (2001). The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein fan. *Mol Pharmacol*, **59**, 955-9.
- SARFARAZ S, AFAQ F, ADHAMI VM, MUKHTAR H. (2005) Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*. Mar 1;**65**(5):1635-41.
- SCHLINGEMANN, R.O., RIETVELD, F.J., KWASPEN, F., VAN DE KERKHOF, P.C., DE WAAL, R.M. & RUITER, D.J. (1991). Differential expression of markers for endothelial cells, pericytes, and basal lamina in the microvasculature of tumors and granulation tissue. *Am J Pathol*, **138**, 1335-47.

- SCHWENTKER, A., VODOVOTZ, Y., WELLER, R. & BILLIAR, T.R. (2002). Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*, **7**, 1-10.
- SELVATICI, R., FALZARANO, S., MOLLIKA, A. & SPISANI, S. (2006). Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol*, **534**, 1-11.
- SERHAN, C.N., HAEGGSTROM, J.Z. & LESLIE, C.C. (1996). Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. *Faseb J*, **10**, 1147-58.
- SHIRE, D., CARILLON, C., KAGHAD, M., CALANDRA, B., RINALDI-CARMONA, M., LE FUR, G., CAPUT, D. & FERRARA, P. (1995). An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem*, **270**, 3726-31.
- SKAPER, S.D., BURIANI, A., DAL TOSO, R., PETRELLI, L., ROMANELLO, S., FACCI, L. & LEON, A. (1996). The ALIamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3984-9.
- SMITH SR, TERMINELLI C, DENHARDT G. (2000) Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. Apr;**293**(1):136-50.
- SMITH SR, DENHARDT G, TERMINELLI C. (2001) The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. *Eur J Pharmacol*. Nov 30;**432**(1):107-19.
- SONG, Z.H., SLOWEY, C.A., HURST, D.P. & REGGIO, P.H. (1999). The difference between the CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors at position 5.46 is crucial for the selectivity of WIN55212-2 for CB(2). *Mol Pharmacol*, **56**, 834-40.
- STEFFENS S, VEILLARD NR, ARNAUD C, PELLI G, BURGER F, STAUB C, KARSAK M, ZIMMER A, FROSSARD JL, MACH F. (2005) Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature*. Apr 7;**434**(7034):782-6.
- STETLER-STEVENSON, W.G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*, **103**, 1237-41.
- STORGARD, C.M., STUPACK, D.G., JONCZYK, A., GOODMAN, S.L., FOX, R.I. & CHERESH, D.A. (1999). Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J Clin Invest*, **103**, 47-54.
- SUMPIO, B.E., RILEY, J.T. & DARDIK, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1508-12.

- SUGIURA, T., KONDO, S., KISHIMOTO, S., MIYASHITA, T., NAKANE, S., KODAKA, T., SUHARA, Y., TAKAYAMA, H. & WAKU, K. (2000). Evidence that 2-arachidonoylglycerol but not N-palmitoylethanolamine or anandamide is the physiological ligand for the cannabinoid CB2 receptor. Comparison of the agonistic activities of various cannabinoid receptor ligands in HL-60 cells. *J Biol Chem*, **275**, 605-12.
- SUGIURA, T., OKA, S., GOKOH, M., KISHIMOTO, S. & WAKU, K. (2004). New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation. *J Pharmacol Sci*, **96**, 367-75.
- TARABOLETTI, G. & MARGOSIO, B. (2001). Antiangiogenic and antivasular therapy for cancer. *Curr Opin Pharmacol*, **1**, 378-84.
- THEILGAARD-MONCH, K., KNUDSEN, S., FOLLIN, P. & BORREGAARD, N. (2004). The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol*, **172**, 7684-93.
- VAN HINSBERGH, V.W. (2001). The endothelium: vascular control of haemostasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **95**, 198-201.
- VAN SICKLE, M.D., DUNCAN, M., KINGSLEY, P.J., MOUIHATE, A., URBANI, P., MACKIE, K., STELLA, N., MAKRIYANNIS, A., PIOMELLI, D., DAVISON, J.S., MARNETT, L.J., DI MARZO, V., PITTMAN, Q.J., PATEL, K.D. & SHARKEY, K.A. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, **310**, 329-32.
- VASQUEZ, C. & LEWIS, D.L. (1999). The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors. *J Neurosci*, **19**, 9271-80.
- VELASCO, G., GALVE-ROPERH, I., SANCHEZ, C., BLAZQUEZ, C. & GUZMAN, M. (2004). Hypothesis: cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology*, **47**, 315-323.
- VELASCO, G., GALVE-ROPERH, I., SANCHEZ, C., BLAZQUEZ, C., HARO, A. & GUZMAN, M. (2005). Cannabinoids and ceramide: two lipids acting hand-by-hand. *Life Sci*, **77**, 1723-31.
- VLAHAKIS, S.R., VILLASIS-KEEVER, A., GOMEZ, T., VANEGAS, M., VLAHAKIS, N. & PAYA, C.V. (2002). G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J Immunol*, **169**, 5546-54.
- WALSH, D.A. & PEARSON, C.I. (2001). Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases. *Arthritis Res*, **3**, 147-53.
- WARD, S.J., BAIZMAN, E., BELL, M., CHILDERS, S., D'AMBRA, T., EISSENSTAT, M., ESTEP, K., HAYCOCK, D., HOWLETT, A., LUTTINGER, D. & ET AL. (1990). Aminoalkylindoles (AAls): a new route to the cannabinoid receptor? *NIDA Res Monogr*, **105**, 425-6.

- WEISS, S.J. (1989). Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, **320**, 365-76.
- WEYRICH, A.S., LINDEMANN, S. & ZIMMERMAN, G.A. (2003). The evolving role of platelets in inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **1**, 1897-1905.
- WHALEN, GF & ZETTER, BR. (1992) Angiogenesis. Wound: Biochemical and clinical aspects. 1ª edição. Saunders company, pp. 77-95
- WILSON, R.I. & NICOLL, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, **296**, 678-82.
- WITTE, M.B. & BARBUL, A. (1997). General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*, **77**, 509-28.
- ZURIER RB. (2003) Prospects for cannabinoids as anti-inflammatory agents. *J Cell Biochem*. Feb 15;**88**(3):462-6. Review.