

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARADO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DOS
EXTRATOS DE *CANNABIS SATIVA* RICO EM THC E CBD EM CÉLULAS DE
CARCINOMA PROSTÁTICO CANINO E HUMANO

LUÍS GUSTAVO RAMOS DE MORAES CALHEIROS

Botucatu – SP
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARADO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DOS
EXTRATOS DE *CANNABIS SATIVA* RICO EM THC E CBD EM CÉLULAS DE
CARCINOMA PROSTÁTICO CANINO E HUMANO

LUÍS GUSTAVO RAMOS DE MORAES CALHEIROS

Dissertação apresentada
junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina
Veterinária como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Titular
Renée Laufer Amorim

Nome do Autor: Luís
Gustavo Ramos de Moraes
Calheiros

Botucatu – SP
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Calheiros, Luís Gustavo Ramos de Moraes.

Estudo comparado dos efeitos antitumorais dos extratos de *Cannabis sativa* rico em THC e CBD em células de carcinoma prostático canino e humano / Luís Gustavo Ramos de Moraes Calheiros. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Renée Laufer Amorim

Capes: 50503006

1. Cães - Doenças. 2. Próstata - Câncer. 3. Canabinóides.
4. Medicamento fitoterápico. 5. Maconha. 6. *Cannabis*.
7. Antineoplásicos.

Palavras-chave: Canabinoide; Câncer de próstata;
Fitoterápico.

ESTUDO COMPARADO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DOS
EXTRATOS DE *CANNABIS SATIVA* RICO EM THC E CBD EM CÉLULAS DE
CARCINOMA PROSTÁTICO CANINO E HUMANO

Comissão examinadora:

Profª Drª Renée Laufer Amorim Orientadora - Departamento de Clínica
Veterinária - FMVZ – UNESP – Botucatu – São Paulo

Presidente e orientadora

Profª Drª Flávia Karina Delella – Instituto de Biociências - UNESP –
Botucatu – São Paulo

Membro banca

Profº Drº Enio Ferreira - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG – Minas
Gerais

Membro banca

Data da defesa: 23/06/2023

“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos olhos daqueles que não sabem voar.”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde, paciência e entendimento das situações adversas, sempre acreditando que tudo isso é para um bem maior.

Agradeço a minha família que mesmo distante sempre foram meu porto seguro. Aos meus pais Maria e Genival, minha irmã Larissa, por todo apoio, amor, e segurança que me propuseram para que eu pudesse me graduar apenas me preocupando com o estudo. Aos meus cães Biu e Thor que trazem alegria, vitalidade e companheirismo. Agradeço a minha companheira Rayane por toda cumplicidade, amor e amizade, por ter sido minha base, por sempre acreditar em mim e no meu sucesso, por sua companhia em Botucatu e por todo o amor durante todos esses anos.

Agradeço a minha orientadora professora Renée Laufer Amorim, por toda atenção, confiança e orientação, por estar sempre e disposta a resolver qualquer situação. Agradeço também pela oportunidade que me foi dada, e por ter aceitado o desafio de me orientar, obrigado pelo aceite e por me melhorar como pessoa e como profissional.

Agradeço a toda equipe do laboratório de pesquisa celular avançada, Beatriz, Lucas, Thayná, Alexandre, Mayara, Vinicius, Paulo e Natiely, por todo apoio, ajuda no experimento, compartilhar suas vitórias e também frustrações diárias, sempre estando dispostos a ajudar em situações adversas.

Agradeço aos meus amigos André e Neusvaldo Júnior por toda a amizade, parceria e apoio, vocês são pessoas muito importantes na minha vida profissional e pessoal, obrigado por tudo.

Agradeço a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia por ter disponibilizado a estrutura necessária para a realização deste projeto de pesquisa, bem como seus setores que ajudaram a realizar esta pesquisa com o apoio técnico e teórico sempre que necessário.

Agradeço à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo por ter outorgado o processo nº 2021/01181-5, o qual possibilitou a minha vinda a São Paulo, manutenção do bolsa e contribuiu com a execução desta pesquisa durante todo o período.

Agradeço aos professores compositores da minha banca da minha qualificação e defesa, por auxiliarem com suas ideias e visões, por compartilharem de seus conhecimentos e acrescentar melhorias ao trabalho.

CALHEIROS, L. G. R. M. **Estudo comparado dos efeitos antitumorais dos extratos de *Cannabis sativa* rico em thc e cbd em células de carcinoma prostático canino e humano.** Botucatu, 2023. 75 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O carcinoma de próstata é o segundo tipo de neoplasia maligna mais comum entre os homens no Brasil, e relatado em cães entre 8 a 10 anos de idade, com rápida evolução podendo metastatizar para linfonodos regionais, pulmões e ossos. O CBD já foi relatado na literatura como agente antineoplásico em modelos *in vitro* de neoplasias do homem e do cão. Nós investigamos o efeito citotóxico dos extratos de dois extratos de *Cannabis sativa*, um rico em CBD (ERCBD) e outro rico em THC (ERTHC), em linhagens de células de carcinoma prostático canino (PC1 e PC2) e humano (LNCAP), bem como sua avaliação para a indução a apoptose de células cancerígenas. Para avaliação da citotoxicidade foi o utilizado o ensaio de MTT, com as doses 2,5µM, 5µM, 7,5µM e 10µM de ambos os compostos nas linhagens caninas e 10µM, 20µM, 30µM e 40µM de ambos os compostos na linhagem humana, As linhagens foram incubadas por 24 horas, em placas de 96 poços em condições de cultura *in vitro* padrão. Após esse período determinou-se o IC50 através da atividade metabólica das células. Logo após foi realizado o ensaio da Anexina-V-FITC/ Iodeto de propídio nas linhagens caninas, avaliando através da citometria de fluxo as células com apoptose mediata e tardia. Com os resultados obtidosobtiveram uma concentração inibitória média de ERCBD (3,437; 3,577) e ERTHC (4,909;4,486) em PC1 e PC2 respectivamente, e ERCBD (21,49) e ERTHC (18,69) na linhagem LNCAP. Ainda, foi realizado ensaio de apoptose nas linhagens de carcinoma prostático canino, após o tratamento. Mais estudos devem ser feitos, para avaliar o mecanismo de morte celular e seu potencial de uso *in vivo*.

Palavras chave: fitoterápico; câncer de próstata; canabinoide;

CALHEIROS, L. G. R. M. **Comparative study of the antitumor effects of extracts of *Cannabis sativa* rich in thc and cbd in canine and human prostatic carcinoma cells.** Botucatu, 2023. 75 p. Dissertation (Master's) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Prostate carcinoma is the second most common type of cancer among men in Brazil, and is reported in dogs between 8 and 10 years of age, with rapid evolution and metastatic potential to regional lymph nodes, lungs and bones. CBH and THC showed an anti-tumoral effect in human and canine cell lines. We investigated the cytotoxic effect of extracts from two *Cannabis sativa* extracts, one rich in CBD (ERCBD) and the other rich in THC (ERTHC), on malignant prostatic cell lines from dogs (PC1 and PC2) and men (LNCAP), as well as the effect evaluation for the induction of apoptosis in the two canine cell lines. To evaluate the cytotoxicity, the MTT assay was used, with doses of 2.5µM, 5µM, 7.5µM and 10µM of both compounds in the canine cells line and 10µM, 20µM, 30µM and 40µM of both compounds in the human cell line. Both were incubated for 24 hours in 96-well plates. The IC50 was determined through the metabolic activity of the cells. Soon after, the Annexin-V-FITC/propidium iodide assay was performed in the canine PC cell lines, evaluating cells with mediate and late apoptosis through flow cytometry. We showed that ERCBD and ERTHC obtained an average inhibitory concentration of 3.437; 3.577 and 4.909;4.486 in PC1 and PC2 respectively, and ERCBD (21.49) and ERTHC (18 ,69) in the LNCAP cell line. , We also observed an apoptotic effect on the canine cell lines for both cannabis extracts. Further research should be made to evaluate the cell death mechanism as well as the in vitro use as an anti neoplastic agent.

Keywords: herbal medicine; prostate cancer; cannabinoid;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização anatômica prostática canina. Fonte: https://hospital.vetmed.wsu.edu/2022/01/04/cat-and-dog-anatomy/	19
Figura 2	Localização anatômica prostática humana. Fonte: https://www.todamateria.com.br/prostata/	19
Figura 3	Constituição histológica da próstata. Fonte: https://www.sanarmed.com/cancer-de-prostata	20
Figura 4	Fotomicrografia próstata canina. A) Histomorfologia normal. Epitélio com uma única camada de células cúbicas e colunares, sustentado por delicado estroma fibrovascular. B) PIA discreta. Ácinos atróficos e células inflamatórias intersticiais esparsas. C) PIA moderada. Atrofia acinar e agregados de células mononucleares. D) PIA acentuada. Predominância de linfócitos intersticiais dispostos em folículos. HE. Fonte: TOLEDO et al. (2010).....	21
Figura 5	1. Nesta visão de menor aumento da neoplasia intraepitelial prostática humana há um aglomerado de estruturas glandulares com células hipercromáticas contrastando com as glândulas normais adjacentes (hematoxilina-eosina, objetiva 4X). 2. PIN Observa-se estratificação nuclear, aumento nuclear e presença de nucléolos proeminentes na maioria das células (hematoxilina-eosina, objetiva 40X). 3. Esta biópsia mostra envolvimento parcial de uma glândula por PIN (hematoxilina-eosina, objetiva 10X). Fonte: AYALA (2007).	22
Figura 6	Diagrama esquemático do sistema de graduação de Gleason modificado. Em comparação com o sistema convencional, a maioria dos padrões cribriformes e também as glândulas mal definidas estão incluídas no padrão 4. Fonte: (PALMIERE; GRIECO, 2015).....	25
Figura 7	Cannabis sativa. Fonte: https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/canabinoides	33
Figura 8	Fórmula estrutural do Canabidiol. Fonte: https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/canabinoides	34
Figura 9	Fórmula estrutural do Tetra-hidrocanabinol. Fonte: https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/canabinoides	34
Figura 10	Representação esquemática do Sistema Endocanabinóide. A anandamida (AEA) é sintetizada pelas enzimas N-acetiltransferase (NAT) e uma fosfolipase específica (“arachidonoylphosphatidylethanolamine-phospholipase D”;	

NAPE-PLD). O 2-araquidonoilglicerol (2-AG) é sintetizado através de uma outra lipase (“diacylglycerol lipase”; DAGL). Uma vez sintetizados a AEA e o 2-AG ligam-se ao transportador membranar dos endocanabinóides (EMT) ficando disponíveis para atuar nos recetores canabinóides. O transportador remove rapidamente estes compostos sendo a AEA degradada por uma hidrólase das amidas dos ácidos gordos (“fatty acid amide hydrolase”; FAAH) resultando ácido araquidónico (AA) e etanolamina (EtNH₂), enquanto o 2 - AG é degradado pela FAAH ou por uma lipase de gliceróis (“monoacylglycerol lipase”; MAGL) a AA e glicerol. Um mecanismo alternativo é mediado pela ciclooxygenase-2 (COX-2) que converte a AEA a prostilandinaetanolaminas. Fonte: FONSECA et al. (2013). 35

Figura 11 Esquema representativo da distribuição dos receptores canabinóides CB1 e CB2 e das funções fisiológicas que os mesmos exercem no organismo. Adaptação. Fonte: CARDOSO (2019). 36

Figure 1 Fotomicrografia celular da linhagem carcinoma prostático canino PC1 (A) e PC2 (B) 100x; Fotomicrografia celular da linhagem carcinoma prostático LNCAP (C), 100x. 52

Figure 2 Viabilidade celular das linhagens PC1 (A e D), PC2 (B e E) e LNCAP (C e F) de carcinoma de próstata canino e humano. Curva de regressão não-linear e definição da IC₅₀, comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em CBD. O teste t de Student foi usado para comparar dois grupos; ANOVA com teste estatístico de kruskal-wallis de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar cinco grupos. *p < 0,05; **p < 0,01; **** p < 0,0001. 48

Figure 3 Viabilidade celular das linhagens PC1 (A e D), PC2 (B e E) e LNCAP (C e F) de carcinoma de próstata canino e humano. Curva de regressão não-linear e definição da IC₅₀, comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em THC. O teste t de Student foi usado para comparar dois grupos; ANOVA com teste estatístico de kruskal-wallis de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar cinco grupos. *p < 0,05; **p < 0,01; **** p < 0,0001. 49

Figure 4 Ensaio de apoptose por Anexina V/Fitc e iodeto de propídio da linhagem PC1 de carcinoma de próstata canino. Comparação das doses de IC₅₀ (ERCBD e ERTHC), Controle (DMEM), Veículo (DMSO), comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em THC. O teste t de Student foi usado

para comparar os quatro grupos, com base no grupo controle; ANOVA com teste estatístico de kruskall-wallis de comparações múltiplas foi usado para comparar quatro grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 51

Figure 5 Ensaio de apoptose por Anexina V/Fitc e iodeto de propídio da linhagem PC2 de carcinoma de próstata canino. Comparação das doses de IC50 (ERCBd e ERTHC), Controle (DMEM), Veículo (DMSO), comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em THC. O teste t de Student foi usado para comparar os quatro grupos, com base no grupo controle; ANOVA com teste estatístico de kruskall-wallis de comparações múltiplas foi usado para comparar quatro grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação histológica de acordo com o escore de Gleason adaptado de HUMPREY (2004).	24
Tabela 2 Os padrões arquitetônicos em próstata canina, de acordo com o sistema de graduação Gleason modificado.....	24
Tabela 3 Classificação do sistema TNM para câncer de próstata humano.....	26

LISTA DE ABREVIACÕES

µL - Microlitro

µM – Micro molar

CB 1 – Receptor Canabinóide do tipo 1

CB 2 – Receptor Canabinóide do tipo 2

CBD – Canabidiol

CO² - Dióxido de carbono

CP – Câncer de próstata

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

ERCBD – Extrato rico em CBD

ERTHC – Extrato rico em THC

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

INCA – Instituto nacional do câncer

RT-PCR – PCR em tempo real

SP – São Paulo

THC – Δ-9-Tetrahydrocannabinol

UNESP – Universidade Estadual Paulista

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Exame sorológico negativo de mycoplasma sp., nos sobrenadantes das células do projeto;

Anexo 2 – Relatório da análise de cromatografia líquida de alta eficiência, do extrato rico em CBD.

Anexo 3 – Relatório da análise de cromatografia líquida de alta eficiência, do extrato rico em THC.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO I	16
INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA.....	18
Próstata	18
Hiperplasia prostática	20
Atrofia inflamatória proliferativa.....	21
Neoplasia intraepitelial prostática.....	22
Classificação histológica do carcinoma prostático.....	23
Diagnóstico do câncer de próstata canino	27
Tratamento	27
Marcadores tumorais	28
Cannabis sativa	33
OBJETIVOS	38
OBJETIVOS GERAIS	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
*REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO II	47
RESUMO	48
ABSTRACT	49
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS:.....	51
Linhagens celulares e cultura celular	51
Obtenção dos extratos.....	52
Tratamento e avaliação da atividade metabólica celular	52
Ensaio anexina V-fitc/iodeto de propídeo.....	53
RESULTADOS	54
Tratamento e avaliação da atividade metabólica celular por MTT e determinação de IC50 após tratamentos.....	54
Ensaio anexina V-fitc/iodeto de propídeo para tratamento das linhagens PC1 e PC2.....	50

DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO.....	54
CAPÍTULO III	55
*REFERÊNCIAS.....	57

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o câncer com maior prevalência entre os homens no mundo ocidental e houve um aumento significativo nos últimos anos, sendo a segunda maior causa de morte (SIEGEL *et al.*, 2020). Para o Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, sendo 72 mil cânceres de próstata, na região sudeste 77,89 diagnósticos são realizados a cada 100 mil homens (INCA, 2023).

O carcinoma prostático canino acomete animais entre 8 e 10 anos de idade, e apenas esporadicamente cães jovens. A castração não parece ter qualquer efeito protetor sobre a próstata canina em relação ao desenvolvimento de neoplasia, com os animais castrados tendo a mesma ou maior prevalência de neoplasia prostática quando comparados aos cães intactos (SMITH, 2008).

O câncer de próstata do cão é localmente invasivo e metastatizam rapidamente para os linfonodos regionais (ilíacos, pélvicos e sublobares), pulmões e ossos. Eles invadem frequentemente os ossos, a bexiga, o cólon e os tecidos adjacentes por meio de extensão direta. Além disso, outros órgãos podem ser alvos de metástase, como: fígado, baço, rins, coração e glândulas adrenais. Quando presentes no tecido ósseo, podem promover dor ou fraturas patológicas. As vértebras lombares e a pelve são os locais mais frequentemente envolvidos (NORTHREP *et al.*, 2009).

A escolha do tratamento é baseada na fase em que a doença está e, nos métodos de tratamento, estão inclusos: cirurgias para remover o tumor e a próstata, quimioterapia, radioterapia e transplantação de medula óssea (PEREIRA *et al.*, 2021). As neoplasias de próstata canina com atrasos nos diagnósticos, dificultam o tratamento e agravam o prognóstico. O tratamento cirúrgico é uma opção porém raramente obtém êxito duradouro (FOSSUM, 2014).

O uso de modelos experimentais (*in vivo* e *in vitro*) para o avanço da oncologia humana e animal é bem estabelecido, com o intuito de avaliar o desenvolvimento de testes de ação e seguranças de fármacos; alterações moleculares relacionadas à fatores prognósticos e preditivos (DEWHIRST; PAGE, 2020).

Os modelos naturais são de grande valia no avanço da oncologia comparada. As similaridades de morfologia, ocorrência, sítios metastáticos e a convivência no mesmo ambiente, torna o cão uma excelente sentinela ambiental e modelo para o estudo do carcinoma prostático (DALLECK *et al.*, 2016).

A cultura de celular é um recurso valioso para a pesquisa médica, as células mantidas em cultura representam modelos biológicos e tendem a fornecer respostas simples para problemas de alta complexidade favorecendo o progresso na produção científica. Linhagens celulares estabelecidas a partir de células neoplásicas e não neoplásicas são utilizadas em ensaios pré-clínicos para a proposta de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas em estudos sobre a biologia de doenças, como o câncer (MIGITA, 2012).

Com o objetivo de aumentar a sobrevida dos pacientes acometidos por esta doença, várias terapias têm sido estudadas, como o uso da Cannabis medicinal. A literatura traz estudos *in vitro* mostram resultados promissores do uso de CBD e THC na quimioterapia de diferentes linhagens de células tumorais. Assim como a supressão de genes associados ao processo de migração celular de células neoplásicas, a fim de inibir o processo metastático.

Tendo em vista que o CP canino é uma doença de caráter progressivo, com diagnóstico reservado e os protocolos utilizados apenas retardam a progressão da doença, e possuem efeitos colaterais agressivos (VLASIN *et al.*, 2006), faz-se necessário a busca por novos fármacos que complementem o protocolo quimioterápico, com menores efeitos colaterais ao animal e menor toxicidade para o meio ambiente. Além disso, o cão é considerado um modelo natural para o estudo de carcinoma prostático em oncologia comparada, e avanços no tratamento desta afecção na espécie canina pode beneficiar o homem.

REVISÃO DE LITERATURA

Próstata

A próstata constitui a única glândula sexual acessória importante do cão (SMITH, 2008). Anatomicamente, a próstata humana e canina são glândulas retroperitoneais bilobadas e ovóides que circundam o colo da bexiga urinária e a uretra proximal (Figuras 1 e 2). A glândula é responsável por produzir componentes do fluido seminal, que são essenciais para a nutrição e o metabolismo do espermatozóide, bem como aumentam a sobrevivência do espermatozóide ao tamponar o pH ácido do trato reprodutivo feminino (LEROY; NORTHRUP, 2009). A próstata canina tem sido objeto de estudo nos últimos anos, não apenas pelas afecções que a acometem, mas devido as similaridades com a próstata do homem (DE MARZO *et al.*, 1999).

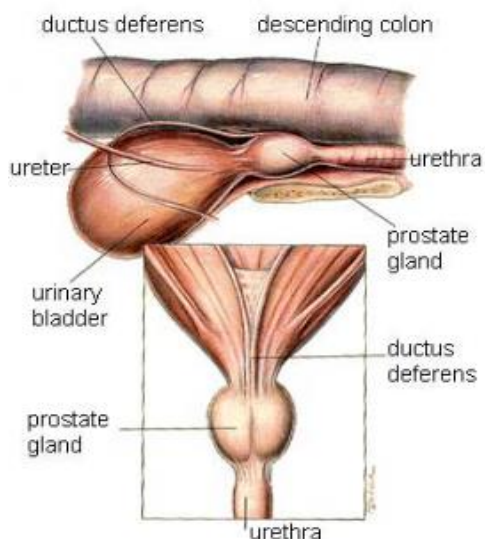


Figura 1 Localização anatômica prostática canina. Fonte: <https://hospital.vetmed.wsu.edu/2022/01/04/cat-and-dog-anatomy/>

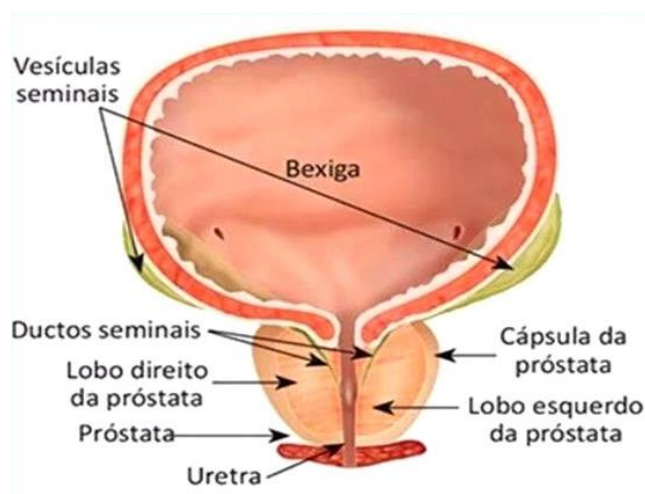


Figura 2 Localização anatômica prostática humana. Fonte: <https://www.todamateria.com.br/prostata/>

A próstata é constituída por um conjunto de adenômeros túbulo acinares ramificados, cujos ductos desembocam na uretra prostática. Apresenta-se envolta por uma cápsula fibroelástica, rica em fibras musculares lisas, que emitem septosa os quais penetram no parênquima formando o estroma que envolve o parênquima glandular (Figura 3).

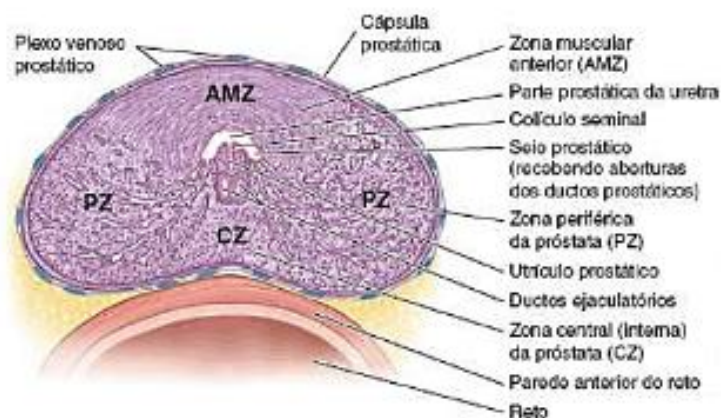


Figura 3 Constituição histológica da próstata. Fonte: <https://www.sanarmed.com/cancer-de-prostata>

A uretra prostática apresenta tecido epitelial colunar pseudoestratificado (COONEY *et al.*, 1992). Os túbulos acinosos são revestidos por epitélio colunar ou cilíndrico biestratificado, com células secretoras (luminais) e basais. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). O crescimento prostático e o desenvolvimento acinar ocorrem com a maturidade sexual. Estudos mostram que os tecidos acinares da próstata são dependentes de androgênio, enquanto os tecidos ductais/ uroteliais são independentes desse hormônio (LEAV *et al.*, 2001; SORENMO *et al.*, 2003).

O papel das células basais está relacionado com desenvolvimento e organização dos ductos e ácinos da próstata canina, além disso existem duas populações de células basais distintas: uma mais susceptível ao desenvolvimento da hiperplasia e outra de neoplasia. (LEAV *et al.*, 2001). O CP canino não tem origem exata de surgimento, já que se observa envolvimento de toda a glândula e uretra (LEROY; NORTHRUP, 2009) diferente do CP no homem, que ocorre na porção periférica da glândula.

Hiperplasia prostática

A doença prostática mais comum em cães é a hiperplasia prostática (PH), proliferação celular não neoplásica da próstata que afeta cães adultos não castrados e faz parte de um processo de envelhecimento, incluindo aumento no número e no tamanho das células (CUNTO *et al.*, 2022). A terapia da HP inclui várias opções e geralmente é recomendada quando sinais leves a graves estão presentes ou se os sinais clínicos atrapalham a qualidade de vida, pois pode levar a problemas desconfortáveis, como hematúria, incontinência urinária, constipação, dificuldade em defecar e rigidez dos membros posteriores (KRAKOWSKI *et al.*, 2022). Na maioria dos cães com esse distúrbio, é possível manter a fertilidade evitando a castração e escolhendo abordagens terapêuticas alternativas.

Atrofia inflamatória proliferativa

A atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (Figura 4 B) é considerada uma lesão pré-maligna devido a características de atipia celular e atrofia com proliferação e por envolver fatores potencialmente carcinogênicos, como a inflamação (DE MARZO *et al.*, 2006). As lesões relacionadas à PIA na espécie canina apresentam um acentuado potencial proliferativo quando comparadas ao tecido prostático normal, com maior população de células intermediárias; é um distúrbio prostático comumente diagnosticado associado à hiperplasia prostática, neoplasia intraepitelial e carcinoma prostático, que pode ser encontrado adjacente à uretra até o parênquima prostático pericapsular da porção medial da próstata (NASCENTE *et al.*, 2022). A PIA canina é uma lesão comum na próstata e compartilha muitas semelhanças morfológicas com a PIA humana, e moleculares, como a menor expressão de *PTEN* e *TP53*, dois importantes supressores tumorais (FERNANDES *et al.*, 2021). O papel da PIA no surgimento e evolução do carcinoma prostático no homem e no cão é controverso, sendo necessário futuras investigações para se obter uma melhor elucidação desta lesão.

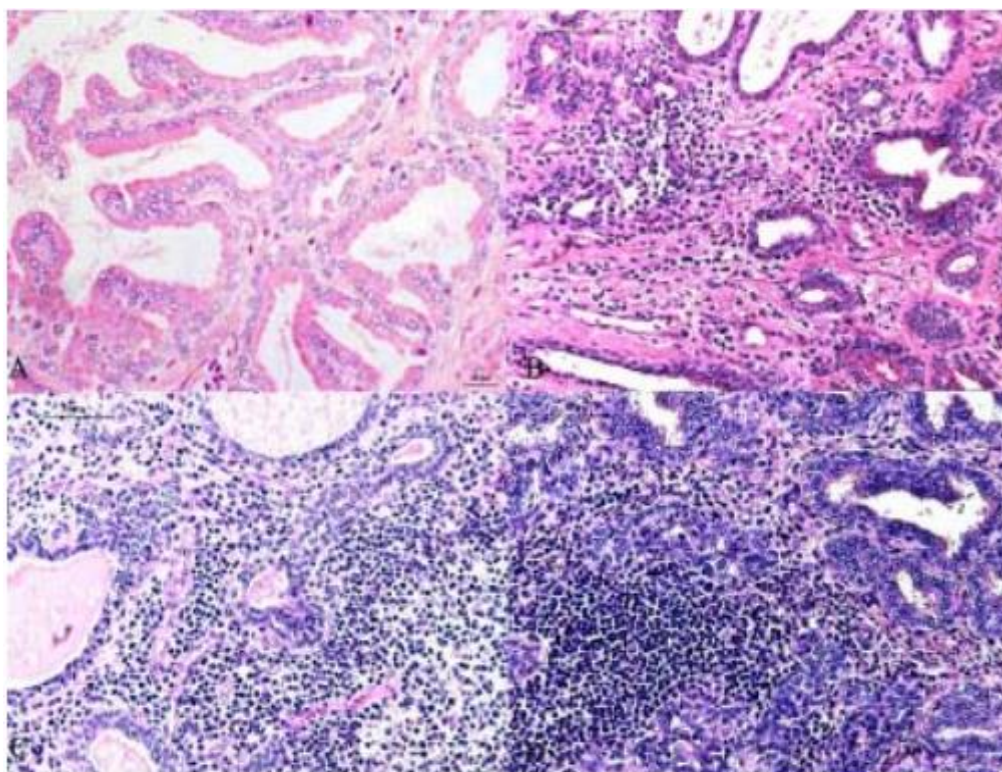


Figura 4 Fotomicrografia próstata canina. A) Histomorfologia normal. Epitélio com uma única camada de células cúbicas e colunares, sustentado por delicado estroma fibrovascular. B) PIA discreta. Ácinos atróficos e células inflamatórias intersticiais esparsas. C) PIA moderada. Atrofia acinar e agregados de células mononucleares. D) PIA acentuada. Predominância de linfócitos intersticiais dispostos em folículos. HE. Fonte: TOLEDO *et al.* (2010).

Neoplasia intraepitelial prostática

A neoplasia intraepitelial prostática (PIN) ou displasia intraductal, é uma lesão considerada precursora do carcinoma invasivo, sendo caracterizada por proliferação e anaplasia celular de ductos e ácinos (Figura 5) (RODRIGUES *et al.*, 2010). A PIN no cão apresenta características semelhantes ao homem no que diz respeito à morfologia, imunofenótipo e associação com o câncer (WATERS *et al.*, 1998; BOSTWICK *et al.*, 2000), porém de menor frequência do que no homem.

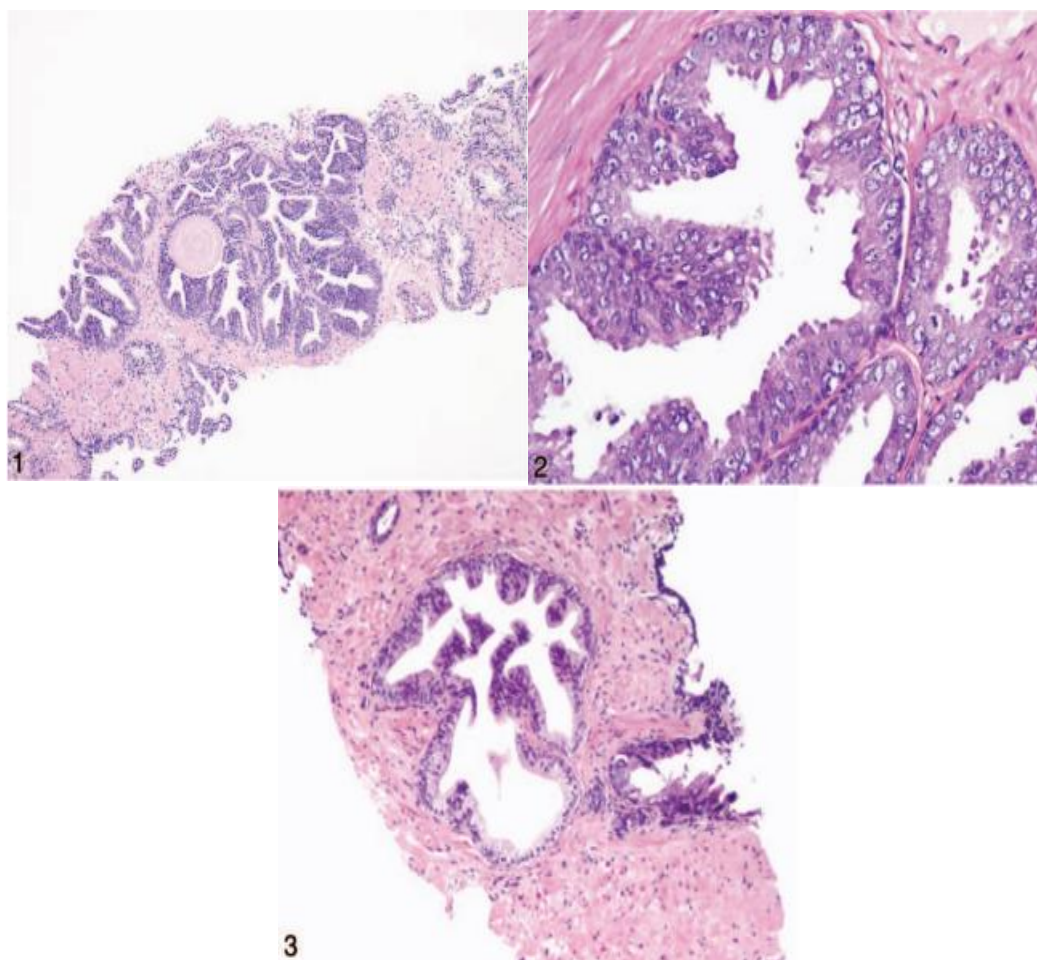


Figura 5 1. Nesta visão de menor aumento da neoplasia intraepitelial prostática humana há um aglomerado de estruturas glandulares com células hipercromáticas contrastando com as glândulas normais adjacentes (hematoxilina-eosina, objetiva 4X). 2. PIN Observa-se estratificação nuclear, aumento nuclear e presença de nucléolos proeminentes na maioria das células (hematoxilina-eosina, objetiva 40X). 3. Esta biópsia mostra envolvimento parcial de uma glândula por PIN (hematoxilina-eosina, objetiva 10X). Fonte: AYALA (2007).

Classificação histológica do carcinoma prostático

O carcinoma prostático canino é classificado histologicamente em adenocarcinoma prostático e carcinoma urotelial prostático, podendo também ocorrer um fenótipo classificado como misto que possuem fenótipos uroteliais e glandulares (PALMIERI et al., 2019). O adenocarcinoma prostático origina-se do epitélio glandular e apresenta alto grau de heterogeneidade morfológica em termos de padrões de crescimento e subtipos histológicos, ocorrendo individualmente ou em combinação, O carcinoma urotelial prostático surge das células uroteliais presentes na uretra prostática ou dos ductos periuretrais. As células neoplásicas são extremamente heterogêneas, variando de pequenas células poliédricas a grandes células, com citoplasma eosinofílico baixo a abundante, núcleo hipercromático ou vesicular grande e alto índice mitótico (PALMIERI et al., 2022).

Os carcinomas de próstata humanos são graduados histologicamente de acordo com o sistema Gleason, que atribui notas numéricas de 1 a 5 (Tabela 1), com base na diferenciação arquitetônica das células do carcinoma em cortes de tecido corados com H&E (HUMPHREY, 2004). LOUD *et al.* (2012) propuseram a soma dos números que gera a escala de Gleason para avaliar o risco de metástase e prejuízo na sobrevivência do paciente, podendo variar de 2 a 10. Podemos estabelecer: Gleason de 2 a 4: Aproximadamente 25% de chance de o tumor disseminar-se para fora da próstata em anos;; Gleason de 5 a 7: Aproximadamente 50% de chance; - Gleason de 8 a 10: Aproximadamente 75% de chance.

Tabela 1 Classificação histológica de acordo com o escore de Gleason adaptado de HUMPREY (2004).

Grau	Arranjo de células tumorais	Tamanho da glândula
1	Único, redondo a oval, compactado por glândulas separadas.	Médio
2	Glândulas únicas, separadas, redondas a ovais, mais variação em tamanho e forma, loosley embaladas com separação estromal	Médio
3A	Glândulas individuais separadas de forma e tamanho variáveis, ampla separação estromal.	Médio
3B	Igual à 3ª, mas glândulas menores.	Pequeno a muito pequeno
3C	Epitélio papilar e cribiforme, sem necrose.	Médio a grande
4A	glândulas fundidas.	Pequeno, médio ou grande
4B	Citoplasma celular = variante hipernefromatóide.	Pequeno, médio ou grande
5A	Massas papilíferas, cribiformes ou sólidas com necrose central.	Variável
5B	Massas e camadas de carcinoma anaplásico com algumas glândulas minúsculas ou células em anel de sinete.	Pequeno

Fonte: adaptado de HUMPREY (2004).

No carcinoma de próstata canino, já foi reconhecido padrões de crescimento correspondentes aos descritos por Gleason, embora seu significado de prognóstico seja desconhecido, porém a graduação de Gleason modificada (tabela2), baseada em padrões histológicos específicos de crescimento existentes em carcinomas de próstata caninos, pode ser aceita como um sistema de graduação para histopatologia nos ambientes de prática (Figura 6), Portanto, o sistema modificado de Gleason pode ser aplicado na prática da patologia veterinária para ajudar o oncologista a tomar melhores decisões com o paciente oncológico canino (PALMIERE; GRIECO, 2015).

Tabela 2 Os padrões arquitetônicos em próstata canina, de acordo com o sistema de graduação Gleason modificado.

Padrão de Gleason	Principais características
Padrão 1	Nódulo circunscrito de ácinos compactos, mas separados, uniformes, redondos a ovais, de tamanho médio.

2	Padrão	Semelhante ao padrão 1, nódulo razoavelmente circunscrito de glândulas mais frouxas. Infiltração mínima na borda do nódulo tumoral pode estar presente.
3	Padrão	Unidades glandulares discretas, menores do que as vistas Padrão de Gleason 1 ou 2, infiltrando ácinos não neoplásicos. Variação marcada em tamanho e forma; pequenos nódulos cribiformes circunscritos do mesmo tamanho que glândulas normais, contorno redondo e regular.
4	Padrão	Glândulas fundidas; Morfologia hipernefróide (células neoplásicas com citoplasma vacuolizado claro); glândulas cribiformes grandes ou irregulares; Glândulas cribiformes confluentes revestidas por células colunares altas e demonstrando padrão em fenda e diferenciação papilar; Glândulas mal definidas ou aglomerado com glândulas mal formadas lumens
5	Padrão	Folhas sólidas, cordões ou células únicas sem diferenciação do lumen glandular; Tumor sólido/cribriforme ou papilar com comedonecrose.

Fonte: (PALMIERE; GRIECO, 2015).

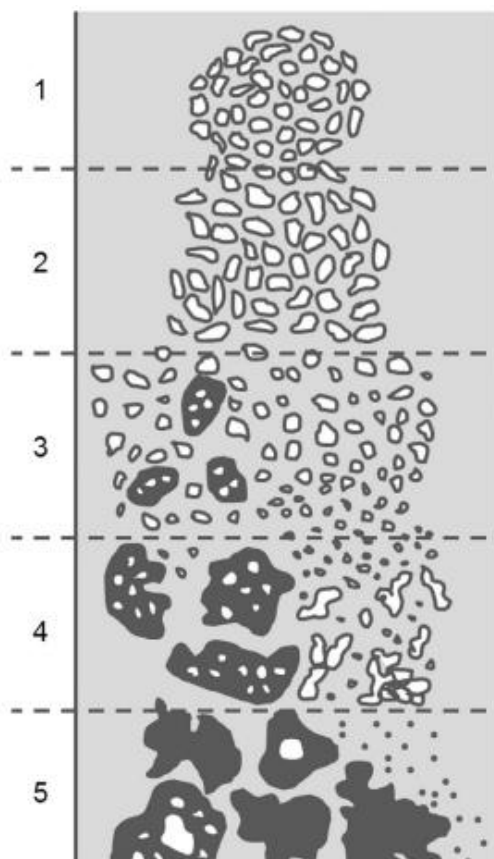


Figura 6 Diagrama esquemático do sistema de graduação de Gleason modificado. Em comparação com o sistema convencional, a maioria dos padrões cribriformes e também as glândulas mal definidas estão incluídas no padrão 4. Fonte: (PALMIERE; GRIECO, 2015).

O estadiamento do carcinoma prostático humano é realizado de acordo com o *American Joint Committee on Cancer sistema TNM*, que foi atualizado recentemente (Tabela 3).

Tabela 3 Classificação do sistema TNM para câncer de próstata humano

T- Tumor primário		
T1	Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
	T0	Sem evidência do tumor primário.
	Tumor clinicamente não palpável ou visível por método de imagem	
	T1a	Tumor incidental – achado por histopatológico < 5% do tecido de ressecção
	T1b	Tumor incidental – achado histopatológico em > 5% do tecido de ressecção
	T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata	
	T2a	Tumor engloba metade de um dos lobos ou menos
	T2b	Tumor engloba mais da metade de um lobo, mas não os dois lobos
	T2c	Tumor engloba ambos os lobos
T3	Tumor além da cápsula prostática	
	T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
	T3b	Tumor envolve a vesícula seminal (uma ou ambas)
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes além das vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica.	
N Envolvimento linfonodal regional		
	Nx	Linfonodos regionais não avaliados
	N0	Sem metástases para linfonodos regionais
	N1	Metástases linfonodais regionais
M Metastases a distância		
	Mx	Metástases a distância não avaliadas
	M0	Ausência de metástase a distância
	M1	Metástase a distância
		M1a – Linfonodos não regionais
		M1b – Ossos
		M1c – Outros órgãos

Fonte: American Joint Committee on Cancer (2018).

Diagnóstico do câncer de próstata canino

O ultrassom via abdominal é o exame mais utilizado como primeira escolha para avaliação prostática. Ultrassom transretal, apesar de fornecer informações mais precisas, acaba sendo realizado apenas quando há necessidade de biópsias. Entretanto, novos estudos têm indicado que a ressonância magnética possui melhores resultados do que os exames ultrassonográficos (TRABULSI *et al.*, 2012).

Atualmente a análise da mutação do gene *BRAF* vem sendo realizada na rotina veterinária, quando há suspeita de câncer de próstata ou carcinoma urotelial, pois se trata de um exame minimamente invasivo evitando uma biópsia cirúrgica para confirmação do diagnóstico. A detecção do *BRAF-Variante V595E* é um método altamente específico e pode auxiliar na confirmação do diagnóstico de câncer de próstata em casos de dificuldade de diferenciar a origem celular no exame histológico e/ou citológico (GRASSINGER *et al.*, 2019).

Tratamento

O tratamento do câncer de próstata localizado envolve vigilância ativa, radioterapia ablativa e prostatectomia radical. Homens que recidivaram ou apresentaram câncer de próstata metastático recebem também a terapia de privação de andrógenos, radioterapia de resgate e quimioterapia. Atualmente, as opções de tratamento disponíveis são mais eficazes quando usadas como terapia combinada; no entanto, apesar das opções de tratamento disponíveis, o câncer de próstata ainda é incurável (SEKHOACHA *et al.*, 2022).

Uma vez que o câncer de próstata canino é agressivo e altamente metastático, idealmente são indicadas terapias locais e sistêmicas. No entanto, não há um padrão de tratamento universalmente aceito em oncologia veterinária para o tratamento de cães com câncer de próstata. Tem sido sugerido que a prostatectomia deve ser considerada para cães com tumor intracapsular difuso ou um tumor intracapsular rodeado por tecido prostático normal sem evidência de metástase (LEROY; NORTHRUP, 2009).

A terapia hormonal é eficaz na maioria dos homens com câncer de próstata, no entanto, não é provável que seja uma opção terapêutica para o câncer de próstata canino, já que o CP, na maioria das vezes, tem origem urotelial/ductal, que é independente de hormônios, além disso muitos cães com CP já foram castrados antes de desenvolverem a doença, especialmente em países como os Estados Unidos da América (SORENMO *et al.*, 2003; SORENMO *et al.*, 2004).

Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (ALMEIDA *et al.*, 2007). Podemos classificá-los em dois tipos: marcadores intermediários, que quantificam as alterações celulares e moleculares antes do aparecimento da malignidade e os marcadores diagnósticos, presentes em associação com a malignidade (CAPELOZZI, 2001)

CALICREÍNAS

O PSA (antígeno prostático específico) é produzido pelas células epiteliais da zona de transição da próstata humana e é responsável pelos níveis séricos de PSA, e o aumento do volume prostático está diretamente relacionado com o aumento deste antígeno (CASTRO *et al.*, 2011). A especificidade tecidual única do PSA é o que torna significativo como um marcador tumoral em humanos. O PSA ocorre tanto em células normais quanto malignas, uma variedade de fatores pode afetar seus níveis e devem ser considerados na interpretação dos resultados. As causas mais comuns de aumento do PSA são prostatite, a hiperplasia prostática e o câncer de próstata (AMBRUSTER, 1993; NICKEL *et al.*, 2008).

A expressão aumentada da calicreína humana 2 (hK2) é observada em altos níveis em neoplasia prostática e em metástases de CP em linfonodos. Tem-se especulado que a dosagem dos níveis séricos desta proteína poderia contribuir para melhorar a acurácia do diagnóstico do câncer de próstata em humanos (LINS *et al.*, 2014). O hK2 pode ser um alvo ideal para a reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) para detectar células cancerígenas circulantes que expressam hK2 mRNA (ALACREU *et al.*, 2008).

O CPSE outro membro da família das calicreínas com notáveis semelhanças com o PSA humano, está presente principalmente na região apical das células epiteliais secretoras prostáticas caninas, é o principal produto de secreção dependente de androgênio da glândula prostática canina as concentrações séricas de CPSE mais altas foram relatadas em cães afetados por HP, prostatite bacteriana e carcinoma prostático do que em cães normais (ALONGE *et al.*, 2018). Tornando-o uma ferramenta de diagnóstico promissora para a detecção de distúrbios prostáticos.

AR

A expressão de receptores andrógenos (AR) é fundamental para o desenvolvimento e manutenção do carcinoma prostático em homens. A testosterona pode ligar os ARs no núcleo para estimular a proliferação, portanto, como o carcinoma prostático canino é uma doença agressiva e geralmente carece de expressão de AR, é fenotipicamente diferente de um carcinoma prostático humano típico. Assim, como os cães podem ser considerados modelos de PC humano, esse modelo poderia se assemelhar ao carcinoma prostático humano com comportamento agressivo (CAVALCA *et al.*, 2022).

O receptor andrógeno pode atuar como fator de transcrição, ou seja, pode participar da ativação ou repressão da transcrição de inúmeros genes. Essa modulação da transcrição gênica pode ocorrer pelo recrutamento de coativadores ou corepressores. Portanto, a atividade do receptor androgênico é essencial para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. (DEAN; KNUDSEN, 2013).

BRAF

A inativação do oncogene *BRAF* frequentemente se relaciona com o processo carcinogênico, o que indica o estabelecimento de uma relação adquirida das células tumorais em formas mutantes oncogênicas do *BRAF* (ZAMAN *et al.*, 2019). A ativação da sinalização do *BRAF* torna as células tumorais PC humanas menos dependentes de andrógenos para proliferação *in vivo* e *in vitro*, contribuindo para o fenótipo refratário a hormônios (WANG *et al.*, 2011). A maioria dos PC humanos, no entanto, progride para um câncer mais agressivo, refratário a hormônios, ou seja, resistente a ablação androgênica, durante o curso clínico.

A alta incidência da mutação *BRAF* e a natureza agressiva do carcinoma prostático canino correlacionam o fato de que a maioria dos cânceres caninos se desenvolve independentemente da estimulação androgênica. Essas semelhanças clínicas e moleculares fazem com que o carcinoma prostático canino seja um modelo animal de ocorrência espontânea relevante para o carcinoma prostático humano refratário a tratamento hormonal (MOCHIZUKI *et al.*, 2015).

A mutação *BRAF V595E* correspondente à mutação humana *BRAF V600E*, é encontrada com frequência no carcinoma prostático canino. Mutações ativadoras de *BRAF* são reconhecidas como drivers oncogênicos, e o bloqueio da fosforilação de MAPK/ERK pode ser um alvo terapêutico eficaz contra tumores com mutação de *BRAF* (KOBAYASHI *et al.*, 2023).

IGF-1

Sinalização do IGF-1 está intimamente relacionada ao desenvolvimento e progressão do carcinoma de próstata, o IGF-1 induz a fosforilação e a internalização de seu receptor e, assim, induz múltiplas alterações biológicas que facilitam a tumorigênese, a progressão do câncer, a disseminação metastática e até mesmo a resistência ao tratamento (LIU *et al.*, 2023).

Resultados indicaram que altos níveis de IGF-1 circulante e IGF-1R ativado estão associados a um risco aumentado de progressão em vários tumores sólidos, como câncer de mama (POLLAK *et al.*, 2004). O IGF-1 tem potente função proliferativa e de inibição de apoptose no corpo humano, especialmente sobre a próstata. Observa-se níveis elevados em pacientes humanos que potencialmente podem desenvolver câncer de próstata ou que já o tem a neoplasia, porém apresenta-se com níveis reduzidos nos tumores de estágios avançados (SARRIS *et al.*, 2018). Estudos em linhagens de carcinoma prostático canino são encorajados a respeito do *IGF-1* e sua correlação com a progressão da doença.

COX-2

O aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), uma enzima que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostanoídes, tem sido extensivamente associado à progressão de malignidades humanas, incluindo o câncer de próstata (GARD *et al.*, 2018). A regulação positiva de COX-2, encontrada em células cancerígenas, leva ao aumento da proliferação, migração, angiogênese, inflamação e disseminação metastática (RICHARDSEN *et al.*, 2010). Inibidores seletivos de COX-2, como celecoxib e rofecoxib, isoladamente ou em combinação com outros agentes, suprimem o crescimento e a metástase do tumor de próstata (GARCIA *et al.*, 2014).

A COX-2 é expressa em carcinoma de próstata canino, porém sua expressão não está relacionada com a presença de infiltrados inflamatórios (L'EPLATTENIER *et al.*, 2007). Os inibidores de COX-2 administrados diariamente aumentam o tempo de sobrevivência em cães com tumores de próstata, apoiando a eficiência terapêutica dos inibidores de COX-2 (PACKEISER *et al.*, 2020). Mais estudos são necessários para investigar os efeitos dos inibidores de COX-2 em características como migração e invasão.

KI67

O anticorpo monoclonal murino Ki-67 reage com um antígeno nuclear humano que está presente em células em proliferação, mas ausente em células quiescentes. O

antígeno nuclear Ki-67 é expresso em quase todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas não em G0 (GEDES *et al.*, 1983). Assim com a ajuda desse anticorpo, estima-se a fração de crescimento de uma determinada população de células humanas, independentemente de ser normal ou maligna (GEDES *et al.*, 1984).

O aumento da expressão da proteína Ki67 está associado a agressividade tumoral e correlaciona-se com pior prognóstico para o câncer de próstata humano (MAIA *et al.*, 2022). O Ki-67 tem um valor prognóstico independente, o que adiciona informações prognósticas sobre o escore de Gleason e os níveis séricos de PSA e é prognóstico para progressão da doença em pacientes humanos submetidos à radiação (KRISTIANSEN, 2012).

TP53

O gene *TP53* codifica a proteína tumoral p53, que é um regulador chave do ciclo celular, controlando a transição da fase G1 para a fase S. Sob condições propícias a danos no DNA, a p53 pode induzir a apoptose ou interromper o ciclo celular para reparação de DNA (MORRIS, 2002). A p53 influencia o fenótipo celular e é frequentemente perdida no câncer de próstata mais agressivo, com diferenciação neuroendócrina. A perda de p53 antagoniza o efeito dos inibidores de AR e aumenta a taxa de proliferação de células CaP humano (KUMARI *et al.*, 2022).

Em cães, uma baixa expressão de *TP53* foi observada em PIA e PC em comparação com tecido prostático normal (RIVERA-CALDERÓN *et al.*, 2016). Em PC canino, as alterações genômicas em *TP53* foram investigadas no nível transcricional em uma coorte independente de pacientes com PC e encontrada uma expressão negativa significativa em casos de PC em comparação com tecidos normais (LAUFER-AMORIM *et al.*, 2019).

E-caderina

O gene da E-caderina (*CDH1*), um membro da família das glicoproteínas transmembrana, responsável pela adesão célula-célula dependente de cálcio, está localizado na região cromossômica 16q22, em humanos. Na carcinogênese a E-caderina tem um importante papel relacionado com invasão de tecidos adjacentes e ao processo de metástase (PAREDES *et al.*, 2001).

No PC humano, a metilação de *CDH1* foi associada à regulação negativa da E-caderina nas linhagens DU145 e PC-3 (MOSTAFAVI-POUR *et al.*, 2015). EM PC canino baixos níveis de proteína E-caderina, menor expressão de *CDH1* e hipermetilação deste

gene foram detectados. Porém, em focos metastáticos observou-se a re-expressão da E-caderina, confirmando sua relevância nestes processos (FONSECA-ALVES *et al.*, 2019).

PTEN

O *PTEN* é um importante controlador da via da Phosphatidylinositol-3 Kinase/Protein Kinase B (PI3K/AKT), participando na regulação de múltiplos processos biológicos como a apoptose, proliferação, metabolismo e controle dos níveis de AR, necessário para a maturação e diferenciação do tecido prostático. Frequentemente observa-se deleções de *PTEN* no câncer de próstata (DEMARZO *et al.*, 2003; NICHOLSON E RICKIE).

O gene *PTEN* codifica uma fosfatase de especificidade dupla que regula as vias cruciais de transdução de sinal. Funciona principalmente como uma fosfatase lipídica e tem como alvo o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP-3). Ao desfosforilar o PIP-3, o *PTEN* regula negativamente a via de sinalização AKT/PKB, que promove a sobrevivência celular e inibe a apoptose (PORKKA; VISAKORPI, 2004). A deleção genômica do *PTEN* no câncer de próstata já foi identificada (CAIRNS *et al.*, 1997).

O *PTEN* é o gene supressor de tumor mais comumente perdido na doença primária e essa variação provavelmente se deve em parte ao fato de que a frequência da deleção do *PTEN* está altamente correlacionada com a agressividade da doença observada com o aumento do escore de Gleason e o estágio do tumor (JAMASPIHVILI *et al.*, 2018).

A perda de *PTEN* pode ser um passo importante na carcinogênese da próstata canina, e níveis diminuídos de *PTEN* podem estar associados a um comportamento biológico mais agressivo (PALMIERI; LIN, 2016).

c-MYC

O *c-MYC* é um fator de transcrição nuclear que desempenha um papel importante na proliferação, metabolismo, diferenciação e migração de células neoplásicas prostáticas. Sua sinalização leva ao crescimento e invasão do câncer *in vitro* e *in vivo*. A estabilidade do *c-MYC* também pode mediar a resistência a drogas em cânceres, levando à inibição da apoptose e o aumento da progressão do ciclo celular (FASKHOUDI *et al.*, 2022). A superexpressão de *c-MYC* (*MYC* é rigidamente controlada em circunstâncias normais, e frequentemente observada no câncer de próstata (QIU *et al.*, 2022).

A superexpressão de *MYC* diminui significativamente a função de transcrição do receptor de andrógeno em células lúminas prostáticas (WU *et al.*, 2021). A expressão da proteína *c-MYC* foi observada em cães, presente no citoplasma e nos núcleos do

carcinoma de próstata e PIA caninos, em comparação com a próstata normal (FONSECA-ALVES *et al.*, 2013).

Cannabis sativa

A fitoterapia ou terapia pelas plantas é uma das mais antigas práticas terapêuticas da humanidade. Ela remonta há cerca de 8.500 a.C. e apresenta origens tanto no conhecimento popular (etnobotânica) como na experiência científica (etnofarmacologia). São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (Programa de Plantas Medicinais e Terapias Não Convencionais UFJF, 2021; ANVISA, 2014).

A *Cannabis sativa* é uma planta conhecida popularmente no Brasil pelo nome de maconha (Figura 7). A planta é cultivada e produzida em diversas partes do mundo. Existem registros de sua utilização datados de 10.000 anos antes de Cristo (CARLINI, 2006). Na década de 60, ocorreram as descobertas de Mechoulam, em 1963, da estrutura do canabidiol (CBD) (Figura 8), e em 1964, da estrutura química do Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) (Figura 9) (MECHOULAM; SHVO, 1963). Após a clonagem dos receptores CB1 e CB2 em cérebro de camundongo, na década de 90 (DEVANE *et al.*, 1991).



Figura 7 Cannabis sativa. Fonte: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/canabinoides>

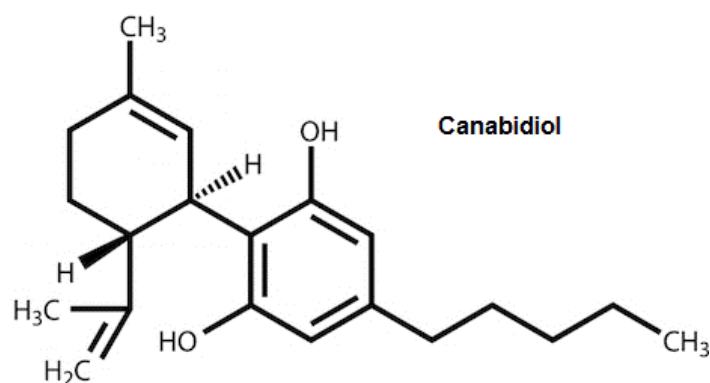


Figura 8 Fórmula estrutural do Canabidiol. Fonte: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/canabinoides>.

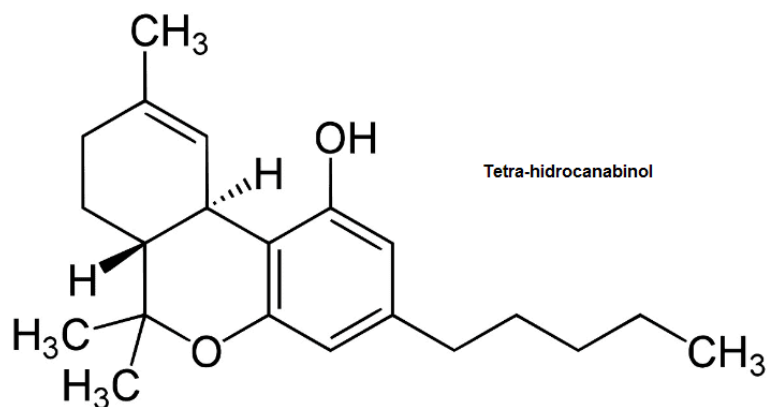


Figura 9 Fórmula estrutural do Tetra-hidrocanabinol. Fonte: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/canabinoides>.

Foi descoberto que apesar dos compostos canábicos serem substâncias exógenas obtidas através da *Cannabis sp.*, o organismo dos mamíferos apresenta um sistema complexo e com mediadores lipídicos, isolados do cérebro e tecidos periféricos que incluem amidas, ésteres e éteres de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, eles imitam a ação do Δ^9 -THC em diferentes processos biológicos. denominado sistema endocanabinoide (Figura 10) (DI MARZO *et al.*, 2004; BATTISTA *et al.*, 2012). Este sistema está envolvido na modulação de diversas funções corporais, como apetite, digestão, balanço energético, padrões de sono, estado imunológico e inflamatório e respostas emocionais (HAZZAH *et al.*, 2020).

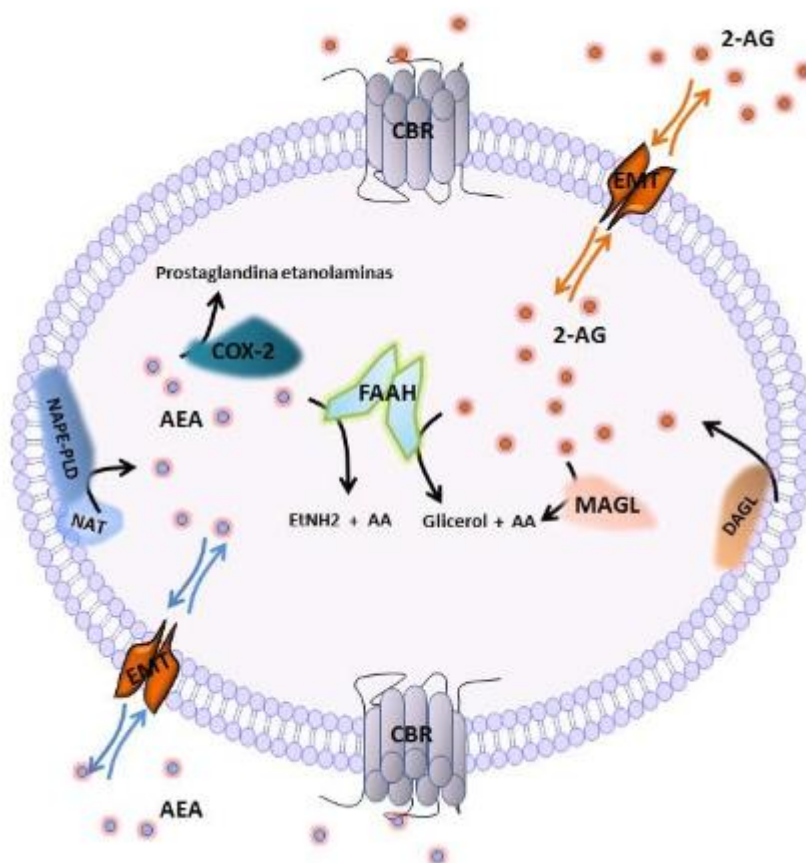


Figura 10 Representação esquemática do Sistema Endocanabinóide. A anandamida (AEA) é sintetizada pelas enzimas N-acetiltransferase (NAT) e uma fosfolipase específica (“arachidonoylphosphatidylethanolamine-phospholipase D”; NAPE-PLD). O 2-araquidonoilglicerol (2-AG) é sintetizado através de uma outra lipase (“diacylglycerol lipase”; DAGL). Uma vez sintetizados a AEA e o 2-AG ligam-se ao transportador membranal dos endocanabinóides (EMT) ficando disponíveis para atuar nos receptores canabinóides. O transportador remove rapidamente estes compostos sendo a AEA degradada por uma hidrólase das amidas dos ácidos gordos (“fatty acid amide hydrolase”; FAAH) resultando ácido araquidónico (AA) e etanolamina (EtNH₂), enquanto o 2-AG é degradado pela FAAH ou por uma lipase de glicéris (“monoacylglycerol lipase”; MAGL) a AA e glicerol. Um mecanismo alternativo é mediado pela ciclooxigenase-2 (COX-2) que converte a AEA a prostaglandina etanolamina. Fonte: FONSECA *et al.* (2013).

Os tecidos de mamíferos expressam pelo menos dois tipos de receptores canabinóides, ambos são acoplados na proteína G. Estes são os receptores CB1, e CB2 (Figura 11) (PERTWEE, 2005). O receptor CB1 está presente no sistema nervoso central e medeia os efeitos psicotrópicos de canabinóides exógenos, como o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), o componente ativo da cannabis.

O receptor CB1 é responsável pela atividade analgésica dos endocanabinóides, bem como por muitos outros efeitos, incluindo locomoção e controle de temperatura

(MATSUDA *et al.*,1990). O receptor CB2 está presente em tecidos inflamatórios e medeia os efeitos antiinflamatórios de endocanabinóides e canabinóides derivados de plantas. Ambos os receptores CB1 e CB2 se acoplam ao Gi e reduzem os níveis intracelulares de cAMP (HERMANSON; MARNETT, 2011).

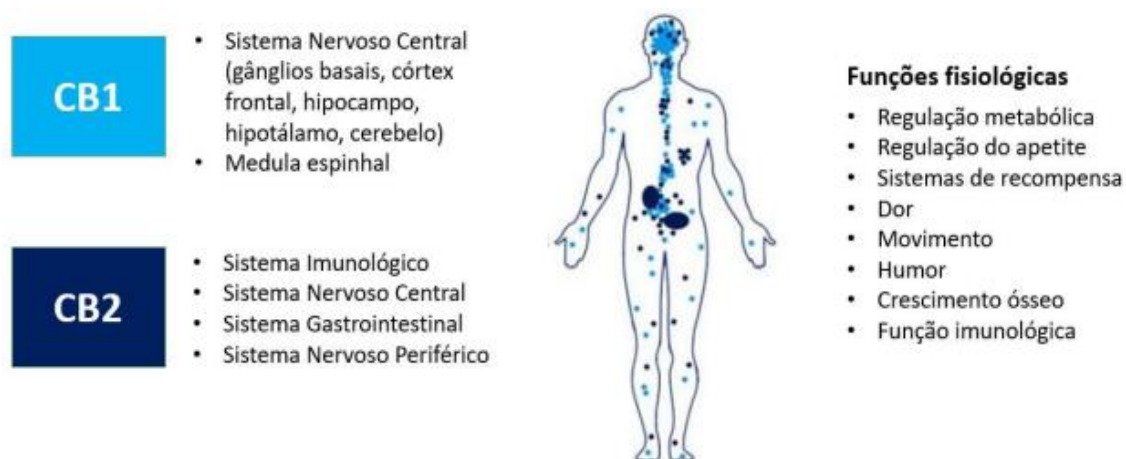


Figura 11 Esquema representativo da distribuição dos receptores canabinóides CB1 e CB2 e das funções fisiológicas que os mesmos exercem no organismo. Adaptação. Fonte: CARDOSO (2019).

A *Cannabis sp.* vem sendo utilizada de várias formas possíveis, tendo um potencial alvo terapêutico tais como: diminuição dos efeitos adversos quimioterapia, estimulação do apetite, controle da espasticidade na esclerose múltipla, dor crônica, epilepsia, síndrome de Tourette e glaucoma (CORREIA DA SILVA, 2019).

A atividade anti-tumoral da cannabis foi avaliada em diferentes linhagens celulares de neoplasia humana, com resultados promissores na redução da proliferação celular e invasão, além do aumento do apoptose e melhora da resposta imune do hospedeiro (BODINE; KEMP, 2022).

HINZ; RAMER (2019), em uma recente revisão de literatura sobre os efeitos anti-tumorais dos canabinóides, descrevem os mecanismos intracelulares responsáveis pelo efeito anti-proliferativo em células neoplásicas humanas, na modulação do ciclo celular. A ativação de receptores canabinóides em linhagens de melanoma causou a parada do ciclo celular pela inibição da via AKT e diminuição da fosforilação da proteína Rb (Blázquez *et al.*, 2006, apud HINZ; RAMER, 2019). Em linhagens de carcinoma de mama observou-se que o THC induzia a parada do ciclo celular pela diminuição de CDK1 (Caffarel *et al.*, 2006, apud HINZ; RAMER, 2019).

Estudo *in vitro* com duas linhagens de carcinoma de células de transição humana demonstrou que o uso de compostos da *Cannabis sativa*, como cannaflavina A, tem feito

sinérgico positivo quando combinado a outros agentes quimioterápico e diminuiu a viabilidade celular de maneira dose-dependente (TOMOKO *et al.*, 2022).

O uso da cannabis na medicina veterinária pode se apresentar em várias formas de administrações, como pomadas para uso tópico, colírios e extratos, tendo seu uso relatado para tratamento de transtornos cardiovasculares, câncer, dor, asma, doenças alérgicas, vômito, diabetes e rinite pigmentosa (LANDA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2021). Seu uso tem sido indicado para dor, anorexia, como suplemento alimentar (ALVARENGA *et al.*, 2023). Estudos *in vitro* com uso de CBD e linhagens de células neoplásicas caninas são escassos.

Autores já avaliaram o efeito de CBD sobre cinco linhagens celulares caninas: uma de carcinoma de mama (CMT-12), uma de linfoma B (17-71) e três de osteossarcoma (D17, HMPOS e Abrams), o efeito do CBD sozinho ou em combinação com quimioterápicos usualmente indicados levou a redução da proliferação celular, especialmente por induzir autofagia e apoptose das células neoplásicas (HENRY *et al.*, 2020).

Em linhagens de células de carcinoma urotelial canino (AXA, Orig e SH), o uso de CBD reduziu a viabilidade celular e induziu a apoptose. Ainda, a combinação de CBD com mitoxantrona e vimblastina reduziram significativamente a viabilidade celular e incrementaram a taxa de apoptose, comparado com o uso de um único agente, porém não com a carboplatina e inibidores seletivos de COX-2, fármacos de uso frequente em cães com esta afecção. Os autores sugerem um uso promissor de CBD de forma isolada ou em associação com protocolos quimioterápicos convencionais (INKOL *et al.*, 2021)

No câncer de próstata, a expressão do receptor CB1 pelas linhas celulares de câncer de próstata humano LNCaP (sensível a andrógeno), DU145 e PC3 (independente de andrógeno) é maior do que a observada em células epiteliais da próstata humana normal (SARFARAZ *et al.*, 2005). Isso foi confirmado em espécimes de carcinoma de próstata, onde a expressão dos receptores CB1 e TRPV1 é regulada positivamente e se correlaciona com graus crescentes de tumor (CZIFRA *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que o nível de CB1 no tecido tumoral está associado à gravidade da doença no diagnóstico e no resultado (CHUNG *et al.*, 2009).

As escassas opções terapêuticas para o câncer de próstata, principalmente nos casos mais avançados, encorajam buscas por novos fármacos. Os resultados da literatura recente são promissores, além da legalização do uso medicamentoso destes compostos

em diferentes estados do Brasil, bem como a recente aprovação pela Assembleia Legislativa do Estado de São Paulo (ALESP) de uma lei que institui a política estadual de fornecimento gratuito de medicamentos à base de canabidiol (Lei 17618/2023), o que encoraja o desenvolvimento de pesquisas em oncologia comparada com o uso de *Cannabis sativa* e seus compostos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a resposta antitumoral do extrato rico em canabidiol (CBD) e extrato rico em tetrahydrocannabinol (THC), em linhagens tumorais de carcinoma prostático canino e humano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito na viabilidade (IC50) de cultura de carcinoma prostático canino e humano após 24 horas de exposição aos extratos rico em CBD e THC.

Avaliar o potencial indutor apoptótico nas linhagens de carcinoma prostático canino e humano após 24 horas de exposição aos extratos rico em CBD e THC.

*REFERÊNCIAS

ALONGE, S. et al. Advances in prostatic diagnostics in dogs: The role of canine prostatic specific esterase in the early diagnosis of prostatic disorders. **Topics in companion animal medicine**, v. 33, n. 4, p. 105-108, 2018.

ARMBRUSTER, D. A. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 181-195, 1993.

AYALA, A. G.; RO, J. Y. Prostatic intraepithelial neoplasia: recent advances. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 8, p. 1257-1266, 2007.

BATTISTA, N. *et al.* The endocannabinoid system: an overview. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, p. 9, 2012.

* ABNT NBR 6023:2018

- BERTHOLD, D. R. *et al.* Survival and PSA response of patients in the TAX 327 study who crossed over to receive docetaxel after mitoxantrone or vice versa. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 10, p. 1749-1753, 2008.
- BODINE, M.; KEMP, A. K. Medical cannabis use in oncology. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.
- BOOKSTEIN, R. *et al.* p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. **Cancer Research**, v. 53, n. 14, p. 3369-3373, 1993.
- BOSTWICK, D. G.; RAMNANI, D.; QIAN, J. Prostatic intraepithelial neoplasia: animal models 2000. **The Prostate**, v. 43, n. 4, p. 286-294, 2000.
- CAIRNS, P. *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. **Cancer Research**, v. 57, n. 22, p. 4997-5000, 1997.
- CAMPBELL, K. J.; LEUNG, H. Y. Evasion of cell death: A contributory factor in prostate cancer development and treatment resistance. **Cancer Letters**, v. 520, p. 213-221, 2021.
- CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, p. 321-328, 2001.
- CARDOSO, S. R.. Canabidiol: estado da arte e os caminhos para a regulamentação no Brasil. 2019.
- CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, p. 314-317, 2006.
- CASTRO, H. A. S. de *et al.* Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2, 6 e 10, 0 ng/ml. **Radiologia Brasileira**, v. 44, p. 205-209, 2011.
- CAVALCA, A. M. B. *et al.* P-Glycoprotein and Androgen Receptor Expression Reveals Independence of Canine Prostate Cancer from Androgen Hormone Stimulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1163, 2022.730, 2022.
- CHUNG, S. C. *et al.* A high cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 1, p. 174-182, 2009.

CORREIA-DA-SILVA, Georgina *et al.* Canábis e canabinóides para fins medicinais. **Revista Portuguesa De Farmacoterapia**, v. 11, n. 1, p. 21-31, 2019.

CORSATO ALVARENGA, Isabella *et al.* Scientific Validation of Cannabidiol for Management of Dog and Cat Diseases. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 11, p. 227-246, 2023.

CUNTO, M.; BALLOTTA, G.; ZAMBELLI, D. Benign prostatic hyperplasia in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p. 107096, 2022.

CZIFRA, G. *et al.* Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, p. 507-514, 2009.

DALECK, C. R. *et al.* **Oncologia em cães e gatos**. Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016. 825-830.

DE ALMEIDA, J. R. C. *et al.* Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

DE MARZO, A. M. *et al.* A working group classification of focal prostate atrophy lesions. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 10, p. 1281-1291, 2006.

DE MARZO, A. M. *et al.* Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 6, p. 1985-1992, 1999.

DEMARZO, A. M. *et al.* Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 955-964, 2003.

DEVANE, W. A. *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.

DEWHIRST, M. W.; PAGE, R. L. Emerging Translational Opportunities in Comparative Oncology with Companion Canine Cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 270, 2020.

FASKHOUDI, M. A. *et al.* Molecular landscape of c-Myc signaling in prostate cancer: A roadmap to clinical translation. **Pathology-Research and Practice**, p. 153851, 2022

FONSECA, B. M. *et al.* O Sistema Endocanabinóide—uma perspectiva terapêutica. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2013.

FONSECA-ALVES, C. E. *et al.* Alterations of C-MYC, NKX3. 1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 12, p. 1250-1256, 2013.

GARCIA, M. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumour progression of prostate cancer bone metastases in nude mice. **BJU International**, v. 113, n. 5b, p. E164-E177, 2014.

GARG, R. *et al.* COX-2 mediates pro-tumorigenic effects of PKC ϵ in prostate cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 34, p. 4735-4749, 2018.

GERDES, J. *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **The American Journal of Pathology**, v. 138, n. 4, p. 867, 1991.

GERDES, J. *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.

GRASSINGER, J. M. *et al.* Detection of BRAF mutation in canine prostatic diseases. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/heimtiere**, v. 47, n. 5, p. 313-320, 2019.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GROSS, C. *et al.* Cannabidiol induces apoptosis and perturbs mitochondrial function in human and canine glioma cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 725136, 2021.

GUZMAN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745-755, 2003.

HENRY, J. G. *et al.* The effect of cannabidiol on canine neoplastic cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation during autophagy and apoptosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 2, p. 253-265, 2021.

HERMANSON, D. J.; MARNETT, L. J. Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, p. 599-612, 2011.

HINZ, B.; RAMER, R. Anti-tumour actions of cannabinoids. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1384-1394, 2019.

HOROSZEWICZ, J. S. The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma. **Prog Clin Biol Res**, v. 37, p. 115-132, 1980.

INKOL, J. M.; HOCKER, S. E.; MUTSAERS, A. J. Combination therapy with cannabidiol and chemotherapeutics in canine urothelial carcinoma cells. **Plos One**, v. 16, n. 8, p. e0255591, 2021.

JM, A A *et al.* PSA and hK2 in the diagnosis of prostate cancer. **Actas Urologicas Espanolas**, v. 32, n. 6, p. 575-588, 2008.

KAMIYAMA, M. *et al.* Distribution and Possible Function of Cannabinoid Receptor Subtype 1 in the Human Prostate. 2013.

KOBAYASHI, M *et al.* Establishment of a BRAF V595E-mutant canine prostate cancer cell line and the antitumor effects of MEK inhibitors against canine prostate cancer. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2023.

KOBAYASHI, P. E. *et al.* Transcriptome of two canine prostate cancer cells treated with Toceranib phosphate reveals distinct antitumor profiles associated with the PDGFR pathway. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 561212, 2020.

KRAKOWSKI, L. *et al.* Assessment of the possibility of using biomarkers (CCL11 and TGF-beta 1) in the diagnosis of prostate gland hyperplasia in dogs. **Theriogenology**, v. 192, p. 9-13, 2022.

KRISTIANSEN, Glen. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 125-141, 2012.

L DEAN, J.; E KNUDSEN, K. The role of tumor suppressor dysregulation in prostate cancer progression. **Current drug targets**, v. 14, n. 4, p. 460-471, 2013.

LANDA, L.; SULCOVA, A.; GBELEC, P. The use of cannabinoids in animals and therapeutic implications for veterinary medicine: a review. **Veterinární Medicína**, v. 61, n. 3, 2016.

L'EPLATTENIER, H. F. *et al.* Regulation of COX-2 expression in canine prostate carcinoma: Increased COX-2 expression is not related to inflammation. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 4, p. 776-782, 2007.

LEROY, B. E.; NORTHROP, N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 149-162, 2009.

- LIN, H.-Y.; PALMIERI, C. Is STAT3 and PTEN expression altered in canine prostate cancer?. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 2-3, p. 185-189, 2016.
- LOEB, Stacy; CARTER, Herbert Ballentine. Early detection, diagnosis, and staging of prostate cancer. **Campbell-Walsh Urology**, v. 10, p. 2763-70, 2012.
- MAIA, R. *et al.* Podemos usar a expressão de Ki67 para prever a agressividade do câncer de próstata? **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 49, 2022.
- MARZO, V. Di; B., Maurizio; PETROCELLIS, L. De. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771-784, 2004.
- MATSUDA, L. A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990.
- MIGITA, N. Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012.
- MOCHIZUKI, H. *et al.* BRAF mutations in canine cancers. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0129534, 2015.
- MORRIS, S. M. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 511, n. 1, p. 45-62, 2002.
- MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.
- NAVONE, Nora M. *et al.* p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 20, p. 1657-1669, 1993.
- PACKEISER, E. M. *et al.* Characterization of six canine prostate adenocarcinoma and three transitional cell carcinoma cell lines derived from primary tumor tissues as well as metastasis. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0230272, 2020.
- PACLIKOVA, K.; KOHOUT, P.; VLASIN, M. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. **VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-**, v. 51, n. 1, p. 1, 2006.
- PALMIERI, C.; FONSECA-ALVES, C. E.; LAUFER-AMORIM, R. A Review on Canine and Feline Prostate Pathology. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

PELLATI, F. *et al.* *Cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

PEREIRA, k. G. Et al. Fatores associados à masculinidade no diagnóstico precoce do câncer de próstata: revisão narrativa. **Revista nursing**: v. 24, n. 277, p. 5803-5810, 2021.

PEREIRA, P. G. *et al.* O Uso do canabidiol em Paciente com Epilepsia. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 424-433, 2021.

PERTWEE, R. G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 397-411, 2009.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873-884, 2003.

POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505-518, 2004.

PROGRAMA DE PLANTAS MEDICINAIS E TERAPIAS NÃO CONVENCIONAIS. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2015. Fitoterapia. Disponível em: <https://www.ufjf.br/proplamed/atividades/fitoterapia/>. Acesso: fevereiro de 2022.

QIU, X. *et al.* MYC drives aggressive prostate cancer by disrupting transcriptional pause release at androgen receptor targets. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 2559, 2022..

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014.

RICHARDSEN, E. *et al.* COX-2 is overexpressed in primary prostate cancer with metastatic potential and may predict survival. A comparison study between COX-2, TGF- β , IL-10 and Ki67. **Cancer Epidemiology**, v. 34, n. 3, p. 316-322, 2010.

RODRIGUES, M. M. P. *et al.* Neoplasia intra-epitelial prostática: aspectos morfológicos e moleculares. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 19-25, 2010.

SÁNCHEZ, C. *et al.* Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. **FEBS letters**, v. 436, n. 1, p. 6-10, 1998.

SARFARAZ, S. *et al.* Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 5, p. 1635-1641, 2005.

- SEKHOACHA, M. *et al.* Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5
- SHRIVASTAVA, A. *et al.* Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and AutophagyCBD induces programmed cell death in breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1161-1172, 2011.
- SIEGEL, R. *et al.* Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.
- SMITH, J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 375-383, 2008.
- SORENMO, K. U. *et al.* Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 48-56, 2003.
- TODARO, M. *et al.* Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 4, p. 762-772, 2008.
- TOLEDO, D. C. *et al.* Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1372-1377, 2010.
- UMBAS, R. *et al.* Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. **Cancer Research**, v. 52, n. 18, p. 5104-5109, 1992
- VLIETSTRA, R. J. *et al.* Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. **Cancer Research**, v. 58, n. 13, p. 2720-2723, 1998.
- WANG, X. S. *et al.* Characterization of KRAS Rearrangements in Metastatic Prostate CancerKRAS Rearrangements in Prostate Cancer. **Cancer Discovery**, v. 1, n. 1, p. 35-43, 2011.
- WATERS, D. J. *et al.* Workgroup 4: spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. **The Prostate**, v. 36, n. 1, p. 64-67, 1998.
- WU, M. J. *et al.* Targeting KDM4B that coactivates c-Myc-regulated metabolism to suppress tumor growth in castration-resistant prostate cancer. **Theranostics**, v. 11, n. 16, p. 7779, 2021.

XU, F. et al. Cannabidiol promotes apoptosis of osteosarcoma cells in vitro and in vivo by activating the SP1-CBX2 axis. **American Journal of Translational Research**, v. 14, n. 2, p. 1188, 2022.

ZAMAN, A.; WU, Wei; BIVONA, Trever G. Targeting oncogenic BRAF: past, present, and future. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1197, 2019.

ZIPPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. **in vivo**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2005.

CAPÍTULO II

TRABALHO CIENTIFICO

Trabalho a ser submetido para a revista **Cannabis and Cannabinoid Research**

ESTUDO COMPARADO DOS EFEITOS ANTI-TUMORAIS DOS EXTRATOS DE *CANNABIS SATIVA* RICO EM THC E CBD EM CÉLULAS DE CARCINOMA PROSTÁTICO CANINO E HUMANO

Luís G R M Calheiros^{1*}; Thayná O Silva¹; Paulo C L Eliam¹; Lucas V O Oliveira¹; Vinicius S Perino¹; Carlos Eduardo Fonseca-Alves, Rogério M Amorim¹; Renée Laufer-Amorim¹⁺.

¹Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, BRA.

*Autor correspondente: lgrm.calheiros@unesp.br + Informações de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP: Processo FAPESP nº 2021/01181-5

RESUMO

O carcinoma de próstata é o segundo tipo de neoplasia maligna mais comum entre os homens no Brasil, e relatado em cães entre 8 a 10 anos de idade, com rápida evolução podendo metastatizar para linfonodos regionais, pulmões e ossos. O CBD já foi relatado na literatura como agente antineoplásico em modelos *in vitro* de neoplasias do homem e do cão. Nós investigamos o efeito citotóxico dos extratos de dois extratos de *Cannabis sativa*, um rico em CBD (ERCBD) e outro rico em THC (ERTHC), em linhagens de células de carcinoma prostático canino (PC1 e PC2) e humano (LNCAP), bem como sua avaliação para a indução a apoptose de células cancerígenas. Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT, com as doses 2,5µM, 5µM, 7,5µM e 10µM de ambos os compostos nas linhagens caninas e 10µM, 20µM, 30µM e 40µM de ambos os compostos na linhagem humana. As linhagens foram incubadas por 24 horas, em placas de 96 poços em condições de cultura *in vitro* padrão. Após esse período determinou-se o IC50 através da atividade metabólica das células. Logo após foi realizado o ensaio da Anexina-V-FITC/ Iodeto de propídio nas linhagens caninas, avaliando através da citometria de fluxo as células com apoptose mediata e tardia. Com os resultados obtidos constataram uma concentração inibitória média de ERCBD (3,437; 3,577) e ERTHC (4,909;4,486) em PC1 e PC2 respectivamente, e ERCBD (21,49) e ERTHC (18,69) na linhagem LNCAP. Ainda, observamos o efeito apoptótico dos dois extratos

nas células de carcinoma prostático canino. Mais estudos devem ser feitos, para avaliar o mecanismo de morte celular e seu potencial de uso *in vivo*

Palavras chave: fitoterápico; câncer de próstata; canabinoide.

ABSTRACT

Prostate carcinoma is the second most common type of cancer among men in Brazil, and is reported in dogs between 8 and 10 years of age, with rapid evolution and metastatic potential to regional lymph nodes, lungs and bones. CBH and THC showed an anti-tumoral effect in human and canine cell lines. We investigated the cytotoxic effect of extracts from two *Cannabis sativa* extracts, one rich in CBD (ERCBD) and the other rich in THC (ERTHC), on malignant prostatic cell lines from dogs (PC1 and PC2) and men (LNCAP), as well as the effect evaluation for the induction of apoptosis in the two canine cell lines. To evaluate the cytotoxicity, the MTT assay was used, with doses of 2.5µM, 5µM, 7.5µM and 10µM of both compounds in the canine cells line and 10µM, 20µM, 30µM and 40µM of both compounds in the human cell line. Both were incubated for 24 hours in 96-well plates. The IC₅₀ was determined through the metabolic activity of the cells. Soon after, the Annexin-V-FITC/propidium iodide assay was performed in the canine PC cell lines, evaluating cells with mediate and late apoptosis through flow cytometry. We showed that ERCBD and ERTHC obtained an average inhibitory concentration of 3.437; 3.577 and 4.909; 4.486 in PC1 and PC2 respectively, and ERCBD (21.49) and ERTHC (18 ,69) in the LNCAP cell line. , We also observed an apoptotic effect on the canine cell lines for both cannabis extracts. Further research should be made to evaluate the cell death mechanism as well as the *in vitro* use as an anti neoplastic agent.

Keywords: herbal medicine; prostate cancer; cannabinoid.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o câncer com maior prevalência entre os homens no mundo ocidental e houve um aumento significativo nos últimos anos, sendo a segunda maior causa de morte (SIEGEL *et al.*, 2020). Para o Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer, sendo 72 mil cânceres de próstata, na região sudeste 77,89 diagnósticos são realizados a cada 100 mil homens (INCA, 2023).

O uso de modelos experimentais (*in vivo* e *in vitro*) para o avanço da oncologia humana e animal é bem estabelecido, com o intuito de avaliar o desenvolvimento de testes de ação e seguranças de fármacos; alterações moleculares relacionadas à fatores prognósticos e preditivos (DEWHIRST; PAGE, 2020).

Os modelos naturais são de grande valia no avanço da oncologia comparada. As similaridades de morfologia, ocorrência, sítios metastáticos e a convivência no mesmo ambiente, torna o cão uma excelente sentinela ambiental e modelo para o estudo do carcinoma prostático (DALLECK *et al.*, 2016).

O carcinoma prostático canino (CP) acomete animais entre 8 e 10 anos de idade, e apenas esporadicamente cães jovens. A castração não parece ter qualquer efeito protetor sobre a próstata canina em relação ao desenvolvimento de neoplasia, com os animais castrados tendo a mesma ou maior prevalência de neoplasia prostática quando comparados aos cães intactos (SMITH, 2008).

Os CP do cão são localmente invasivos e metastatizam rapidamente para os linfonodos regionais (ilíacos, pélvicos e sublobares), pulmões e ossos. Metastatizam frequentemente para os ossos, a bexiga, o cólon e os tecidos adjacentes por meio de extensão direta. Além disso, outros órgãos podem ser alvos de metástase, como: fígado, baço, rins, coração e glândulas adrenais. Quando presentes no tecido ósseo, podem promover dor ou fraturas patológicas. As vértebras lombares e a pelve são os locais mais frequentemente envolvidos (NORTHREP *et al.*, 2009).

A atividade anti-tumoral da cannabis foi avaliada em diferentes linhagens celulares de neoplasia humana, com resultados promissores na redução da proliferação celular e invasão, além do aumento do apoptose e melhora da resposta imune do hospedeiro (BODINE; KEMP, 2022). Estudos *in vitro* com uso de CBD e linhagens de células neoplásicas caninas são escassos.

Autores já avaliaram o efeito de CBD sobre cinco linhagens celulares caninas: uma de carcinoma de mama (CMT-12), uma de linfoma B (17-71) e três de osteossarcoma (D17, HMPOS e Abrams). O efeito do CBD sozinho ou em combinação com quimioterápicos usualmente indicados levou a redução da proliferação celular, especialmente por induzir autofagia e apoptose das células neoplásicas (HENRY *et al.*, 2020).

Em linhagens de células de carcinoma urotelial canino (AXA, Orig e SH), o uso de CBD reduziu a viabilidade celular e induziu a apoptose. Ainda, a combinação de CBD

com mitoxantrona e vimblastina reduziram significativamente a viabilidade celular e incrementaram a taxa de apoptose, comparado com o uso de um único agente, porém não com a carboplatina e inibidores seletivos de COX-2, fármacos de uso frequente em cães com esta afecção. Os autores sugerem um uso promissor de CBD de forma isolada ou em associação com protocolos quimioterápicos convencionais (INKOL *et al.*, 2021)

No câncer de próstata, a expressão do receptor CB1 pelas linhas celulares de câncer de próstata humano LNCaP (sensível a andrógeno), DU145 e PC3 (independente de andrógeno) é maior do que a observada em células epiteliais da próstata humana normal (SARFARAZ *et al.*, 2005). Isso foi confirmado em espécimes de carcinoma de próstata, onde a expressão dos receptores CB1 e TRPV1 é regulada positivamente e se correlaciona com graus crescentes de tumor (CZIFRA *et al.*, 2009). Também foi demonstrado que o nível de CB1 no tecido tumoral está associado à gravidade da doença no diagnóstico e no resultado (CHUNG *et al.*, 2009).

Tendo em vista que o CP canino é uma doença de caráter progressivo, com diagnóstico reservado e os protocolos utilizados apenas retardam a progressão da doença, e possuem efeitos colaterais agressivos (VLASIN *et al.*, 2006) e frente ao potencial do uso dos extratos de *Cannabis sativa* no tratamento do câncer de próstata, o presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta anti-tumoral do extrato rico em canabidiol (ERCBD) e extrato rico em tetrahidrocanabinol (ERTHC), em linhagens tumorais de carcinoma prostático canino e humano.

MATERIAL E MÉTODOS:

Linhagens celulares e cultura celular

Utilizou-se duas linhagens celulares de carcinoma prostático canino, PC1 e PC2, previamente caracterizadas (COSTA *et al.*, 2019). A PC1 é oriunda de neoplasia prostática não metastática de um cão intacto, sem raça definida. Já a PC2 foi estabelecida a partir de um carcinoma prostático metastático, de um cão macho, intacto, Poodle de 11 anos de idade (Figuras 1A e 1B). A linhagem humana utilizada é do banco de tumores - LNCAP, um adenocarcinoma de próstata humano sensível a andrógenos derivados da metástase do linfonodo supraclavicular esquerdo de um homem caucasiano de 50 anos em 1977 (HOROSZEWICZ *et al.*, 1980), gentilmente fornecida pela Dra Flavia Karina Delella, do Laboratório de Matriz extracelular – LabMEC, IBB, Unesp, Botucatu. Todas as linhagens testaram negativo para *Mycoplasma* sp.

As células foram cultivadas em frascos de cultivo de 75 cm² para expansão, mantidas em meio DMEM- Ham's F-12 (LGC Biotechnology, Cotia, SP, Brasil) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, LGC Biotechnology, Cotia, SP, Brasil), 1% de gentamicina 0,5% e solução de antibiótico-antimicótico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) mantidas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C.

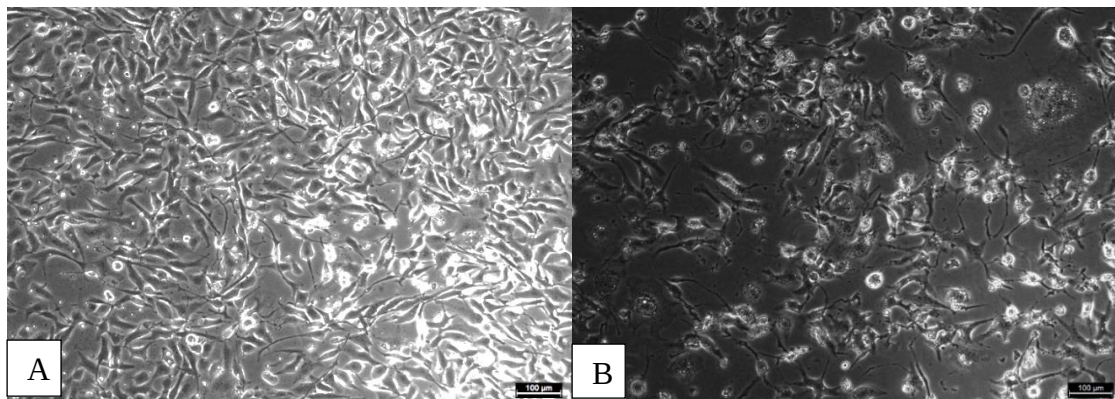


Figure 1 Fotomicrografia celular da linhagem carcinoma prostático canino PC1 (A) e PC2 (B) 100x.

Obtenção dos extratos

Os extratos ricos em canabidiol (ERCBD) e Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (ERTHC) foram obtidos através de parceria com a ONG Maria Flor (Marília, SP, BRASIL). A pureza do extrato foi avaliada pela técnica de HPLC, pela empresa DALL. Os extratos foram diluídos em dimetil sulfoxido (DMSO) na proporção 1:1, filtrados e diluídos em meio de cultura celular para chegar na dose de trabalho de 100µM de CBD no ERCBD e 100µMde THC, no ERTHC (Anexo 1).

Tratamento e avaliação da atividade metabólica celular

Para avaliar o efeito citotóxico, a concentração inibitória média (IC₅₀) do ERCBD e do ERTHC nas células de carcinoma prostático canino e humano, foi realizado o teste colorimétrico de viabilidade celular in vitro (MTT). O teste é baseado na fragmentação do sal amarelo de tetrazólito {MMT [Brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazólito]} em cristais roxos por células metabolicamente ativas. As linhagens PC1, PC2 e LNCAP foram expandidas até a confluência de 80%, realizada a desagregação com tripsina e EDTA, centrifugadas e as células viáveis foram contadas utilizando a solução de azul de tripam 0,2% com auxílio de um microscópio óptico e câmara de Neubauer. As células foram adicionadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células/poços em 100 µL de meio de cultura sem soro fetal bovino e incubadas por 24h em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, o meio foi substituído por meio de cultura sem SFB contendo

os respectivos extratos: ERCBD e ERTHC, em diferentes concentrações de 2,5 µM, 5 µM, 7,5 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM; sendo utilizados 6 poços por concentração, diluídos em DMEM. Dois grupos controles foram utilizados: DMEM sem soro fetal bovino e veículo DMSO, na maior concentração. As placas foram incubadas por 24h após este período foi adicionado 100 µL de solução de MTT, seguindo-se as recomendações do fabricante (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio), Sigma-Aldrich, USA).

Os valores de absorbância na faixa de 570nm foram obtidos em leitor de microplaca (Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader, Biochrom Ltd., Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA). Os valores de viabilidade celular foram calculados de acordo com a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(A \text{ tratamento} - A \text{ branco})}{(A \text{ diluente} - A \text{ branco})} \times 100\%$$

Considerando: A= absorbância, Diluente = DMSO, Branco= sem células, poço com DPBS.

As análises estatísticas das comparações entre as diferentes doses de tratamento foram feitas utilizando Teste T e significância estatísticas considerada se $p < 0.05$, no programa Graph Prisma (GraphPad Software, San Diego, California USA).

Ensaio anexina V-fitc/iodeto de propídeo

O ensaio de anexina V e Iodeto de propídio foi escolhido para determinar a porcentagem de apoptose e morte celular por necrose induzida pelos tratamentos apresentados. O procedimento consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células no processo final do apoptose.

Desta forma, células em apoptose inicial demonstram marcação somente para Anexina-V (AN+) / (PI-), células em apoptose tardia aquelas com dupla marcação de Anexina V e PI (An+) / (PI+), células mortas com marcação de Iodeto de propídio somente (An-)/(Pi+) e células viáveis as que não apresentam nenhuma marcação.

As linhagens de células de carcinoma prostático canino (PC1, PC2) foram cultivados até confluência de 80%, seguidas de desagregação enzimática por tripsina. Foram contabilizadas 1×10^6 células e estas incubadas em frasco de 25 cm² por 24h em incubadora de CO₂ (5%) a 37,5°C.

Foram realizados grupos controles para os reagentes e calibração do citômetro de fluxo (células sem tratamento e células mortas com DMSO 5%), bem como os grupos

tratados com ERCBD (24h), ERTHC (24h), as doses utilizadas foram as estabelecidas pelo IC50 do MTT. Após a incubação, cada sobrenadante foi centrifugado e adicionado das células desagregadas.

As suspensões de células [1×10^6 células/mL] foram realizadas com bidding buffer 4x (Tampão de Ligação de Anexina) para análise de apoptose. Para isso, 5µL de Anexina V com APC-conjugado (Sigma 22 Aldrich, USA), 5µL de Iodeto de Propídeo (concentração final de 1.5µM) (Sigma 22 Aldrich, USA). E cautelosamente foram agitadas em vórtex de tubo de ensaio.

Todas as amostras foram incubadas por 15 min em câmara escura à 37°C. A citometria de fluxo foi realizada com equipamento Fortessa LSR (Becton Dickinson, Mountaus View, CA, USA) com laser azul de 488nm, laser vermelho de 640nm e laser violeta de 405nm. As configurações de filtro para os PMTs que medem a emissão de fluorescência dos fluorocromos aplicados foram 694/50 nm (IP); 620/20 (Anexina-APC).

Foram realizados 30.000 eventos/células por amostra. Os dados gerados foram dispostos em gráfico de plotagem de contorno incluindo eixo $< 0t$ (biexponencial) tornando todos os eventos visíveis e devidamente compensados através do software BD FACSDiva™ v6.1 (Becton Dickinson).

A análise dos dados e os gráficos foram realizadas pelo software Graphpad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

RESULTADOS

Tratamento e avaliação da atividade metabólica celular por MTT e determinação de IC50 após tratamentos

O ERCBD apresentou diminuição da atividade metabólica celular dose dependente nas duas linhagens caninas obtendo-se o IC50 de 3,43 µM para PC1 (Figura 2A) e 3,577µM para PC2 (Figura 2B). A proximidade das doses demonstra uma sensibilidade comum ao tratamento entre as duas linhagens. Já na linhagem de carcinoma prostático humano, LNCAP (Figura 2C) o IC50 foi de 21,49.

Para o ERTHC a IC50 foi de 4,909µM para a linhagem PC1 (Figura 3A) e 4,486µM para PC2 (Figura 3B), com efeito dose dependente. Já para a LNCAP (Figura 3C) o IC50 foi de 18,69 µM.

Após o tratamento de 24 horas com ERCBD e ERTHC houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de células viáveis nas linhagens PC1, PC2 e LNCAP em comparação com o grupo controle (Figuras 2C, 2D e 2E).

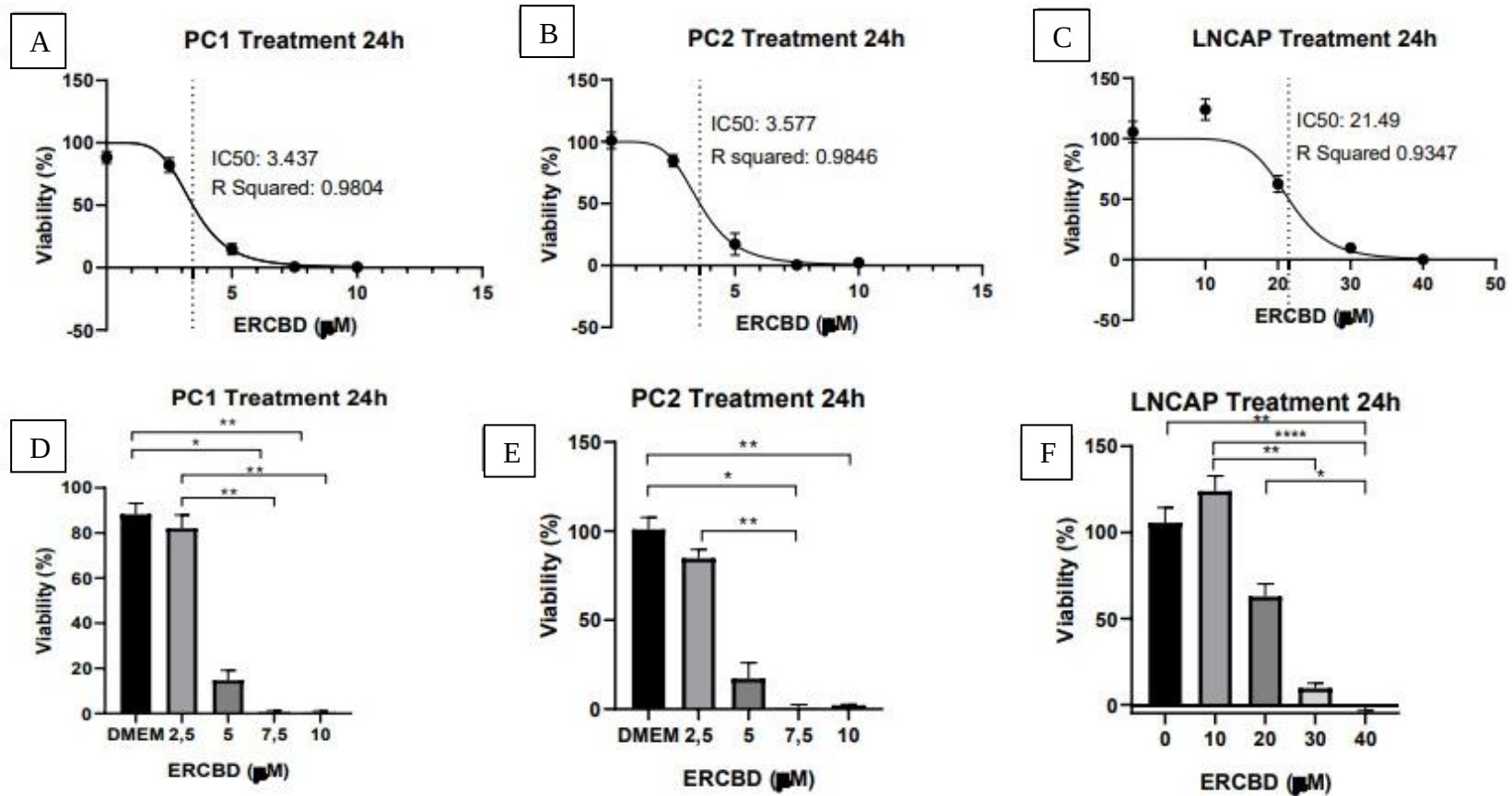


Figure 2 Viabilidade celular das linhagens PC1 (A e D), PC2 (B e E) e LNCAP (C e F) de carcinoma de próstata canino e humano. Curva de regressão não-linear e definição da IC50, comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em CBD. O teste t de Student foi usado para comparar dois grupos; ANOVA com teste estatístico de kruskal-wallis de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar cinco grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

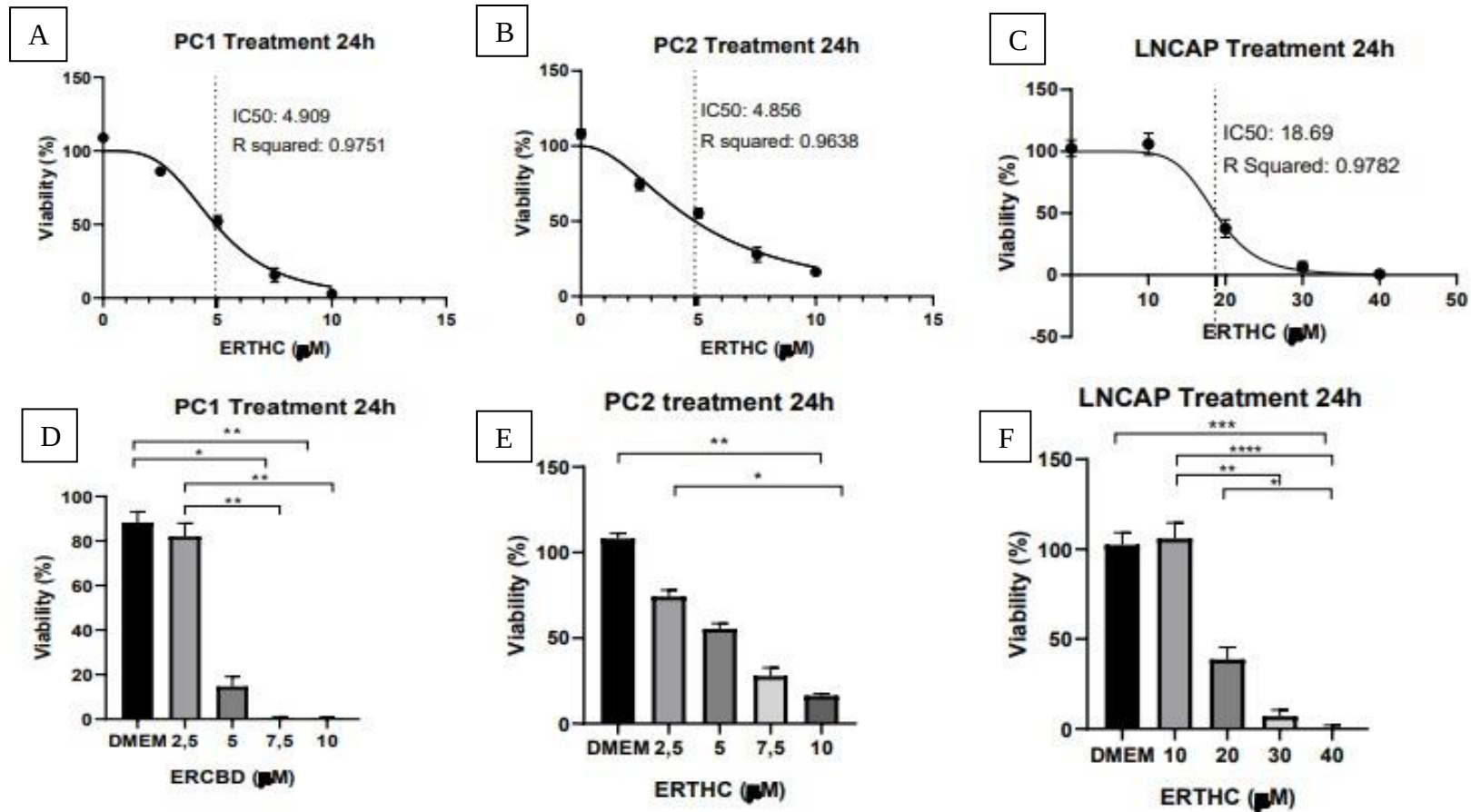


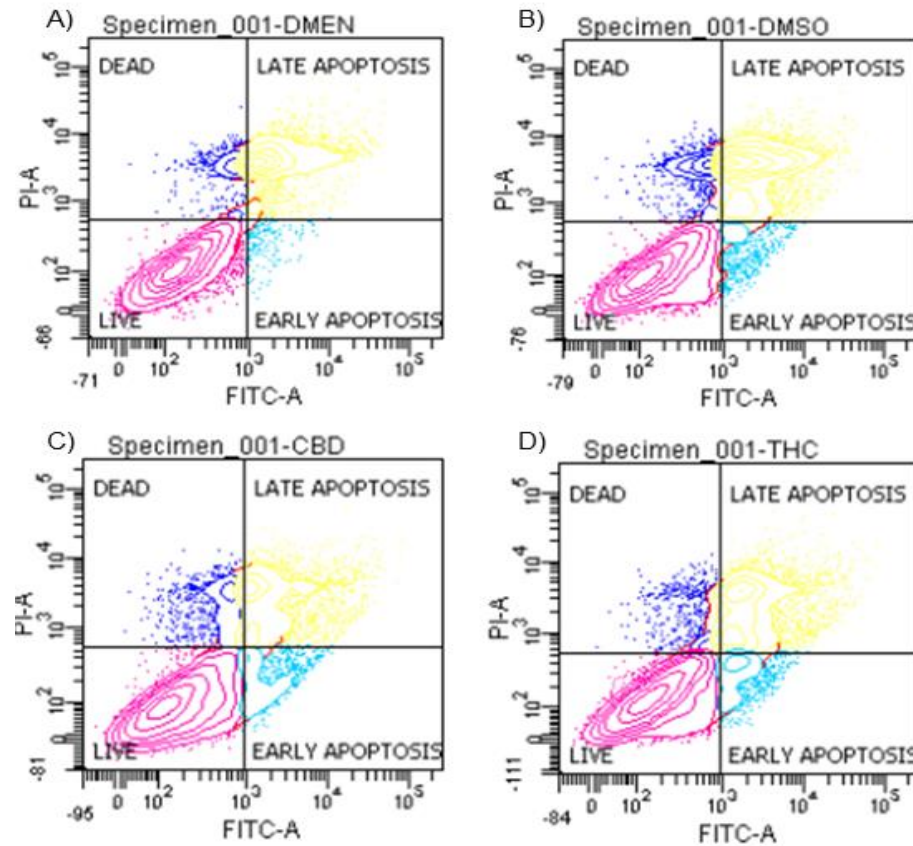
Figure 3 Viabilidade celular das linhagens PC1 (A e D), PC2 (B e E) e LNCAP (C e F) de carcinoma de próstata canino e humano. Curva de regressão não-linear e definição da IC50, comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em THC. O teste t de Student foi usado para comparar dois grupos; ANOVA com teste estatístico de kruskall-wallis de comparações múltiplas de Tukey foi usado para comparar cinco grupos. *p < 0,05; **p < 0,01; **** p < 0,0001.

Ensaio anexina V-fitc/iodeto de propídeo para tratamento das linhagens PC1 e PC2.

A tabela 1 demonstra os resultados obtidos dos tipos de morte celular nas duas linhagens caninas. Na linhagem canina PC1 observamos uma redução do número de células viáveis, sendo o principal mecanismo de morte a necrose, seguido de apoptose tardia, tanto para o ERCBD, quanto ERTHC. Já para a linhagem PC2, a morte celular foi menor do que o percentual de células viáveis. Dentre os tipos de morte celular, a apoptose tardia foi a que apresentou maior percentual de células, para ambos os tratamentos (Figuras 3 e 4).

Tabela 1 Percentual de células mortas e viáveis de acordo com o ensaio de anexina V/iodeto de propídeo para as linhagens de carcinoma prostático canino (PC1 e PC2) após tratamento com extrato rico em CBD e THC.

	PC1		PC2	
	ERCBD	ERTHC	ERCBD	ERTHC
Apoptose inicial	4.4%	5.2%	7.4%	8.2%
Apoptose tardia	20%	20%	17.2%	24.6%
Necrose	36%	27%	8%	6%
Células viáveis	39.6%	47,80%	67.4%	61.2%



PC1 24h Apoptosis Assay

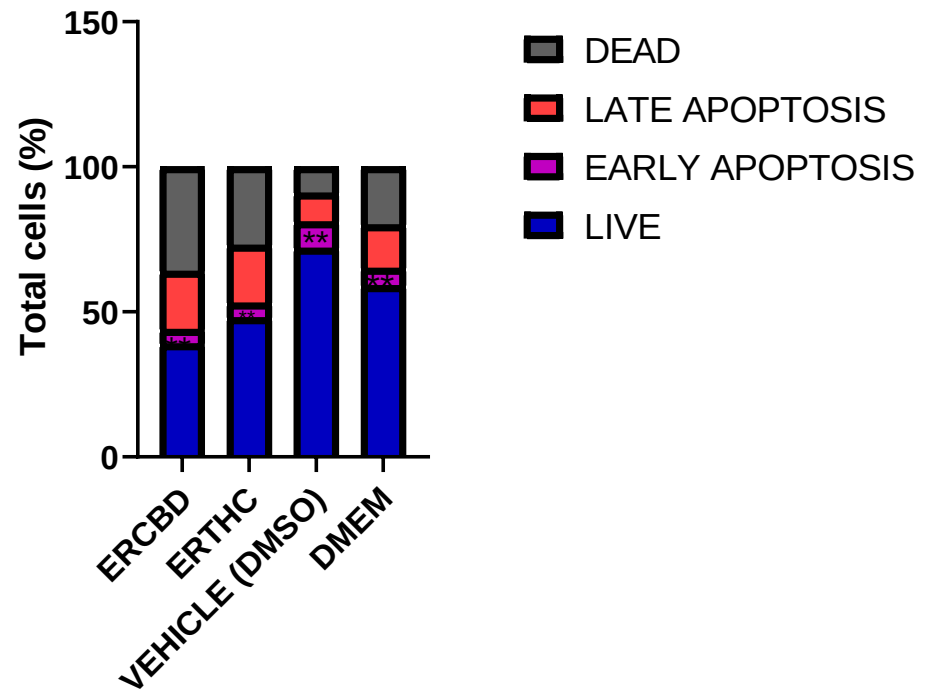
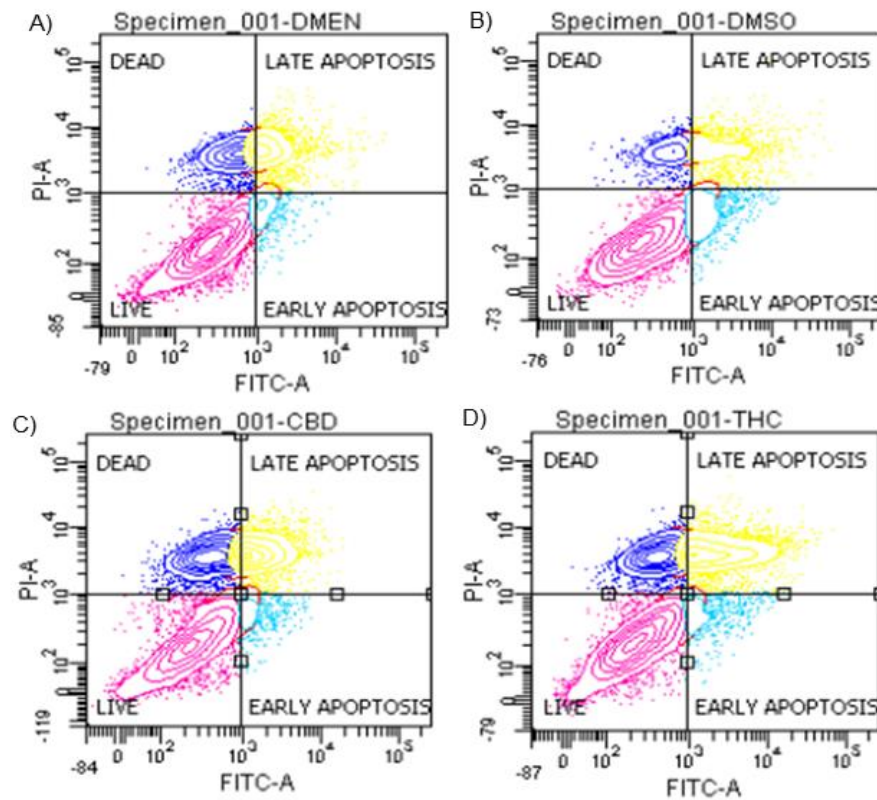


Figure 4 Ensaio de apoptose por Anexina V/Fitc e iodeto de propídio da linhagem PC1 de carcinoma de próstata canino. Comparação das doses de IC50 (ERCBD e ERTHC), Controle (DMEM), Veículo (DMSO), comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em THC. O teste t de Student foi usado para comparar os quatro grupos, com base no grupo controle; ANOVA com teste estatístico de kruskall-wallis de comparações múltiplas foi usado para comparar quatro grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



PC2 24h Apoptosis Assay

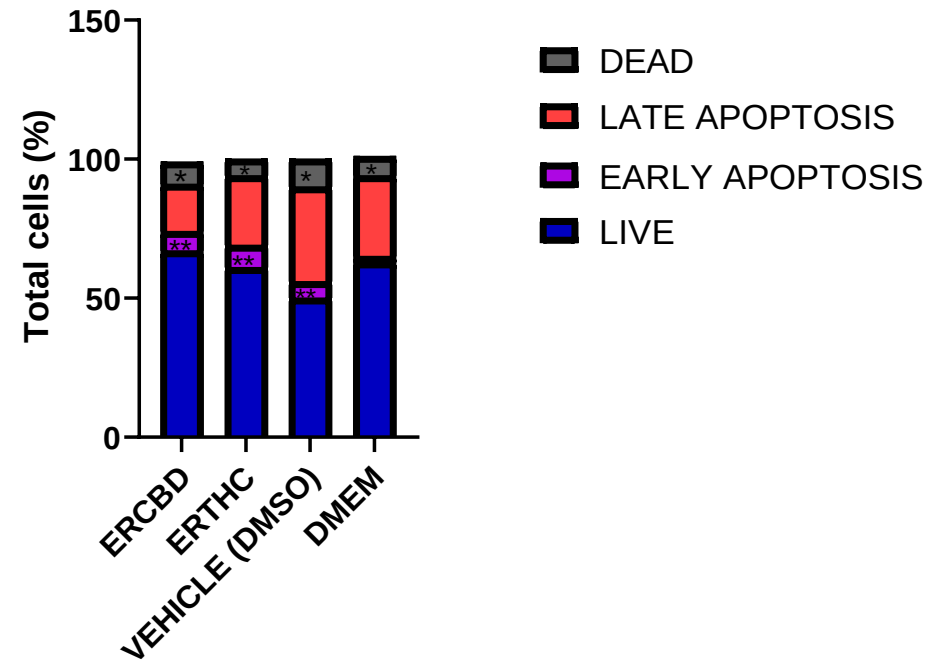


Figure 5 Ensaio de apoptose por Anexina V/Fitc e iodeto de propídio da linhagem PC2 de carcinoma de próstata canino. Comparação das doses de IC50 (ERCBD e ERTHC), Controle (DMEM), Veículo (DMSO), comparando as doses entre si, após 24 horas de exposição tratamento com extrato rico em THC. O teste t de Student foi usado para comparar os quatro grupos, com base no grupo controle; ANOVA com teste estatístico de kruskall-wallis de comparações múltiplas foi usado para comparar quatro grupos. *p < 0,05; **p < 0,01.

DISCUSSÃO

Com o estudo foi possível perceber que, houve uma curva dose-resposta no tratamento das doses utilizadas, chegando a uma dose inibitória média confiável (ERCBd (3,437; 3,577) e ERTHC (4,909;4,486) em PC1 e PC2 respectivamente, e ERCBD (21,49) e ERTHC (18,69) para LNCaP. Os resultados apresentados com os extratos ricos em CBD e THC são inéditos em linhagens de carcinoma prostático canino e humano, demonstrando o uso potencial de CBD ou THC como agente antitumoral. As duas linhagens caninas não demonstraram uma diferença de dose resposta entre si, porém a linhagem humana apresentou resultados distintos das linhagens de cães, com uma IC mais elevada para o ERCBD e ERTHC. Estudos como este trazem a importância da oncologia comparada, a fim de avaliar o mecanismo de ação desses compostos entre as espécies, bem como a necessidade de testes para cada espécie.

Apesar dos resultados promissores na dose resposta para as linhagens de carcinoma prostático canino, a resposta do tipo de morte celular foi heterogênea e mesmo o percentual de células mortas e viáveis. A linhagem PC2 foi mais resistente a morte celular do que a PC1. Resultados semelhantes foram demonstrados em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (KOBAYASHI et al., 2020), sendo a PC2 mais agressiva e menos responsiva ao tratamento com Toceranib. Em ambos os estudos os resultados podem ser justificados pela agressividade tumoral, já que a linhagem PC2 era proveniente de um animal com CP metastático.

Em carcinoma prostático, particularmente nos mais agressivos, em que o paciente já apresenta metástase ou estágio avançado de doença com tumor hormônio independente (resistente a castração), existe evidências de que as vias intrínsecas de apoptose estão defeituosas (CAMPBELL *et al.*, 2021).

Mecanismos de resistência a drogas em células neoplásicas incluem diminuição nas vias de sinalização de morte celular por apoptose (TODARO *et al.*, 2008). As linhagens de carcinoma prostático canino PC1 e PC2 apresentam uma alta expressão gênica de *MDR1*, um gene ligado a resistência a múltiplas drogas. A expressão de *MDR1* foi 19 e 13 vezes maior, para PC1 e PC2, respectivamente, do que uma linhagem de mama canina sabidamente multirresistente a drogas (dados não apresentados neste estudo).

Após o tratamento com canabinóides, a apoptose pode ser induzida pela via intrínseca (que é mediada pela mitocôndria) ou pela sinalização de receptores de morte

na superfície celular (SHRIVASTAVA *et al.*, 2011). Neste estudo, mostramos que os extratos ricos em CBD e THC induziram a apoptose (mediata e tardia) e a necrose em células de câncer de próstata canino. Já observado, os canabinóides afetam os mecanismos de morte celular em diferentes linhagens de células de câncer de mama, hepatócitos e células de câncer de próstata (GUZMAN, 2003).

Estudos mostraram que o canabidiol (CBD) promoveu significativamente a apoptose celular e alterações nas proteínas gênicas relacionadas à apoptose celular *in vitro* em linhagens de osteossarcoma e também a administração de canabidiol inibiu o crescimento tumoral e promoveu a apoptose de células de osteossarcoma em um modelo de xenoenxerto de camundongo (XU *et al.*, 2022). Como observado a maior taxa de apoptose encontrada com ERCBD foi a apoptose tardia, porém também podemos observar uma taxa significativa de apoptose imediata, o que traz mais segurança para um possível uso *in vivo*, pois uma vez iniciada a apoptose, as células cancerígenas entrarão em um estado de dormência e parará a multiplicação celular (ZIPS *et al.*, 2005).

O $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC), o principal componente ativo da maconha, em seus primeiros ensaios na oncologia, induziu apoptose em células de glioma, conforme determinado pela fragmentação do DNA e perda da assimetria da membrana plasmática. Sem alterações dos receptores *CB1* (receptor canabinóide 1) em culturas de glioma de camundongos (SANCHES *et al.*, 1998). No estudo de RUIZ *et al.*, (1999), o $\Delta 9$ -THC promoveu a apoptose em células PC-3 da próstata humana de maneira dose-dependente, para determinar se o receptor *CB1/CB2* governa esse efeito, o efeito apoptótico do $\Delta 9$ -THC foi examinado na presença do antagonista canabinóide do receptor *CB1*, AM 251, porém não houve a prevenção da morte celular, podendo o receptor canabinoide *CB2* regular a via antiproliferativa no câncer de próstata.

CONCLUSÃO

Os extratos ricos em CBD e THC apresentam efeitos promissores nas células de carcinoma prostático canino e humano. O estudo trouxe inovação no conhecimento das doses inibitórias. Mais estudos devem ser realizados para avaliar os possíveis mecanismos de interação com quimioterápicos convencionais, ensaios de apoptose celular, além do efeito desses compostos *in vivo*.

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas etapas ainda serão realizadas, como a avaliação da migração celular pelo ensaio de Transwell, também será realizado o *rt-PCR* para avaliar a expressão de genes marcadores tumorais.

A expressão do *CB1* (receptor canabinóide 1) em vários tecidos da próstata humana e em linhas celulares LNCaP e PC3 já foi observada, independentemente de as amostras serem benignas ou malignas (KAMIYAMA et al., 2013). Como já é de conhecimento, o THC tem a capacidade de modular o sistema endocanabinoide e com presente estudo, podemos observar que a modulação desse mecanismo pode levar a indução da perda de mecanismos de sobrevivência das células tumorais e leva-las a apoptose ou necrose. Será realizado ensaios como RT-PCR das linhagens de carcinoma de próstata canino do estudo para verificar a regulação de genes *que* estão envolvidos nas alterações adaptativas do carcinoma de próstata, e para melhor avaliação da ação do sistema endocanabinóide nessas células será feito a imunocitoquímica com receptor *CB2*, antes e após o tratamento com a dose do IC50 dos extratos do estudo.

Estudos a respeito do microambiente tumoral, regulação e expressão gênica e também a necessidade de comparação da resposta antitumoral entre as linhagens de células de carcinoma prostático humano e canino são necessários para melhor embasamento da utilização *in vivo* destes compostos, e também, cada organismo se comporta de maneira diferente a exposição dos canabinoides, o que torna difícil a definição de uma dose exata para os devidos tratamentos.

Com os resultados *in vitro* da resposta inibitória e a indução do apoptose das linhagens, é necessário complementar o estudo com os fitoterápicos associados com a terapia quimioterápica de eleição em busca de avaliar o comportamento do quimioterápico com o composto, também se faz necessário estudos *in vivo* para um conhecimento, aplicação clínica dos compostos e uma avaliação sistemática do paciente. Trabalhos com linhagens de carcinoma prostático canino ainda são escassos na literatura, o presente estudo desperta interesse sobre o potencial uso terapêutico dos compostos canabinóides em carcinoma de próstata canino e humano.

Os extratos de Cannabis, rico em CBD e THC, apresentaram valores de IC50 similares entre as linhagens caninas utilizadas nos ensaios, portanto, futuramente, pode-se tornar um facilitador na padronização e auxiliar nos protocolos terapêuticos em estudos

in vivo. Ainda se mantem escassos na literatura estudos a respeito da biodisponibilidade dos extratos nos organismos.

***REFERÊNCIAS**

ALONGE, S. et al. Advances in prostatic diagnostics in dogs: The role of canine prostatic specific esterase in the early diagnosis of prostatic disorders. **Topics in companion animal medicine**, v. 33, n. 4, p. 105-108, 2018.

ARMBRUSTER, D. A. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 181-195, 1993.

AYALA, A. G.; RO, J. Y. Prostatic intraepithelial neoplasia: recent advances. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 131, n. 8, p. 1257-1266, 2007.

BATTISTA, N. *et al.* The endocannabinoid system: an overview. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, p. 9, 2012.

BERTHOLD, D. R. *et al.* Survival and PSA response of patients in the TAX 327 study who crossed over to receive docetaxel after mitoxantrone or vice versa. **Annals of Oncology**, v. 19, n. 10, p. 1749-1753, 2008.

BODINE, M.; KEMP, A. K. Medical cannabis use in oncology. In: **StatPearls [Internet]**. StatPearls Publishing, 2022.

BOOKSTEIN, R. *et al.* p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. **Cancer Research**, v. 53, n. 14, p. 3369-3373, 1993.

BOSTWICK, D. G.; RAMNANI, D.; QIAN, J. Prostatic intraepithelial neoplasia: animal models 2000. **The Prostate**, v. 43, n. 4, p. 286-294, 2000.

CAIRNS, P. *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. **Cancer Research**, v. 57, n. 22, p. 4997-5000, 1997.

CAMPBELL, K. J.; LEUNG, H. Y. Evasion of cell death: A contributory factor in prostate cancer development and treatment resistance. **Cancer Letters**, v. 520, p. 213-221, 2021.

CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal de Pneumologia**, v. 27, p. 321-328, 2001.

CARDOSO, S. R.. Canabidiol: estado da arte e os caminhos para a regulamentação no Brasil. 2019.

CARLINI, E. A. A história da maconha no Brasil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 55, p. 314-317, 2006.

CASTRO, H. A. S. de *et al.* Contribuição da densidade do PSA para predizer o câncer da próstata em pacientes com valores de PSA entre 2, 6 e 10, 0 ng/ml. **Radiologia Brasileira**, v. 44, p. 205-209, 2011.

CAVALCA, A. M. B. *et al.* P-Glycoprotein and Androgen Receptor Expression Reveals Independence of Canine Prostate Cancer from Androgen Hormone Stimulation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1163, 2022.730, 2022.

CHUNG, S. C. *et al.* A high cannabinoid CB1 receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 1, p. 174-182, 2009.

CORREIA-DA-SILVA, Georgina *et al.* Canábis e canabinóides para fins medicinais. **Revista Portuguesa De Farmacoterapia**, v. 11, n. 1, p. 21-31, 2019.

CORSATO ALVARENGA, Isabella *et al.* Scientific Validation of Cannabidiol for Management of Dog and Cat Diseases. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 11, p. 227-246, 2023.

CUNTO, M.; BALLOTTA, G.; ZAMBELLI, D. Benign prostatic hyperplasia in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 247, p. 107096, 2022.

CZIFRA, G. *et al.* Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, p. 507-514, 2009.

DALECK, C. R. *et al.* **Oncologia em cães e gatos** . Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016. 825-830.

DE ALMEIDA, J. R. C. *et al.* Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

- DE MARZO, A. M. *et al.* A working group classification of focal prostate atrophy lesions. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 10, p. 1281-1291, 2006.
- DE MARZO, A. M. *et al.* Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 6, p. 1985-1992, 1999.
- DEMARZO, A. M. *et al.* Pathological and molecular aspects of prostate cancer. **The Lancet**, v. 361, n. 9361, p. 955-964, 2003.
- DEVANE, W. A. *et al.* Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605-613, 1988.
- DEWHIRST, M. W.; PAGE, R. L. Emerging Translational Opportunities in Comparative Oncology with Companion Canine Cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 270, 2020.
- FASKHOUDI, M. A. *et al.* Molecular landscape of c-Myc signaling in prostate cancer: A roadmap to clinical translation. **Pathology-Research and Practice**, p. 153851, 2022
- FONSECA, B. M. *et al.* O Sistema Endocanabinóide—uma perspectiva terapêutica. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 2, n. 2, p. 37-44, 2013.
- FONSECA-ALVES, C. E. *et al.* Alterations of C-MYC, NKX3. 1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 12, p. 1250-1256, 2013.
- GARCIA, M. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumour progression of prostate cancer bone metastases in nude mice. **BJU International**, v. 113, n. 5b, p. E164-E177, 2014.
- GARG, R. *et al.* COX-2 mediates pro-tumorigenic effects of PKC ϵ in prostate cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 34, p. 4735-4749, 2018.
- GERDES, J. *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **The American Journal of Pathology**, v. 138, n. 4, p. 867, 1991.
- GERDES, J. *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.

GRASSINGER, J. M. *et al.* Detection of BRAF mutation in canine prostatic diseases. **Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/heimtiere**, v. 47, n. 5, p. 313-320, 2019.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, Florian R.; KARIN, Michael. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

GROSS, C. *et al.* Cannabidiol induces apoptosis and perturbs mitochondrial function in human and canine glioma cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 725136, 2021.

GUZMAN, M. Cannabinoids: potential anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 745-755, 2003.

HENRY, J. G. *et al.* The effect of cannabidiol on canine neoplastic cell proliferation and mitogen-activated protein kinase activation during autophagy and apoptosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 19, n. 2, p. 253-265, 2021.

HERMANSON, D. J.; MARNETT, L. J. Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, p. 599-612, 2011.

HINZ, B.; RAMER, R. Anti-tumour actions of cannabinoids. **British journal of pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1384-1394, 2019.

HOROSZEWICZ, J. S. The LNCaP cell line-a new model for studies on human prostatic carcinoma. **Prog Clin Biol Res**, v. 37, p. 115-132, 1980.

INKOL, J. M.; HOCKER, S. E.; MUTSAERS, A. J. Combination therapy with cannabidiol and chemotherapeutics in canine urothelial carcinoma cells. **Plos One**, v. 16, n. 8, p. e0255591, 2021.

JM, A A *et al.* PSA and hK2 in the diagnosis of prostate cancer. **Actas Urologicas Espanolas**, v. 32, n. 6, p. 575-588, 2008.

KAMIYAMA, M. *et al.* Distribution and Possible Function of Cannabinoid Receptor Subtype 1 in the Human Prostate. 2013.

KOBAYASHI, M *et al.* Establishment of a BRAF V595E-mutant canine prostate cancer cell line and the antitumor effects of MEK inhibitors against canine prostate cancer. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2023.

KOBAYASHI, P. E. *et al.* Transcriptome of two canine prostate cancer cells treated with Toceranib phosphate reveals distinct antitumor profiles associated with the PDGFR pathway. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 561212, 2020.

KRAKOWSKI, L. *et al.* Assessment of the possibility of using biomarkers (CCL11 and TGF-beta 1) in the diagnosis of prostate gland hyperplasia in dogs. **Theriogenology**, v. 192, p. 9-13, 2022.

KRISTIANSEN, Glen. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 125-141, 2012.

L DEAN, J.; E KNUDSEN, K. The role of tumor suppressor dysregulation in prostate cancer progression. **Current drug targets**, v. 14, n. 4, p. 460-471, 2013.

LANDA, L.; SULCOVA, A.; GBELEC, P. The use of cannabinoids in animals and therapeutic implications for veterinary medicine: a review. **Veterinárni Medicína**, v. 61, n. 3, 2016.

L'EPLATTENIER, H. F. *et al.* Regulation of COX-2 expression in canine prostate carcinoma: Increased COX-2 expression is not related to inflammation. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 21, n. 4, p. 776-782, 2007.

LEROY, B. E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 2, p. 149-162, 2009.

LIN, H.-Y.; PALMIERI, C. Is STAT3 and PTEN expression altered in canine prostate cancer?. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 2-3, p. 185-189, 2016.

LOEB, Stacy; CARTER, Herbert Ballentine. Early detection, diagnosis, and staging of prostate cancer. **Campbell-Walsh Urology**, v. 10, p. 2763-70, 2012.

MAIA, R. *et al.* Podemos usar a expressão de Ki67 para prever a agressividade do câncer de próstata? **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 49, 2022.

MARZO, V. Di; B., Maurizio; PETROCELLIS, L. De. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 771-784, 2004.

MATSUDA, L. A. *et al.* Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561-564, 1990.

MIGITA, N. Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012.

MOCHIZUKI, H. *et al.* BRAF mutations in canine cancers. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0129534, 2015.

MORRIS, S. M. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 511, n. 1, p. 45-62, 2002.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NAVONE, Nora M. *et al.* p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 20, p. 1657-1669, 1993.

PACKEISER, E. M. *et al.* Characterization of six canine prostate adenocarcinoma and three transitional cell carcinoma cell lines derived from primary tumor tissues as well as metastasis. **PLoS One**, v. 15, n. 3, p. e0230272, 2020.

PACLIKOVÁ, K.; KOHOUT, P.; VLASIN, M. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. **VETERINARNÍ MEDICINA-PRAHA-**, v. 51, n. 1, p. 1, 2006.

PALMIERI, C.; FONSECA-ALVES, C. E.; LAUFER-AMORIM, R. A Review on Canine and Feline Prostate Pathology. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

PELLATI, F. *et al.* *Cannabis sativa* L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

PEREIRA, k. G. *Et al.* Fatores associados à masculinidade no diagnóstico precoce do câncer de próstata: revisão narrativa. **Revista nursing**: v. 24, n. 277, p. 5803-5810, 2021.

PEREIRA, P. G. *et al.* O Uso do canabidiol em Paciente com Epilepsia. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 424-433, 2021.

PERTWEE, R. G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, v. 156, n. 3, p. 397-411, 2009.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873-884, 2003.

POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505-518, 2004.

PROGRAMA DE PLANTAS MEDICINAIS E TERAPIAS NÃO CONVENCIONAIS.

Universidade Federal de Juiz de Fora. 2015. Fitoterapia. Disponível em: <https://www.ufjf.br/proplamed/atividades/fitoterapia/>. Acesso: fevereiro de 2022.

QIU, X. et al. MYC drives aggressive prostate cancer by disrupting transcriptional pause release at androgen receptor targets. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 2559, 2022..

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014.

RICHARDSEN, E. *et al.* COX-2 is overexpressed in primary prostate cancer with metastatic potential and may predict survival. A comparison study between COX-2, TGF- β , IL-10 and Ki67. **Cancer Epidemiology**, v. 34, n. 3, p. 316-322, 2010.

RODRIGUES, M. M. P. *et al.* Neoplasia intra-epitelial prostática: aspectos morfológicos e moleculares. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 1, p. 19-25, 2010.

SÁNCHEZ, C. *et al.* Δ 9-Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in C6 glioma cells. **FEBS letters**, v. 436, n. 1, p. 6-10, 1998.

SARFARAZ, S. *et al.* Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. **Cancer Research**, v. 65, n. 5, p. 1635-1641, 2005.

SEKHOACHA, M. *et al.* Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and AutophagyCBD induces programmed cell death in breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1161-1172, 2011.

SIEGEL, R. *et al.* Cancer statistics, 2014. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SMITH, J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 375-383, 2008.

SORENMO, K. U. *et al.* Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 48-56, 2003.

TODARO, M. et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 4, p. 762-772, 2008.

TOLEDO, D. C. *et al.* Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1372-1377, 2010.

UMBAS, R. *et al.* Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. **Cancer Research**, v. 52, n. 18, p. 5104-5109, 1992

VLIETSTRA, R. J. *et al.* Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. **Cancer Research**, v. 58, n. 13, p. 2720-2723, 1998.

WANG, X. S. *et al.* Characterization of KRAS Rearrangements in Metastatic Prostate Cancer. **Cancer Discovery**, v. 1, n. 1, p. 35-43, 2011.

WATERS, D. J. *et al.* Workgroup 4: spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. **The Prostate**, v. 36, n. 1, p. 64-67, 1998.

WU, M. J. *et al.* Targeting KDM4B that coactivates c-Myc-regulated metabolism to suppress tumor growth in castration-resistant prostate cancer. **Theranostics**, v. 11, n. 16, p. 7779, 2021.

XU, F. *et al.* Cannabidiol promotes apoptosis of osteosarcoma cells in vitro and in vivo by activating the SP1-CBX2 axis. **American Journal of Translational Research**, v. 14, n. 2, p. 1188, 2022.

ZAMAN, A.; WU, Wei; BIVONA, Trever G. Targeting oncogenic BRAF: past, present, and future. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1197, 2019.

ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. **in vivo**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2005.

ANEXOS

	LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR VETERINÁRIO CNPJ: 26.782.173/0001-00 Caixa Postal 545 CEP 18618-970 Botucatu / SP diagnostico@ldmivet.com.br (14) 99624-8385
---	---

Botucatu, 21 de Janeiro de 2022

Resultado de Exame

Nome do Requisitante: Thayná Oliveira da Silva	
Data de coleta: não informado	Data de recebimento: 21/01/2022
Amostras recebidas: Sobrenadante de cultivo celular	
Técnica utilizada: PCR em tempo real (qPCR)	Patógeno: <i>Mycoplasma</i> spp.

Nas amostras recebidas:	
1. Identificação da amostra: Pool 1 (PC, G1, CM1, CM9, CIN) Resultado: Negativo	

Metodologia de Diagnóstico: - Extração do material genético com uso de Kit de extração de DNA com coluna sílica, seguindo as recomendações do fabricante. - Os primers reconhecem uma região conservada no gene ribossomal 16S bacteriano do gênero <i>Mycoplasma</i>. - Em todas as reações são usados controles positivos de um cultivo celular infectado, os quais foram sequenciados pelo método sanger e confirmados com 100% de identidade. Como controle negativo é usada água livre de ácidos nucleicos.

Responsabilidade técnica:

Dra. Ariani Cristina Almeida Romero

CRMV-SP: 25.166

FOR-145v01



Nº 0497.22

1 de 1

RELATÓRIO DE ENSAIO**CLIENTE:** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –
DCV/CGA**ORÇAMENTO/PROTOCOLO:** 0124.22**ENDEREÇO:** Rua Walter Maurício Correa, s/n – Unesp Botucatu – CEP 18618-681 - Botucatu**AMOSTRA:** Extrato rico em CBD diluído em DMSO (1:1)**LOTE:** Não Informado**DATA DE FABRICAÇÃO:** 01/2022**DATA DE VALIDADE:** Não Informado**AMOSTRAGEM:** Realizado pelo Cliente**DATA DE RECEBIMENTO:** 04/03/2022**REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS:** 16/03/2022**EMIÇÃO DOS RESULTADOS:** 21/03/2022**RESULTADOS**

Ensaio	Especificação do Cliente ¹	Resultado	Método
Determinação do Teor de CBD e THC por HPLC	Não Informada	CBD: 28,12% THC: 0,80%	BIN, A.; LAYTON, C.; HELMUELLER, S. Separation of 16 Cannabinoids in Cannabis Flower and Extracts using a reversed-phase isocratic HPLC method. Waters Corporation - USA, November, 2018 (POP.401)

¹. Referência: Interno


Gustavo Bertol
Gerente Técnico

Observação: A presente análise tem valor restrito à amostra recebida pela DALL.
As informações constantes neste Certificado são confidenciais e pertencentes ao solicitante.
É permitida a reprodução desde que integralmente e sem nenhuma alteração.
Conforme § 2º do Art. 6º da RDC 390 / 2020, a DALL deixa sob a responsabilidade da Contratante a transmissão para a Anvisa dos resultados analíticos presentes neste relatório caso pertençam a produtos monitorados pela agência.

FOR-145v01



Nº 0498.22

1 de 1

RELATÓRIO DE ENSAIO

CLIENTE: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –
DCV/CGA

ORÇAMENTO/PROTOCOLO: 0124.22

ENDEREÇO: Rua Walter Maurício Correa, s/n – Unesp Botucatu – CEP 18618-681 - Botucatu

AMOSTRA: Extrato rico em THC diluído em DMSO (1:1)

LOTE: Não informado

DATA DE FABRICAÇÃO: 01/2022

DATA DE VALIDADE: Não informado

AMOSTRAGEM: Realizado pelo Cliente

DATA DE RECEBIMENTO: 04/03/2022

REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS: 16/03/2022

EMIÇÃO DOS RESULTADOS: 21/03/2022

RESULTADOS

Ensaio	Especificação do Cliente ¹	Resultado	Método
Determinação do Teor de CBD e THC por HPLC	Não Informada	CBD: 0,11% THC: 34,07%	BIN, A.; LAYTON, C.; HELMUELLER, S. Separation of 16 Cannabinoids in Cannabis Flower and Extracts using a reversed-phase isocratic HPLC method. Waters Corporation - USA. November, 2018 (POP.401)

1. Referência: Interno


 Gustavo Bertol
Gerente Técnico

Observação: A presente análise tem valor restrito à amostra recebida pela DALL.
As informações constantes neste Certificado são confidenciais e pertencentes ao solicitante.
É permitida a reprodução desde que integralmente e sem nenhuma alteração.
Conforme § 2º do Art. 6º da RDC 390 / 2020, a DALL deixa sob a responsabilidade da Contratante a transmissão para a Anvisa dos resultados analíticos presentes neste relatório caso pertençam a produtos monitorados pela agência.