

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“DETERMINACIÓN *in vitro* DEL EFECTO
APOPTÓTICO DEL CANNABINOIDE WIN 55, 212,2
SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO
(HELA) - BOSTON 2015”

Tesis Presentada por:

Bach. Navarro Gonzales Pamela Carolina

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora:

Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar

Arequipa – Perú

2016



DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Mario Navarro Alfaro, quien fue y será un ejemplo de responsabilidad, perseverancia y mi gran inspiración para ser una mejor persona cada día.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por su amor, bondad y sus infinitas bendiciones, permitiéndome culminar mis estudios.

A mi madre, Heddy Gonzáles de Navarro, por su apoyo incondicional, sabios consejos, enseñanzas, mensajes de aliento y darme la oportunidad de estudiar una carrera profesional.

A mis hermanos Brian, Mario, Vicky y Américo, por su apoyo constante, consejos y ser los mejores ejemplos a seguir

A mi asesora Roxana Gutiérrez Aranibar, por brindarme su apoyo, tiempo y compartir sus conocimientos para resolver cada duda.

A la Universidad Católica de Santa María y la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por brindarme una educación de calidad. A mis docentes, quienes contribuyeron en mi formación académica, personal y social.

A la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa, que durante mi internado farmacéutico, me brindó sus conocimientos, apoyo, paciencia y amabilidad. A mi equipo de trabajo Kuljeet Singh y Daiane Silva, por su dedicación, empeño para la culminación de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT.....	XI
HIPÓTESIS	XIII
OBJETIVOS	XIV
CAPÍTULO I: MARCO TEORICO.....	1
1. CÁNCER	2
1.1 Definición:.....	2
1.2 Conceptos Básicos	3
1.3 Características de una célula cancerosa.....	4
1.4 Orígenes Moleculares del Cáncer.....	4
1.5 Cáncer de Cuello Uterino:.....	7
2. APOPTOSIS	11
2.1 Generalidades.....	11
2.2 Mecanismos Apoptóticos	13
2.3 Apoptosis como estrategia terapéutica	17
3. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	18
3.1 Generalidades.....	18
3.2 Sistema Endocannabinoide	21
3.3 Receptores Cannabinoides	22
3.4 Endocannabinoides	25
3.5 Mecanismo de acción de los cannabinoides	27
3.6 Efectos fisiológicos producidos por los cannabinoides:	28
3.7 Perspectivas Terapéuticas	29

3.8 WIN-55,212-2.....	30
3.9 AM251.....	30
1. MATERIALES	32
1.1 Material Biológico	32
1.2 Materiales de Vidrio.....	32
1.3 Materiales de Laboratorio	32
1.4 Equipos de Laboratorio.....	33
1.5 Reactivos.....	33
2. MÉTODOS	34
2.1 Cultivo Celular.....	34
2.2 Identificación de los receptores cannabinoides	36
2.3 Determinación de la viabilidad celular	41
2.4 Determinación de la actividad de la Caspasa 3.....	47
2.5 Análisis Estadístico	52
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1 Cultivo Celular.....	54
3.2 Identificación de los recetores CB ₁ y CB ₂	56
3.3 Determinación de la viabilidad celular:.....	60
3.4 Determinación de la actividad de la Caspasa 3.....	70
CONCLUSIONES	79
SUGERENCIAS	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Esquema Genético del papiloma virus tipo 16.....	9
Figura N° 2. Activación de una pro-caspasa	14
Figura N° 3. Vía extrínseca e intrínseca del proceso apoptótico.	17
Figura N° 4. Estructura química del cannabinoide THC	20
Figura N° 5. Estructura química del cannabinoide CBD.....	20
Figura N° 6. Estructura 2D del receptor CB ₁	23
Figura N° 7. Estructura 2D del receptor CB ₂	24
Figura N° 8. Estructura química de N-araquidonil-etanolamida (AEA).....	25
Figura N° 9. Estructura química del cannabinoide WIN 55,212-2	30
Figura N°10. Estructura química del antagonista cannabinoide AM251	30
Figura N°11. Fundamento del método Western Blot	37
Figura N°12. Fundamento químico del método de cuantificación proteica BCA.	38
Figura N°13. Fundamento químico del ensayo MTS.	41
Figura N°14. Esquema Resumen del protocolo del ensayo MTS	44
Figura N°15. Fundamento químico del método para identificar la actividad de la Caspasa 3.	47
Figura N°16. Imagen microscópica del cultivo de células de cáncer de cuello uterino (HeLa, ATCC) capturada el primer día de cultivo.....	55
Figura N°17. Imagen microscópica del cultivo de células de cáncer de cuello uterino (HeLa, ATCC) capturada al cuarto día de cultivo.	55
Figura N°18. Curva de Calibración para determinación la concentración proteica.	56
Figura N°19. Bandas obtenidas con el anticuerpo CB ₁ (53 kDa) en las Células HeLa.	69
Figura N°20. Bandas obtenidas con el anticuerpo CB ₂ (60 kDa) en las células HeLa.	58
Figura N°21. Efecto del WIN-55,212-2 en las células de cáncer de cuello uterino (HeLa)	62
Figura N°22. Efecto del agonista no selectivo WIN-55,212-2 en presencia del antagonista selectivo para el receptor CB ₁ AM251 en células de cáncer de cuello uterino (HeLa).	67
Figura N°23. Incremento (%) de la actividad de la Caspasa 3 en 6, 12, 18 y 24 horas.	72
Figura N°24. Incremento (%) de la actividad de la Caspasa 3 en presencia del antagonista AM251 selectivo para CB ₁ en 6, 12, 18 y 24 horas.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
ATP:	Adenosin Trifosfato
GDP:	Guanosín difosfato
GTP:	Guanosín Trifosfato
THC:	Tetrahidrocannabinol
ASP:	Ácido Aspártico
VPH:	Virus del Papiloma Humano
FAAD:	Dominio de muerte asociado a Fas
TNF:	Factor de necrosis tumoral.
TRADD:	Proteína TNF asociada a un receptor de la muerte.
RAIDD	Interleukina asociada a un receptor de la muerte.
Δ^9 -THC:	Delta-9-tetrahydrocannabinol
AEA :	Anandamida
2-AG:	2-araquidonoilglicerol
CB ₁ :	Receptor cannabinoide tipo1
CB ₂ :	Receptor cannabinoide tipo 2
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
SNC:	Sistema Nervioso Central
SNP:	Sistema Nervioso Periférico
AA:	Ácido araquidónico
MAGL:	Monoacilglicerol lipasa
FAAH:	Ácidos grasos de amida hidrolasa
PKA:	Proteína Quinasa A.
TRPV1:	Receptor Vanilloide.

MAPK Proteína quinasas activada por mitógenos
URL Unidades Relativas de Luz.



RESUMEN

El cáncer representa una de las principales causas de muerte en el mundo. En el caso de nuestro país, esta enfermedad ocupa el segundo lugar, siendo el de mayor incidencia en mujeres, el cáncer de cuello uterino. Se han propuesto nuevos enfoques terapéuticos para tratar dicha patología, uno de ellos es inducir la apoptosis de las células cancerígenas, es por ello que el presente estudio tiene como propósito investigar el posible efecto apoptótico de un agonista sintético no selectivo de los receptores cannabinoides (WIN55, 212-2) sobre la línea celular HeLa (cáncer de cuello uterino). La investigación es de naturaleza experimental y fue realizada en el Laboratorio de Farmacología de la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences de Boston, EEUU en el año 2015.

Para comprobar la presencia de los receptores cannabinoides en la línea celular HeLa, tanto del receptor cannabinoide tipo 1 (CB₁) como del receptor cannabinoide tipo 2 (CB₂), se realizó la técnica Western Blot en la que se empleó anticuerpos anti-receptor cannabinoide I y II para su identificación. El efecto apoptótico fue evaluado con la disminución del porcentaje de células viables. Se utilizó el cannabinoide WIN-55,212-2 en concentraciones de 0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M y 30 μ M sobre dicha línea celular, luego de 24 horas se midió la viabilidad celular a través de la técnica MTS y se expresó como porcentaje del grupo control. El análisis estadístico fue realizado a través de los test ANOVA y Dunnett. El efecto apoptótico producido

por el cannabinoide fue verificado con la activación de la caspasa 3 mediante un ensayo de Luminiscencia. También se utilizó un antagonista selectivo para el receptor CB₁ (AM251), para observar si existía un cambio en el efecto producido por el agonista.

Se demostró la presencia de ambos receptores cannabinoideos en la línea celular HeLa, a través de bandas apreciadas en las membranas incubadas con los respectivos anticuerpos. Se comprobó la muerte celular de la línea HeLa producida por el cannabinoide WIN55, 212,2, ya que dicho efecto fue reflejado en la disminución significativa de la viabilidad celular y la activación de la caspasa efectora 3. Sin embargo, cuando se bloqueó el receptor CB₁ con un antagonista selectivo, la viabilidad celular no aumentó significativamente, por lo que se puede deducir que efecto apoptótico no era mediado por dicho receptor, sino por el receptor CB₂ u otro receptor. Se concluye que el cannabinoide WIN55, 212-2 induce la muerte celular de las células de cáncer de cuello uterino, siendo la concentración más efectiva la de 30µM, debido a que disminuye la viabilidad celular en un 67% después de 24 horas de haber sido aplicado dicho tratamiento. Asimismo, se comprobó que el efecto apoptótico µvera producido vía la activación de las caspasas efectoras. Estos hallazgos brindan un nuevo enfoque para el tratamiento de esta patología.

Palabras Claves: Cannabinoideos, Receptores, Cáncer, Apoptosis, Caspasas.

ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death worldwide. In the case of our country, this disease is second, with the highest incidence in women, cancer of the cervix. This study is experimental in nature and was conducted at the Laboratory of Pharmacology at the University Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences in Boston, USA in 2015. The purpose of this study was to investigate the possible apoptotic effect of a synthetic agonist not selective cannabinoid receptor (WIN55, 212-2) on HeLa cell line (cervical cancer). To verify the presence of both cannabinoid receptors in the cell line referred, it was used a Western Blot technique.

The apoptotic effect was evidenced in the decrease of cell viability. WIN 55,212-2-cannabinoid was used at concentrations of 0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM and 30 μM on this cell line, after 24 hours cell viability was measured using the technique MTS and it was expressed as a percentage of the control group. Statistical analysis was performed by ANOVA and Dunett's test. The apoptotic effect of the cannabinoid was tested with the activation of caspase 3 by a luminescence assay. A selective antagonist for the CB1 receptor (AM251) was also used to observe whether there was a change in the effect produced by the agonist.

The presence of both cannabinoid receptors in the HeLa cell line was demonstrated through bands appreciated membranes incubated with the respective antibodies. Cell death of HeLa line produced by the cannabinoid WIN55, 212.2 was found, since the effect was reflected with the significant decrease in cell viability and caspase

activation effector 3. However, when the receptor was blocked CB1 selective antagonist with, cell viability was not significantly increased, so we can deduce that apoptotic effect was not mediated by said receptor but by the CB2 receptor or other receptor. It is concluded that the cannabinoid WIN55 , 212-2 induced cell death of cells of cervical cancer , the most effective concentration of 30 μ M , because it decreases cell viability by 67 % after 24 hours of being applied such treatment. It was also found that the apoptotic effect was produced occurred via activation of effector caspases. These findings provide a new approach for the treatment of this disease.

Key Words: Cannabinoids, Receptors, Cancer, Apoptosis, Caspases.





HIPÓTESIS

Dado que el cáncer es una enfermedad con alta tasa de mortalidad a nivel mundial, es posible que los cannabinoides puedan ser útiles para disminuir la viabilidad de células cancerígenas, constituyéndose en una nueva alternativa terapéutica para su tratamiento.

OBJETIVOS

Objetivo Principal:

- Evaluar el efecto apoptótico del cannabinoide WIN55, 212,2 en células de cáncer de cuello uterino.

Objetivos Específicos

- Identificar cualitativamente la presencia de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ en células de cáncer de cuello uterino (HeLa).
- Determinar la concentración óptima del cannabinoide WIN55, 212,2 para obtener efecto apoptótico en células de cáncer de cuello uterino.
- Comprobar si el efecto apoptótico del cannabinoide WIN55, 212,2 es inducido a través de la activación del receptor cannabinoide CB₁.
- Analizar si el proceso apoptótico es mediado por la activación de la Caspasas efectoras.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. CÁNCER

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública ya que es una de las principales causas defunción a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud en el año 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de personas que murieron a causa de esta patología y se estima que para el año 2030 aumente en un 75%.^{1,2} En nuestro país, el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas registró un total de 10550 nuevos casos durante el mismo año.³

El aumento creciente en la tasa de incidencia así como la tasa de mortalidad asociadas al cáncer crea la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas para tratar dicha patología ya que actualmente existen tratamientos muy costosos y en la mayoría de veces tienen una eficiencia limitada.

1.1 Definición: El cáncer es una enfermedad caracterizada por la proliferación anormal y descontrolada de células que presentan alteraciones como alguna inestabilidad o mutación genética.⁴ Estas alteraciones genéticas juegan un papel esencial en el desarrollo del cáncer, están involucradas en la ganancia y pérdida de funciones de las proteínas que regulan el ciclo de proliferación celular.⁵ El cáncer es una enfermedad multifactorial y de etiología variada causados por agentes internos y externos.

El desencadenamiento del cáncer es el resultado de varias alteraciones acumulativas ocurridas en una célula, iniciada en un cambio genético al presentar alteraciones en las secuencias del ADN que pueden ser heredables, o alteraciones epigenéticas, que no afectan al ADN de manera directa sino al patrón de expresión de un gen.^{6,7}

Las sustancias o agentes externos son capaces de aumentar las probabilidades de alterar el genoma de las células, como iniciadores o promotores tumorales en la transformación celular.⁷ Se reconocen 3 agentes externos principales para a inducción del cáncer:

Tabla N°1 Principales Agentes Externos capaces de inducir el cáncer

Consecuencias

Sustancias Químicas	Provocan cambios locales en la secuencia del ADN. Ejemplos: Nicotina, Alquitrán, Bencenos, etc.
Radiaciones	Causan traslocaciones y rupturas de cromosomas. Radiaciones ionizantes como rayos X y UV.
Virus	Introducen sus secuencias nucleotídicas al interior de la célula. Virus del Papiloma Humano.

Fuente: Elaboración propia.

1.2 Conceptos Básicos⁵

1.2.1 Carcinogénesis: Es el proceso por el cual se produce el cáncer. Es producido por anomalías genéticas provocadas por agentes carcinógenos mencionados en la tabla 2.1. o por errores producidos durante la replicación normal del ADN y que no pueden corregirse. También pueden ser heredados y por ende, se presentan en todas las células desde el nacimiento ocasionando una mayor probabilidad de que se presente la enfermedad.

1.2.2 Tumor: Se define como una alteración en los tejidos en el que se produce un agrandamiento o inflamación anormal. Se pueden clasificar en benignos y malignos, esto últimos son formados por células cancerígenas.

1.2.3 Carcinoma: Es el cáncer más común. Este tipo de tumor está originado en el epitelio, es decir; en el recubrimiento de las células de un órgano. Entre las más comunes: piel, boca, pulmón, senos, estómago, colon y útero. Son de dos clases importantes:

- Carcinoma a células escamosas: Derivan del epitelio de revestimiento.
- Adenocarcinoma: Derivan del epitelio secretorio.

- 1.2.4 Sarcoma: Este tipo de cáncer es originado en tejidos blandos: conectivo, tales como tejido fibroso, muscular, adiposo y vasos sanguíneos, etc. Pueden encontrarse en todo el cuerpo, aunque en mayor proporción en las extremidades, órganos internos y el retroperitoneo. También puede ser originado en el tejido óseo.
- 1.2.5 Glioma: Se originan en células gliales como astrocitos, oligodendrocitos. Son tumor encefálicos y de la medula ósea.

1.3 Características de una célula cancerosa

- Capacidad de división ilimitada
- Aumento de las señales de crecimiento.
- Insensibilidad a señales anti crecimiento.
- Inmortalidad: Evasión de la apoptosis.
- Angiogénesis constante.
- Invasión a otros tejidos y metástasis.
- Mayor actividad glicolítica.
- Aneuploidía.
- Se pueden multiplicar conjuntamente con otros tipos celulares.
- Presentan Antígenos de superficie.
- Se pueden cultivar en medio líquido.

1.4 Orígenes Moleculares del Cáncer: Para que se desarrolle en cáncer en el organismo existen numerosos eventos que se detallan a continuación:

1.4.1 Alteraciones en las señales de crecimiento: El crecimiento celular normal está regulado por factores de crecimiento, que acoplados a sus respectivos receptores, estimulan la producción de proteínas citoplasmáticas que actúan como segundos mensajeros que a su vez estimulan la transcripción de los genes encargados de la proliferación

celular.^{5,8} Cuando ocurre una mutación en los genes que codifican estas proteínas, como los protooncogenes que producen las oncoproteínas se altera el crecimiento y proliferación celular.⁶ Algunos protooncogenes que codifican para receptores de factor de crecimiento, activan la señal sin necesidad de acoplarse el factor de crecimiento convirtiendo esta señal permanente.⁹ En células tumorales también se ha observado la capacidad de sintetizar estos factores de crecimiento provocando una “autosuficiencia” en el crecimiento.^{10,11} Por ejemplo el protooncogen RAS cuando se fija al GDP se encuentra en su forma inactiva, y al activarse, este se fosforila de GDP a GTP, una vez activo actúa sobre la vía de las MAP Quinasas, que son las encargadas de activar algunos factores de transcripción que inducen a la mitosis.^{12,13} Para inactivar al gen RAS se necesita de la enzima GTPasa para hidrolize al GTP y lo convierta en GDP para inactivarlo nuevamente.¹⁴ Una mutación en el aminoácido de posición 12 de esta proteína, perjudica su función y activa permanentemente e incontrolada del protooncogen Ras.⁵ Otro mecanismo puede ser la alteración de los factores de transcripción, estas actúan sobre genes que participan en la proliferación celular.¹⁵ Cualquiera de estos tipos de alteraciones o mutaciones pueden producir la activación permanente de las señales de estímulo de crecimiento y proliferación celular.^{5,16}

1.4.2 Perdida de las señales inhibitorias de crecimiento: Las proteínas encargadas de producir las señales inhibitorias del crecimiento y proliferación celular son codificadas por genes de supresión tumoral¹⁴, algunos de estos expresan proteínas de acción citoplasmática como el DPC4 que expresa una proteína inhibidora de la división celular,¹⁵ al mutar este gen se inactiva dicha proteína como en el cáncer de páncreas.¹⁷ Otros codifican proteínas que ejercen su acción a nivel del núcleo, como el gen RB que expresa a la proteína pRB que interviene en los controles del ciclo celular, mutaciones en dicho gen son comunes en cáncer de seno, pulmón y hueso, otro ejemplo es del gen P53 (TP53).^{15, 18}

1.4.3 Evasión de la apoptosis: La apoptosis se define como la muerte celular programada.¹⁹ La apoptosis actúa como una cascada que termina en la activación de unas proteínas llamadas caspasas, que realizan una proteólisis, luego la célula se fragmenta para ser fagocitada posteriormente.^{17,20} En este proceso participan muchas otras proteínas que van a regular tanto como positiva como negativamente esta ruta. Este proceso es regulado genéticamente para mantener un equilibrio entre la proliferación y muerte celular, mutaciones en genes que regulan la apoptosis producen un desequilibrio entre ambos procesos.¹⁷ En gen P53, referido en el punto 1.4.2 produce una proteína con el mismo nombre, esta induce la transcripción de proteínas pro apoptóticas como Bax, una alteración en dicho gen puede disminuir esta actividad.¹⁹

1.4.4 Alteración en la reparación del ADN: El ser humano está expuesto a agentes carcinógenos a diario, estos pueden conducir a dañar y alterar la estructura del ADN, no obstante existen mecanismos celulares encargados de la reparación de estas alteraciones, uno de ellos es la reparación por escisión de nucleótidos,¹⁴ en el que genes reconocen las lesiones e inducen a una endonucleasa a que realice un corte y poder eliminar ese fragmento dañado de ADN, luego se sintetiza más ADN para completar el espacio que eliminado por la endonucleasa, y se une por medio de una enzima ligasa.²¹ Otro mecanismo conocido es la reparación por recombinación homóloga, en donde se arregla una de las cadenas de ADN dañadas, copiando la hebra del cromosoma homólogo no dañado.^{4,22}

1.4.5 Replicación Permanente: Es común en las células cancerígenas que su potencial replicativo sea ilimitado, en contraste con las células normales que luego de un determinado número de divisiones se detienen en un estado quiescente, este proceso está determinado por el acortamiento de los extremos del cromosoma o también llamados telómeros, se acorta hasta que no exista material genético involucrado en

la codificación de genes fundamentales en el funcionamiento celular, cuando esto ocurre inicia el proceso de apoptosis.^{5,23,24} Existe una proteína llamada telomerasa, producida durante la embriogénesis, que no permite el acortamiento de los telómeros, y estos al mantenerse elongados no pueden alcanzar el estado quiescente.²⁴ En numerosos casos de cáncer se ha observado que la expresión de esta proteína se encuentra aumentada y reactivando sus funciones, es por ello que las células cancerígenas se replica indefinidamente.⁵

1.4.6 Angiogénesis: La angiogénesis se define como un proceso fisiológico en el que se forman nuevos vasos sanguíneos a raíz de vasos sanguíneos ya existentes. En cualquier tejido sea normal o canceroso necesitan de nutrientes y oxígeno en mayor o menor proporción.²⁵ También necesitan eliminar los desechos metabólicos, es por ello que para el crecimiento de un tumor se ha observado un incremento en la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de la estimulación de factores de crecimiento vasoendotelial y así como la inhibición de los factores que impiden la angiogénesis. Una vez que el tumor se encuentra vascularizado, puede crecer a pesar de que los vasos sanguíneos en las células de cáncer son irregulares y diferentes comparados con las células normales.⁵

1.4.7 Metástasis: Las células cancerígenas tienen la capacidad de diseminarse del lugar de origen del tumor primario hacia otros tejidos y produzca un crecimiento secundario formando un nuevo tumor, conformado por células heterogéneas y diferentes alteraciones genéticas por medio del sistema vascular o linfático.^{5,26}

1.5 Cáncer de Cuello Uterino: Según el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, el cáncer de cuello uterino es uno de los cánceres más frecuentes y con una alta tasa de incidencia en nuestro país. El cáncer de cuello uterino

es la primera causa de muerte en mujeres a nivel nacional y segunda en frecuencia en la población.²⁷

1.5.1 Generalidades: El cuello uterino se encuentra en la parte inferior del útero también llamado cérvix uterino, es el que conecta el útero con la vagina. Cuando las células epiteliales que recubren dicha porción del útero, se transforman en cancerosas se desarrolla en cáncer de cuello uterino.²⁸ A partir del año 1990 diversos estudios experimentales han demostrado el papel oncogénico del Virus del Papiloma Humano (VPH) en esta patología.²⁹

1.5.2 Virus del Papiloma Humano: Este virus es el principal agente etiológico del cáncer de cuello uterino, es transmitido primordialmente por vía sexual. Esta enfermedad se desarrolla como resultado a largo plazo de la infección persistente por ciertos genotipos del VPH.³⁰ Se han reconocido hasta la fecha 150 tipos distintos de VPH, pero solo algunos de ellos tienen la capacidad de producir una infección que puede desencadenar en cáncer. En el 75% de los casos analizados de pacientes que padecen esta enfermedad se ha logrado detectar que los genotipos más frecuentes de VPH son del tipo 16 y 18.²⁸

El VPH pertenece a la familia *Papovaviridae*, es un virus pequeño que tiene un diámetro de 50 nm aproximadamente, carecen de una membrana y su cápside tiene una estructura icosaédrica formada por 72 capsómeros.³⁰ Presentan una doble cadena ADN en forma circular que contiene alrededor de 8000 pares de bases.²⁸

El genoma de este virus puede dividirse en tres regiones definidas apreciadas en la figura 1:

- Región Larga de control (LCR): Esta región no está compuesta por genes, sin embargo; contiene elementos reguladores en la transcripción y replicación.
- Región Temprana (E): Solo en esta región se codifican proteínas relacionadas en la replicación del ADN.

- Región Tardía (L): Se codifican proteínas de la cápside viral.

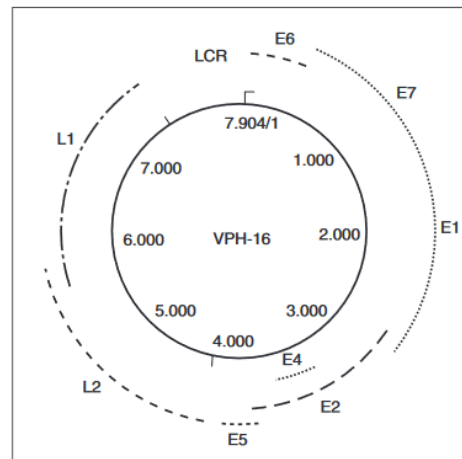


Figura N° 1. Esquema Genético del papiloma virus tipo 16

Fuente: Menéndez A, 2007.³⁰

La clasificación de los diferentes tipos de VPH se realiza en base a la comparación entre las secuencias de ADN de las regiones E1 y L1, las variaciones que pudieran existir entre dichos tipos van definir la capacidad oncogénica, tropismo celular y también el tipo de lesión histológica que puedan causar.^{28, 30}

1.5.3 Papel del VPH en la oncogénesis cervical: La carcinogénesis cervical se da fundamentalmente por la infección persistente del VPH de los tipos con mayor riesgo oncogénico, también pueden existen otros factores que modulen la persistencia de la infección o la progresión del cáncer.²⁸ Cuando se produce la infección por VPH, la región L1 apreciada en la figura 1, expresa proteínas importantes de la cápside viral, que permiten la adherencia del virus a la célula.^{30,31} Luego se produce una ruptura del genoma vírico entre E1-E2 (figura 1) para que éste se puede insertarse en los cromosomas del huésped. Como se mencionó en el punto 1.5.2, existen diferentes tipos de VPH, unos más riesgosos que otros. En los tipos de VPH de bajo riesgo como el tipo 6 y 11 causan lesiones intraepiteliales benignas, y se caracterizan porque el ADN viral se localiza en posición extracromosómica del núcleo celular,

mientras en los tipos de VPH de mayor riesgo, el ADN viral se encuentra enlazado con el ADN del huésped, dentro del cromosoma celular provocando el proceso oncogénico.³⁰ La integración del ADN viral con el cromosoma celular se da través de la ruptura del genoma viral entre E1 y E2.³¹ La ruptura de esta fracción del genoma viral, afecta la expresión y función de dichos genes teniendo por consecuencia que las proteínas pE1 y pE2 resulten afectadas en su rol como reguladores de la transcripción viral y replicación del ADN.³⁰ También se ha observado que la proteína codificada por E2 en VPH 16 y 18 regulan negativamente la expresión de los genes E6 y E7. Los genes E6 y E7 a su vez codifican proteínas pE6 y pE7 respectivamente, que están involucradas con la proliferación permanente e inmortalización de las células de cuello uterino y algunas lesiones provocando la transformación neoplásica, ya que dichas proteínas interfieren el gen supresor tumoral p53 y el oncogén retinoblastoma (Rb). Los genes E6 y E7 se encuentran casi sin expresarse en VPH de bajo riesgo, en los cuales el genoma del huésped no está insertado con el ADN circular del virus y otro factor es que las proteínas codificadas por E6 y E7 son funcionalmente menos activas que las codificadas por VPH tipo 16 y 18, al tener propiedades bioquímicas y biológicas diferentes.^{28, 30, 31}

La infección por VPH desencadena una respuesta inmune del huésped, que intenta controlar la replicación del virus, y si esta respuesta es efectiva el individuo se convierte en un portador asintomático. Sin embargo; cuando la respuesta inmune no es del todo efectiva y fracasa en casos de inmunodepresión u otros factores, se produce la proliferación y transformación celular contribuyendo con la aparición del cáncer de cuello uterino.²⁸

1.5.4 Diagnóstico: El cáncer de cuello uterino tiene diversos métodos de ser detectado como:^{32, 33}

- Biopsia: En este método se analiza tejido extirpado para detectar la presencia de células cancerosas.
- Prueba de Papanicolaou: También llamada citología vaginal. Tiene como procedimiento realizar un raspado del cérvix uterino para la obtención de las células y ser analizado posteriormente por un microscopio.
- Inspección visual con ácido acético: Conocida también como cervicoscopia o infección visual directa. Se aplica Ácido Acético al 5% y se observa el cuello uterino para identificar cambios de color y diferenciar los resultados negativos, positivos y algunas posibles lesiones cancerosas.
- Métodos de Diagnóstico molecular: Como la secuenciación del ADN vírico o reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.5.5 Signos y Síntomas: Es común en pacientes que padecen cáncer de cuello uterino en una etapa temprana no presentar ningún síntoma. Pero a medida que esta patología va avanzando hasta convertirse en un cáncer invasivo se observan los siguientes síntomas:^{32,33}

- Sangrado vaginal anormal y profuso.
- Secreción vaginal inusual.
- Dolor.
- Presencia de verrugas genitales.

2. APOPTOSIS

2.1 Generalidades: La apoptosis es el nombre que se le da a la muerte celular programa, en otros términos se refiere a un suicidio celular.³⁴ Es un proceso biológico esencial en las células para mantener la homeostasis de un organismo y asegurar la eliminación de células no deseadas o defectuosas.^{35,36}

La apoptosis es un proceso controlado genéticamente por el cual las células inducen su propia muerte en respuesta a estímulos fisiológicos determinados.³⁷ La desregulación en de estos mecanismos pueden causar diversas enfermedades, por ejemplo cuando los genes que codifican para proteínas que favorecen la muerte celular no actúan normalmente contribuye al desarrollo de diversos tumores. Al contrario cuando estos genes se sobre expresan pueden desencadenar enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas.³⁸

La célula inicia el proceso apoptótico, como se dijo anteriormente, en respuesta a diferentes estímulos, como por ejemplo el ingreso de un agente patógeno al organismo que induce la activación de un mayor número de células del sistema inmunitario para detener dicha agresión.³⁹ Cuando la infección logra controlarse, gran parte de las células inmunitarias dejan de ser necesarias e inician un proceso de apoptosis inducido por la ausencia del estímulo agresor.³⁷ Otro ejemplo en el que la muerte celular programada se ve estimulada es por la existencia de células envejecidas, células neoplásicas e incluso mutadas y alteradas por elementos externos.³⁸

La muerte celular también puede originarse por un proceso accidental, donde se produce una destrucción progresiva de la estructura celular, conocido como necrosis. La necrosis se diferencia de la apoptosis, porque la primera trae consigo una respuesta inflamatoria, como consecuencia de que la membrana celular se hincha y estalla, expulsando el contenido intracelular al espacio intercelular.^{37, 38} Al contrario, cuando la célula inicia un proceso de apoptosis, ocurre un empaquetamiento del núcleo y la célula. A nivel nuclear se produce una condensación de la cromatina y se agrupa en pequeñas masas llamadas cuerpos apoptóticos.³⁵ Finalmente se produce una fragmentación en la que se forman vesículas pequeñas que posteriormente serán fagocitadas. Otra diferencia clara es que la necrosis es desencadenada por factores como un traumatismo mecánico, cambios ambientales o temperaturas extremas, lo que induce a la muerte celular de células contiguas.^{37, 38} En cambio, la

apoptosis se refiere a la muerte de determinadas células y que dependen de ellas mismas, por lo que no necesariamente son células contiguas o en un mismo tejido.⁴⁰

2.2 Mecanismos Apoptóticos

La apoptosis está relacionada con el ciclo celular y solo puede intervenir en las siguientes fases:

- En la parte final de la fase de control celular o G1: Tiene por objetivo impedir que la célula dañada continúe la fase de síntesis (fase S) de modo que las mutaciones no se reproduzcan en la replicación del ADN.³⁷
- Fase G2: En esta etapa la célula se prepara para la mitosis⁵. La apoptosis interviene en este punto para detener que las células inmaduras sigan el proceso hacia la mitosis.³⁷

En ciclo celular se define si determinada célula sigue el proceso de división celular o si inicia el de autodestrucción. Ambos procesos deben mantenerse en equilibrio de modo que se asegure la homeostasis en el organismo.

La apoptosis se controla molecularmente por diversos factores y agentes, uno de ellos son las proteínas Caspasas, estas proteasas permanecen inactivas como pro-caspasas y por diversos mecanismos y vías que se detallarán más adelante, pueden activarse para provocar la degradación proteica formando los cuerpos apoptóticos. Actualmente se conocen 11 caspasas que se dividen en dos grupos caspasas efectoras y caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras actúan sobre las endonucleasas, las cuales ejercen la fragmentación del núcleo.^{37, 38}

2.2.1 Caspasas: O también llamadas complejo de cisteinil-aspartato proteasas.

Este grupo de proteínas son esenciales en la ejecución del proceso

apoptótico inducido por diferentes estímulos. Como se dijo anteriormente, las caspasas se encuentran en las células inactivadas en forma de zimógenos llamados pro-caspasas.⁴¹ La estructura de estos zimógenos se divide en tres dominios:

- Pro dominio N-terminal
- Subunidad larga (p20): Contiene al centro activo con cisteína.
- Subunidad pequeña (p10): Se encuentra en el extremo C-terminal.

Según el prodominio N-terminal son agrupadas en dos grupos:

- Clase I: Con un pro dominio N-terminal grande. Caspasas 2, 8,9 y 10, conocidas también como iniciadoras.
- Clase II: Con un pro dominio N-terminal pequeño. Caspasas 3,6 y 7, conocidas también como efectoras.^{39,41}

El pro dominio N-terminal está separado de la subunidad larga p20 por un lugar de corte que contiene un residuo Ácido Aspártico (Asp), a su vez la subunidad p20 se separa de la subunidad pequeña p10 por medio de uno o más residuos de ácido Aspártico. Para que las pro-caspasas puedan activarse y convertirse en caspasas es necesaria una escisión en esos puntos de separación después de un residuo de Asp, ejerciendo una activación autocatalítica como puede apreciarse en la Figura 2.^{41,42}

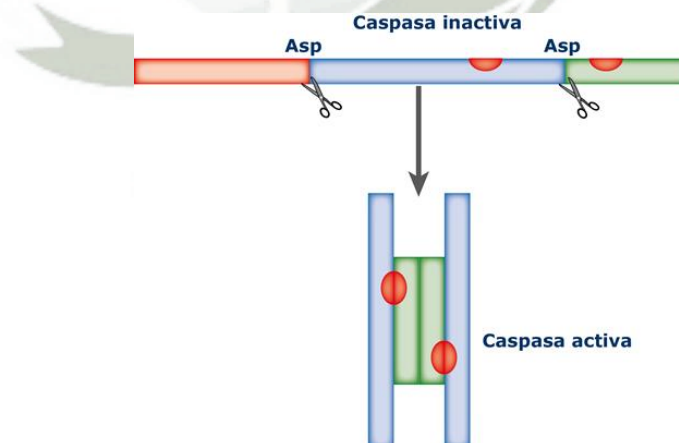


Figura N°2. Activación de una pro-caspasa

Fuente: Grupo Multidisciplinar de Oncología Traslacional, 2012.

La estructura de las caspasas Clase I favorecen a un rompimiento auto proteolítico en lugares específicos de Asp, logrando su autoactivación las conduce al citoplasma para la activación de las pro-caspasas de clase II. Es decir, la activación de las pro-caspasas clase II (caspasas 3,6 y7 o efectoras) se debe a la exposición de otra previamente activada (pro-caspasas clase I) generando una cascada de activación de caspasas.³⁹ El inicio de la cascada es producido en respuesta a estímulos que gatillan la apoptosis. Las caspasas efectoras son las encargadas del desmantelamiento de las proteínas celulares y activar las endonucleasas como la ADNasa.⁴³

Se han descrito dos vías por las cuales se produce el proceso de apoptosis, que pueden ser apreciadas también en la Figura 3.

2.2.2 Vía Extrínseca: Es también conocida como la vía de los receptores de muerte. Esta vía se caracteriza por recibir señales que inducen a la apoptosis desde el exterior de la célula.³⁷ Se han observado que existen dos familias de receptores localizados en la membrana celular que se involucran en esta vía:

- **Receptor Fas:** Este receptor también recibe el nombre de Apo-1. Es una proteína transmembrana glicosilada con un peso aproximado de 43 kD. Este receptor se activa al unirse en la parte externa con un cofactor específico llamado “Ligando Fas” (FasL) y permite al receptor unirse a la proteína citosólica adaptadora llamada “Dominio de muerte asociado a Fas” o FADD (Factor Associated Death Domain).³⁷ FADD se fija a la pro-caspasas 8, para que inicie su autoactivación catalítica, y esta a su vez induzca la activación de otras caspasas efectoras.⁴⁴
- **Receptor de membrana TNF:** El receptor de Factor de Necrosis Tumoral (TNF) tiene un dominio intracelular que se enlaza con otros

complejos intermedios como TRADD (TNF receptor associated death domain) o RAIDD (receptor associated interleukine death domain). Estos al igual que el FADD activan a caspasas iniciadoras iniciando la cascada de caspasas.^{37,39.}

2.2.3 Vía Intrínseca: También conocida como la vía mitocondrial, ya que su mecanismo se ejerce fundamentalmente en la mitocondria. En esta vía actúan principalmente la familia de proteínas Bcl-2 y son agrupadas en:⁴⁵

- Proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-XI, Mcl-1.
- Proteínas proapoptóticas: Bid, Bim, Bad.
- Proteínas multidominio: También son proapoptóticas pero de tipo multidominio como Bax y Bak.⁴⁶

La activación de las proteínas proapoptóticas induce a la formación de un poro en la membrana externa de las mitocondrias permitiendo la liberación de proteínas del espacio mitocondrial. Una de estas proteínas, es el citocromo c, que al ser liberado al citosol induce la activación un complejo proteico llamado “apoptosoma” que activa directamente la caspasa 9, esta a su vez activa las caspasas efectoras desencadenando el proceso apoptótico. Otra función del citocromo c es activar a proteínas que evitan la función de los inhibidores de caspasas (IAPS), logrando la activación completa de la cascada de caspasas.³⁷

Por su parte, las proteínas multidominio Bax y Bak producen por si solas forman el poro mitocondrial y liberación del citocromo c. Las proteínas antiapoptóticas inhiben la formación de dicho poro.^{45,47}

La vía intrínseca y extrínseca se relacionan ya que al activar la caspasa 8, está también puede activar a la proteína Bid que conduce a la apertura del orificio mitocondrial y la activación de la caspasa 9 y esta a su vez active la cascada.^{37, 48}

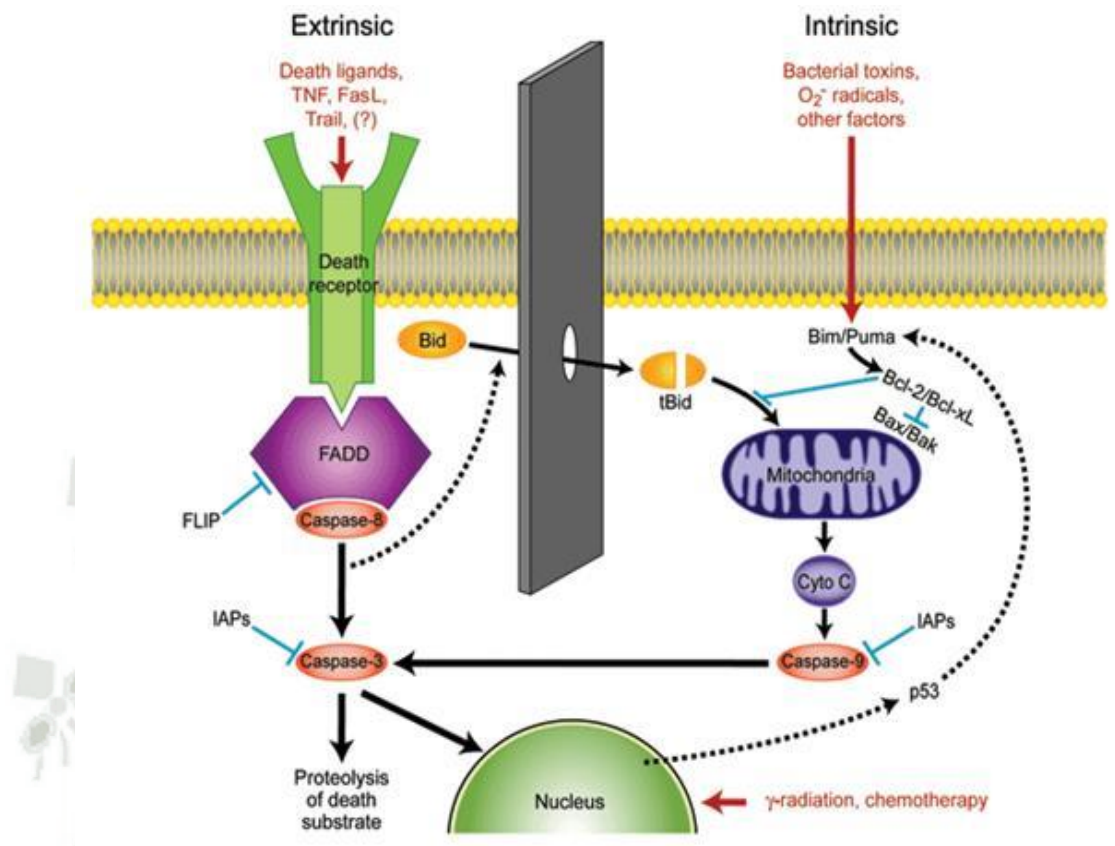


Figura N°3. Vía extrínseca e intrínseca del proceso apoptótico.

Fuente: Reyes G. 2003

También actúan otros genes en este proceso, como el gen p53 mencionado en el punto 1.4 de este capítulo. Este gen es conocido también como el guardián del genoma, ya que tiene como función bloquear el ciclo celular cuando se detecta algún daño en el ADN, deteniendo la fase G1 para que la alteración pueda ser reparada antes de que dicha porción se replique.^{15,35} Sin embargo, cuando ocurre un daño sustancial en el genoma, el gen P53 estimula la apoptosis celular.³⁷ Cuando ocurre algún daño en el gen P53 o pérdida de función se asocia con el desarrollo de neoplasias malignas. Genes como el nur77 o c-myc también regulan la expresión de genes ligados a la muerte celular.^{13,46}

2.3 Apoptosis como estrategia terapéutica

La apoptosis es un proceso celular ordenado que ocurre en condiciones fisiológicas, sin embargo la alteración de este proceso induce a algunas

situaciones patológicas. Cuando la apoptosis se encuentra exacerbada se desarrollan enfermedades neurodegenerativas y cuando se observa una disminución de este proceso se producen enfermedades como el cáncer.⁴⁹ En este caso la apoptosis juega un papel crucial en la patogénesis de esta enfermedad, en el que existe un desbalance entre la división y muerte celular.³⁵ La apoptosis al tener muchos mecanismos complejos, es susceptible de que se presenten defectos a lo largo del proceso permitiendo que las células malignas continúen replicándose conduciendo a la metástasis y resistencia a los medicamentos anticancerígenos. A pesar de que la apoptosis es una de las principales causas de la carcinogénesis también ha surgido como un nuevo objetivo y estrategia terapéutica para inducir la muerte celular en células cancerígenas ya sea induciendo a los factores proapoptóticos como inhibiendo a los factores antiapoptóticos.^{40,50}

La única precaución que existe en el desarrollo de estos nuevos tratamientos es que estos deben actuar selectivamente sobre las células cancerígenas.

3. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

3.1 Generalidades

En la última década se ha incrementado el interés de la planta herbácea *Cannabis Sativa*, comúnmente conocida como marihuana, no solo por la obtención de fibras textiles o su utilización en fines recreativos sino por sus recientemente investigadas propiedades terapéuticas. Esta planta ha venido siendo citada en múltiples trabajos de investigación, por tener un importante rol terapéutico en diferentes patologías.⁵¹

Se han identificado 489 compuestos en esta planta, la mayor parte de ellos, metabolitos primarios como aminoácidos, ácidos grasos y esteroides; y en menor proporción metabolitos secundarios como

flavonoides, estilbenoides y terpenoides,⁵² entre los cuales se encuentran 70 fitocannabinoides.⁵³ El compuesto con mayor actividad y más conocido es el delta-9-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) comúnmente abreviado como THC encontrado en la resina secretada por las hojas y brotes florecidos de la planta.⁵¹ Este compuesto posee efectos terapéuticos en enfermedades como glaucoma, asma, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, también es usado como antiemético, anti-inflamatorio y tiene efecto analgésico.⁵⁴

Desafortunadamente las propiedades terapéuticas de este metabolito se asocian con efectos secundarios como: alteración de la memoria, sedación e incluso efectos psicotrópicos y alucinógenos.

Los cannabinoides son sustancias cuya estructura carboxílica consta de veintiún carbonos constituidos en tres anillos como el ciclohexano, tetrahidropirano y benceno, como se aprecia en la figura 4. En dicha figura se observa la estructura del cannabinoide THC. De acuerdo a su estructura los cannabinoides tienen propiedades hidrofóbicas; es decir, son muy solubles en lípidos.^{55,56}

En un principio la definición de cannabinoides solo se aplicaba a compuestos que tienen una estructura química parecida al THC. Posteriormente esta definición fue englobando a otros compuestos que tenían una actividad farmacológica parecida o que simplemente actúan sobre los receptores cannabinoides que se mencionaran más adelante, por lo que se pueden dividir en las siguientes categorías:⁵⁷

- Fitocannabinoides: Estos cannabinoides son componentes naturales de la planta *Cannabis Sativa* principalmente, también se ha logrado identificar cannabinoides de otras plantas menos conocidas como *Radula perrotetii* comúnmente llamada hierba hepática. Entre los fitocannabinoides más destacados se encuentran el THC, Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG)(58).

Como se indicó anteriormente el THC es el que presenta mayor actividad farmacológica, aunque también se le asocian los efectos psicoactivos del *Cannabis Sativa*,⁵⁵ en contraste con el CBD que presenta también propiedades antiinflamatorias y analgésicas pero se caracteriza por no ser psicoactivo.⁵³ Ambos cannabinoides se pueden observar en la figura 4 y 5 respectivamente.

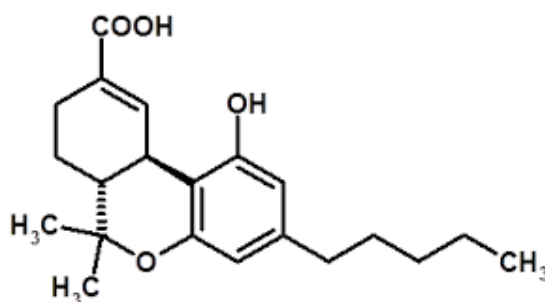


Figura N° 4 . Estructura química del cannabinoide THC

*Fuente: Ujváry, 2014.*⁵⁹

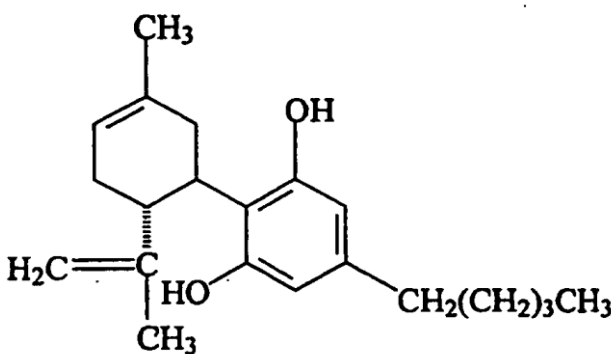


Figura N°5. Estructura química del cannabinoide CBD.

*Fuente: Grotenhermen, 2006.*⁵⁸

- Endocannabinoide: Estos cannabinoides son sintetizados en el interior del organismo, como ligandos endógenos de los receptores cannabinoides. Por ejemplo: anandamida.^{60,61}

- Cannabinoides sintéticos: También conocidos como cannabinoides exógenos. Estos compuestos son sintetizados en el laboratorio y son agonistas de los receptores cannabinoides. Según sea el parecido con los fitocannabinoides se clasifican en:⁵⁷
 - Cannabinoides Clásicos: Esta clase de cannabinoides derivan directamente del THC, como el Dronabinol o Nabilona, HU-210 y HU-243.⁶²
 - Cannabinoides No Clásicos: Análogos bicíclicos y tricíclicos del THC, pero carecen del anillo pirano. Como el CP55, 940 y HU-308.⁶³
 - Aminoalquilindoles: Son también cannabimiméticos, su estructura proviene de la pravadolina y difieren de los cannabinoides antes mencionados. El principal representante es el WIN55, 212,2.^{64,65}

3.2 Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide, es un sistema de comunicación intercelular que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo y está implicado con múltiples procesos fisiológicos. Este sistema está conformado por los receptores cannabinoides que se activan uniéndose con ligandos endógenos o también llamados endocannabinoides como la anandamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG), los cuales funcionan como segundos mensajeros intercelulares lipídicos, y producen algunos efectos fisiológicos relacionados con el apetito, sensación de dolor, memoria, entre otros efectos que serán más adelante detallados. Los fitocannabinoides y otros cannabinoides sintéticos actúan como ligandos específicos de dichos receptores.⁶⁶

3.3 Receptores Cannabinoides

En la actualidad se han logrado estudiar extensamente dos receptores cannabinoides: los receptores CB₁ y los CB₂. Ambos receptores, CB₁ y CB₂, pertenecen a la familia de receptores acoplados a una proteína G (G-protein coupled receptors, GPCR) y se caracterizan por tener 7 dominios transmembrana.⁶⁷ Los receptores CB₁ y CB₂ se diferencian en el modo de transmitir la señal y la distribución que tienen los diferentes tejidos.⁵⁸ El mecanismo básico por el cual los cannabinoides ejercen sus funciones se da por medio de la activación de dichos receptores, que produce la inhibición de la enzima adenilciclasa, y así impedir la conversión del ATP a AMP cíclico (AMPC). También se han observado otros mecanismos, como por ejemplo la interacción con ciertos canales iónicos.^{58,68}

3.3.1 Receptor Cannabinoide tipo 1 (CB₁)

El receptor cannabinoide tipo 1 fue el primer receptor cannabinoide identificado. El receptor CB₁ se encuentra acoplado a una proteína G (GPCR), como se aprecia en la figura 6. Estos receptores son los GPCR más abundantes y se están extensamente distribuidos en el cerebro(55).

Su estructura está compuesta por 472 aminoácidos, posee siete dominios transmembrana conectados por tres bucles intracelulares y tres extracelulares, una cola extracelular N-Terminal, y una cola C-terminal intracelular.⁵⁸

El receptor CB₁ se localiza predominantemente en el Sistema Nervioso Central (SNC), sin embargo su distribución no es homogénea. Se encuentra principalmente en las regiones del cerebro responsables del movimiento como el cerebelo y los ganglios basales, también en regiones dedicadas al procesamiento de la memoria como la corteza cerebral y el hipocampo y de las áreas encargadas de la modulación del dolor como la sustancia gris periacueductal y la

médula espinal. Mientras que en el tronco cerebral y células gliales se encuentran en menor proporción. También se han identificado a los receptores CB_1 , en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) y ciertos tejidos y órganos periféricos como en el bazo, glándulas endocrinas, corazón, testículos y en el aparato urinario y digestivo.^{55,58}

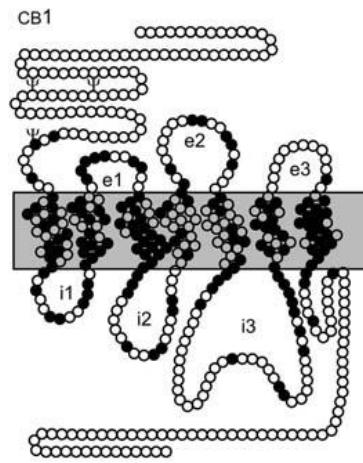


Figura N° 6. Estructura 2D del receptor CB_1 .

Fuente: Escalante, 2013.⁶⁶

La activación del receptor CB_1 produce los típicos efectos tóxicos tras el consumo del *Cannabis Sativa*, debido a la localización de dichos receptores.⁵⁸

En las terminaciones nerviosas centrales y periféricas se han identificado gran cantidad de receptores CB_1 , estos modulan la liberación de los neurotransmisores de tal manera que al activarse evitan la sobre-activación o sobre-inhibición del sistema nervioso producida por los neurotransmisores.

3.3.2 Receptor Cannabinoide tipo 2 (CB_2)

El receptor CB_2 está compuesto de 360 aminoácidos y se observa en la figura 7, tiene una homología estructural del 48% con el receptor CB_1 .

Se localizan fundamentalmente en células del sistema inmunológico, bazo y amígdalas. En el SNC se encuentran casi únicamente en las células gliales, en las neuronas su expresión es mínima, por lo que el papel que ejerce el receptor CB_2 en el SNC se reduce a la modulación de las respuestas inmunológicas.^{55, 66}

En el sistema inmunológico, los receptores CB_2 modulan la liberación de las citoquinas, que son responsables de la inflamación y la regulación del sistema inmunológico.⁵⁸

Se ha demostrado que los cannabinoides que activan selectivamente los receptores CB_2 (agonistas selectivos de los receptores CB_2) no causan efectos psicotrópicos a diferencia de los efectos causados por los receptores CB_1 . En consecuencia, el receptor CB_2 se ha convertido en un blanco terapéutico interesante para la investigación de nuevos fármacos con aplicación analgésica, antiinflamatoria y anticancerígena.

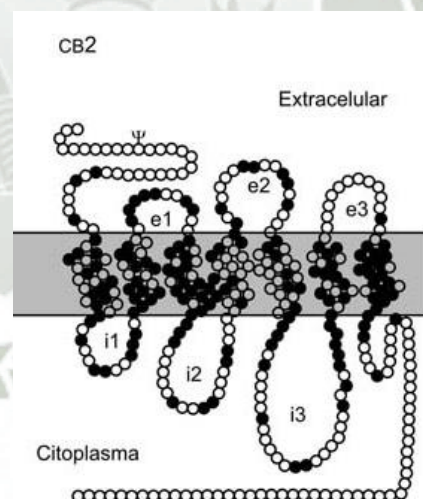


Figura N°7. Estructura 2D del receptor CB_2

Fuente: Escalante, 2013.⁶⁶

Los receptores CB_1 y CB_2 , a pesar de ser los más investigados, continúan en materia de estudio. Se han identificado más tipos de receptores

cannabinoides como el GPR55, que también es un receptor GPCR. Existen también otros receptores que podrían relacionarse funcionalmente con los receptores cannabinoides CB1 y CB2, tal es el caso del receptor Vanilloide (TRPV1) que es activado gracias a la unión de ciertos cannabinoides.^{58,69}

3.4 Endocannabinoides

Luego de haber sido identificados los receptores cannabinoides, se descubrieron ligandos endógenos que se acoplan a dichos receptores, estos ligandos se denominan endocannabinoides, que tienen por función actuar como neuromoduladores. Los endocannabinoides tienen una estructura que se diferencian marcadamente de los fitocannabinoides, ya que los endocannabinoides derivan de ácido grasos poliinsaturados. En el año 1992 Devane et al, identificaron al primer endocannabinoide comúnmente conocido como anandamida (N-araquidonil-etanolamida, AEA) que proviene de una palabra en sánscrito “*ananda*” que significa “bienestar interior”, esta sustancia es derivada del ácido araquidónico(55), su estructura puede ser apreciada en la Figura 8. Posteriormente se fueron identificando otros ligandos, entre los más conocidos: 2-araquidonil-glicerol (2-AG), pamitoetanolamida (derivado de la anandamida), N-araquidonil-etanolamina (virodhamina) y N-araquidonil-dopamina (NADA).⁶¹

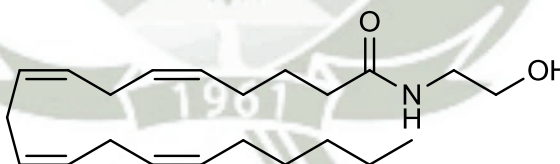


Figura N°8. Estructura química de N-araquidonil-etanolamida (AEA)

*Fuente: Grotenhermen, 2006.*⁵⁸

Los cannabinoides endógenos son producidos primariamente en el hipocampo, tálamo, cuerpo estriado, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal, según la demanda del organismo ya que los endocannabinoides no

se almacenan en las células nerviosas como otras sustancias o neurotransmisores.⁷⁰

Es importante resaltar que no solo el ser humano es capaz de producir estas sustancias, se han logrado identificar en otros vertebrados e incluso en plantas. En efecto se ha aislado pequeñas cantidades de anandamida y de 2-AG en el cacao, lo que explicaría el peculiar apetito de algunas personas por el chocolate.⁵⁵

También se ha demostrado que los endocannabinoides anandamida y NADA se acoplan, además de los receptores cannabinoides a los receptores Vanilloides (TRPV1).

3.4.1 Síntesis y regulación de los endocannabinoides

Los endocannabinoides son sintetizados a partir del precursor de la N-araquidonil-fosfatidil-etanolamina, localizada en la membrana celular. Esta síntesis es modulada por las concentraciones intracelulares del calcio (Ca^{+2}),⁵⁵ cuando esta aumenta se estimula la producción de endocannabinoides. Estos activan a los receptores cannabinoides, por ejemplo cuando el endocannabinoide interactúa con el receptor CB_1 , que está ubicado en las neuronas presinápticas, modulando así la liberación de los neurotransmisores y a su vez activa a receptores inotrópicos.⁷⁰

Como se dijo anteriormente los endocannabinoides, no se almacenan en las vesículas sinápticas a diferencia de los neurotransmisores. Los endocannabinoides son liberados directamente de la membrana celular según la demanda del organismo.

Al finalizar sus funciones, los endocannabinoides son removidos del espacio sináptico por un transportador específico³, por un mecanismo de difusión a favor de la gradiente hacia el citoplasma, donde serán degradados por la hidrolasa de la amida de los ácidos grasos (FAAH, Fatty acid amide hydrolase) en etanolamina y ácido araquidónico, en

el caso de la degradación del 2-AG, actúa la monoacilglicerol lipasa (MAGL).^{71,72}

Los endocannabinoides tienen funciones inmunomoduladoras y neuromoduladoras, también se han descrito que intervienen en la liberación de las citoquinas y la regulación del ciclo celular.⁵⁸

3.5 Mecanismo de acción de los cannabinoides

El mecanismo de acción de los cannabinoides resulta complejo debido a que no solo interactúan con los receptores cannabinoides, sino que alguno de ellos activan a otros receptores como los Vanilloide, también muchos de ellos tienen actividad antioxidante.⁵⁸

Cuando los cannabinoides ya sea endocannabinoides, fitocannabinoides u otros tipos de derivados se unen a los receptores cannabinoides, se desencadena una respuesta de segundos mensajeros. Los receptores cannabinoides que están acoplados a proteínas G, inhiben a la enzima adenilciclase a través de la subunidad alfa (α) de la proteína G.⁷³ La inhibición de esta enzima impide la conversión del Adenosín Trifosfato (ATP) en Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), lo que induce a una disminución del AMPc intracelular, lo que conlleva a la incapacidad de fosforilación de las proteínas quinasas dependientes del AMPc como la proteína quinasa A (PKA) que está relacionada con la regulación del metabolismo de la glucosa, glucógeno y lípidos, también es una proteína fundamental durante el ciclo celular y expresión génica.^{74,75}

Se ha observado que la activación de los receptores cannabinoides, sobre todo los CB₁, inhiben los canales de calcio dependientes de voltaje tipo N, P, Q, L. También esta activación produce un aumento en la conductancia de los canales de potasio, produciendo una disminución del calcio y un incremento de potasio favoreciendo la hiperpolarización de la membrana y la disminución en la liberación de los neurotransmisores.⁷⁰

La activación de los receptores CB₂ además de inhibir la enzima adenilciclasa, activan la cascada de la proteína quinasas activada por mitógenos (MAPK) y mediante este mecanismo controlan la supervivencia y muerte celular.⁷⁶ También por medio de ellas se activa la fosfolipasa A2 que activa la síntesis de ácido araquidónico, precursor de los eicosanoides.^{55,70}

3.6 Efectos fisiológicos producidos por los cannabinoides: La estimulación de los receptores cannabinoides puede generar las siguientes respuestas:^{77,78}

- Sensación de euforia, sedación y relajación.
- Alteración de la percepción temporal
- Actividad antiemética
- Acciones sobre el tono muscular y la coordinación motora: Se observa ataxia y debilidad muscular.
- Disminución de la presión intraocular (útil en el tratamiento del glaucoma)
- Hipotensión (Al liberarse Óxido Nitroso)
- Broncodilatación.
- Efectos analgésicos y antiinflamatorios.
- Regulación de la expresión génica.
- Efectos inmunomoduladores.
- Inhibe la proliferación celular.

Cabe resaltar que gran parte de los efectos producidos por los agonistas cannabinoides en el Sistema Nervioso Central dependen principalmente de la activación de los receptores CB₁, es decir; los efectos cognitivos, psicológicos, antieméticos y analgésicos, aunque en estos últimos si han observado en numerosos estudios la participación de los receptores CB₂. En contraste, el papel ejercido por los receptores CB₂ es fundamental en el caso de los efectos inmunomoduladoras y antiproliferativos.^{76,79}

3.7 Perspectivas Terapéuticas

De acuerdo a las acciones fisiológicas relacionadas con el sistema cannabinoide se genera un nuevo interés por desarrollar nuevos fármacos que interactúen con los receptores cannabinoides para el tratamiento de diferentes patologías, en algunos casos potenciando los efectos producidos por los cannabinoides, en otros casos bloqueando o inhibiendo sus efectos por medio de antagonistas.

En el primer caso se quiere potenciar los efectos cannabinoides a través del desarrollo de nuevos agonistas o dianas terapéuticas que buscan efectos analgésicos, propiedades antieméticas útiles en tratamientos con antineoplásicos. También son efectivos en enfermedades neurodegenerativas, glaucoma, asma bronquial, anorexia, esclerosis múltiple, etc.⁵⁸ En los últimos años se ha despertado un gran interés en los cannabinoides como alternativas terapéuticas en procesos cancerosos como agentes antitumorales y como inductores del proceso de apoptosis, este último es el principal objetivo del presente trabajo de investigación.^{80,81}

Para lograr los efectos cannabinoides, no sólo se están desarrollando fármacos agonistas de los receptores cannabinoides, sino también inhibidores de las enzimas FAAH y MAGL que inducen la degradación de los endocannabinoides con la finalidad de elevar la concentración de los mismos dentro del organismo y prolongar sus efectos. Asimismo se vienen investigando nuevos fármacos que bloqueen el transporte de los endocannabinoides a través de la membrana.⁵⁸

En relación con el bloqueo de los efectos cannabinoides, se están investigando y desarrollando antagonistas inversos de estos receptores para tratar la obesidad.⁸¹

3.8 WIN-55,212-2

Es un potente agonista sintético no selectivo de los receptores cannabinoides⁵. Su Afinidad al receptor (ki) CB₁ es 62,3 nM mientras que la afinidad con el receptor CB₂ es de 3,3 nM (TOCRIS).⁸²

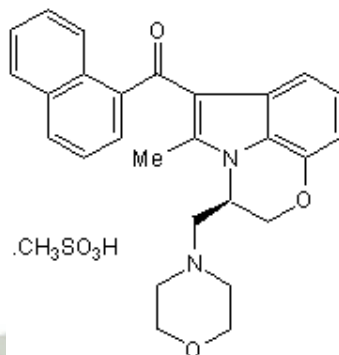


Figura N°9. Estructura química del cannabinoide WIN 55,212-2

Fuente: TOCRIS, 2016.⁸²

3.9 AM251

Potente antagonista inverso de los receptores CB₁ (IC₅₀ = 8 nM, K_i = 7,49 nM). Este compuesto muestra una selectividad para los receptores CB₁ 306 veces más, que los receptores CB₂. También es un potente agonista de los receptores GPR55 (TOCRIS).⁸³



Figura N°10. Estructura química del antagonista cannabinoide AM251

Fuente: TOCRIS, 2016.⁸³



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. MATERIALES

1.1 Material Biológico

- Células de cáncer de cuello uterino humano HeLa (ATCC)
- Anticuerpo anti-receptor de cannabinoide I (ab23703, ABCAM)
- Anticuerpo anti-receptor de cannabinoide II (ab3561, ABCAM)

1.2 Materiales de Vidrio

- Pipeta 10 mL y 25 mL.
- Probeta 100 mL y 1000 mL.
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Bagueta

1.3 Materiales de Laboratorio

- Frascos de cultivo de 10 cm² y 25 cm². (Sigma-Aldrich)
- Tubos de centrifuga de polipropileno estériles 15 mL y 25 mL (Falcon)
- Placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon)
- Placa de cultivo de 96 pocillos de color blanco (Falcon)
- Pipeta automática simple 0.1µL -2µL; 10µL -100µL; 20µL -200µL y 100µL - 1000µL.
- Pipeta automática multicanal 20 µL- 200 µL.
- Pipeta de plástico descartable 10 mL 25mL (Falcon)
- Pipeteador automático (Boeco)

- Contenedor de nitrógeno líquido
- Agitador Vortex (Fisher Vortex)
- Agitador Orbital (Thermo Scientific)
- Termómetro
- Puntas de pipeta automática
- Tubos Eppendorf
- Fuente de poder para la electroforesis

1.4 Equipos de Laboratorio

- Cámara de Flujo Laminar Clase II tipo A2 (Labculture reliant)
- Baño termostatzado de pepas metálicas (Lab Armor)
- Incubadora (Symphony)
- Microscopio óptico (Olympus)
- Centrifuga (DYNAC)
- Contador electrónico de células (Nexcelom)
- Espectrofotómetro (Micro Plate Reader, Biotek, Madison)
- Luminómetro (Micro Plate Reader, Biotek, Madison)
- Scanner para Western Blot (Scanner C-DiGit, LI-COR)

1.5 Reactivos

- Agonista no selectivo de los receptores cannabinoides WIN55,212-2 (Tocris Bioscience)
- Antagonista selectivo del receptor CB₁ AM251 (Tocris Bioscience)
- Medio de cultivo Eagle Mínimo Esencial (EMEM, ATCC)
- Suero Fetal Bovino (ATCC)
- Solución de 0.25 % Tripsina – 0.53 mM EDTA (ATCC)
- Buffer Fosfato Salino (PBS, Thermo Scientific)
- Dimetil Sulfoxido (Sigma-Aldrich)

- Kit para cuantificar proteínas BCA (Thermo Scientific)
- Buffer Reductor (BioProducts)
- Buffer M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific).
- Gel de poliacrilamida (Thermo Scientific)
- Buffer de Corrida (Thermo Scientific)
- Pack Buffer de Glicina (Thermo Scientific)
- Metanol (Sigma-Aldrich)
- Membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific)
- Buffer de bloqueo (Thermo Scientific)
- Buffer de lavado (Thermo Scientific)
- Sustrato quimioluminiscente (Thermo Scientific)
- Kit de ensayo colorimétrico de proliferación celular (Abcam)
- Kit para cuantificación de caspasas (Promega)

2. MÉTODOS

2.1 Cultivo Celular

Para realizar el cultivo de células humanas de cáncer de cuello uterino, se adquirió la línea celular humana HeLa, llamado así por la paciente de la cual se obtuvo el primer cultivo primario: Henrietta Lacks. Las células HeLa fueron compradas de ATCC (Virginia, EEUU). Las células estaban contenidas en un vial criopreservado.

2.1.1 Descongelación de las células

Previamente se preparó el medio de cultivo completo. Se utilizó el medio recomendado para el crecimiento para células HeLa llamado Eagle Mínimo Esencial (EMEM, ATCC), se utilizó un frasco con un volumen de 500 mL, a partir de este se preparó el medio completo. En la Cámara de Flujo Laminar (Labculture) se retiró 55

mL del frasco del medio EMEM, luego se agregó 50 ml de Suero Fetal Bovino como factor de crecimiento (FBS, ATCC) y 5 mL de una solución de Penicilina/Estreptomicina para evitar una posible contaminación microbiana. De esta manera se obtuvo el medio completo de crecimiento (EMEM+ 10% FBS + 1% de penicilina/estreptomicina).

Posteriormente se retiró el vial criopreservado del contenedor de nitrógeno líquido y se llevó al baño termostatizado de pepas metálicas (Lab Armor) programado a 37°C, agitando suavemente por 2 minutos, se retiró el vial y se limpió el envase con etanol al 70%.

En la Cámara de Flujo Laminar (Labculture) se retiró la tapa de vial y se extrajo todo el contenido (1 mL) con una micropipeta automática y se llevó a un tubo de centrifuga y se agregó 9 mL de medio completo EMEM, se resuspendió el contenido. Luego se llevó a la centrifuga por 10 minutos a 1000 rpm. Transcurrido el tiempo se decantó todo el contenido y se volvió a agregar 10 mL de medio completo, y se disolvió el pellet. Se transfirió todo el contenido a un frasco de cultivo de 25 cm², el frasco, denominado pasaje 1, se conservó en una Incubadora (Symphony) a 37 °C con una atmosfera al 5% de CO₂. Se observó el cultivo celular diariamente en el microscopio óptico (Olympus) para comprobar el crecimiento celular. Se cambió el medio de cultivo por medio fresco cada vez que se observó un viraje de color en este. También se observó el grado confluencia celular.

2.1.2 Subcultivo celular

Después de haber comprobado el 100% de confluencia celular en el frasco de cultivo se realizó un subcultivo celular. Primeramente se descartó el medio del frasco celular dentro de la Cámara de Flujo Laminar (Labculture), luego se enjuagó con 5 mL de PBS y se agitó moderadamente. Posteriormente se añadió 6 mL de la solución de

0.25 % Tripsina – 0.53 mM EDTA (ATCC), se removió el contenido y se incubó a 37°C por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se neutralizó la solución de tripsina-EDTA, añadiendo 4 mL del medio EMEM (ATCC) en un tubo de centrifuga. Luego se llevó a la centrifuga (DYNAC) por 5 minutos a 1000 rpm. Luego se decantó la solución de tripsina-EDTA sin remover el pellet. Se agregó 10 mL del medio EMEM y se procedió a resuspender el contenido con ayuda de la pipeta automática. Finalmente se distribuyó el contenido del tubo en proporciones iguales en dos frascos de cultivo de 10 cm² totalmente estériles y se agregó a cada uno de ellos 5 mL del medio de crecimiento y se rotularon ambos frascos según el número de pasaje.

Se repitió este procedimiento tantas veces como se observó la confluencia celular en los frascos de cultivo.

2.2 Identificación de los receptores cannabinoides

Para identificar a los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ se realizó una técnica llamada Western Blot, técnica que permite identificar una proteína específica en una muestra que contiene varias proteínas, en este caso la identificación de los receptores cannabinoides en células humanas de cáncer de cuello uterino (HeLa, ATCC).

Esta técnica se fundamenta en la separación de las proteínas en función de su peso molecular mediante una electroforesis en un gel de poliacrilamida, luego se utiliza un anticuerpo específico que permita detectar la proteína en estudio (Figura N°11).

Para lograr la identificación de los receptores cannabinoides por medio de esta técnica, previamente se realizó un lisado celular de la muestra, para que las células al degradarse, puedan liberar las proteínas y posteriormente puedan ser cuantificadas.⁸⁴

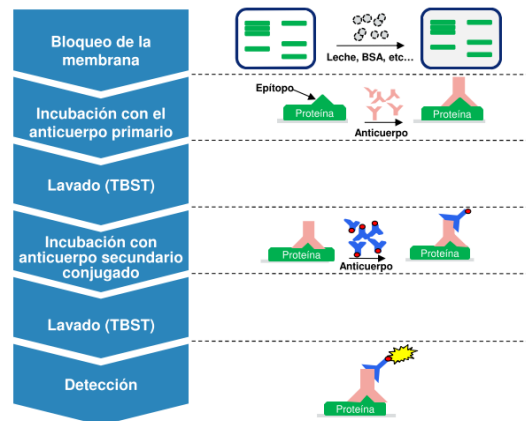


Figura N°11. Fundamento del método Western Blot

Fuente: Veiga A, 2013.⁸⁴

2.2.1 Lisado Celular

Uno de los frascos de cultivo que tenía 100% de confluencia fue utilizado para este procedimiento. Se decantó el contenido del frasco del cultivo y se enjuagó 2 veces con 5 mL de PBS. Luego se agregó 2 mL del mismo buffer y se procedió a raspar con ayuda de una escobilla pequeña la superficie del frasco. Posteriormente se transfirió el contenido a un tubo y se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos, transcurrido el tiempo se descartó el sobrenadante del tubo y se agregó 20 μ L de la solución buffer de lisis e inhibidor de proteasas. Se procedió a resuspender el pellet, luego se transfirió el contenido a un tubo eppendorf y se añadió un 1 mL de PBS, previamente enfriado. Inmediatamente se incubó en hielo por 10 minutos, homogenizándolo cada cierto tiempo en el agitador Vortex. Finalmente se volvió a centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se almacenó a -20°C hasta la cuantificación proteica.

2.2.2 Cuantificación Proteica

La cuantificación proteica se realizó por el método colorimétrico del ácido Bicinconínico (BCA) basado en la reacción de Biuret, cuyo fundamento se basa en que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos en condiciones alcalinas. El ácido Bicinconínico reacciona con los iones cuprosos y forman un complejo púrpura intenso. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, y sensible. Se utilizó el Kit Pierce BCA Protein (Thermo Scientific, Massachusetts EEUU).

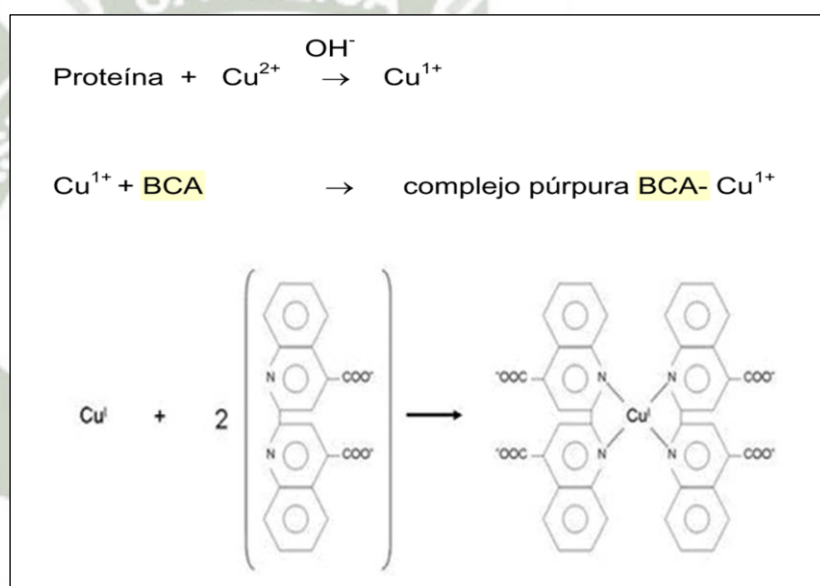


Figura N°12. Fundamento químico del método de cuantificación proteica BCA.

*Fuente: Brescia P, 2010.*⁸⁵

Primeramente se preparó las soluciones estándar a partir de la solución patrón de Albumina Sérica Bovina de concentración 2mg/ml contenida en el kit. Se prepararon 8 soluciones estándar de concentraciones: 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 2000 µg/ml en diferentes viales y un blanco que contenía solamente el diluyente.

Luego se preparó el reactivo de trabajo a partir del reactivo A y el reactivo B del kit en proporción 50:1.

En una placa de cultivo de 96 pocillos, se agregó 25 μL de cada estándar y del lisado celular obtenido en el punto 2.2.1 en diferentes pocillos. Los estándares y la muestra se trabajaron por duplicado. Luego se agregó 200 μL del reactivo de trabajo y se llevó al agitador orbital por 30 segundos. Posteriormente se incubó la placa de cultivo a 37°C por 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se dejó enfriar y se llevó a leer en el espectrofotómetro (Micro Plate Reader, Biotek) a una longitud de onda de 562 nm.

2.2.3 Western Blot

Una vez determinada la concentración proteica del lisado celular de HeLa, se tomó 5.6 μL de dicho lisado en dos tubos eppendorf, uno para cada receptor. Luego se agregó 5 μL del Buffer Reductor (Reducing Buffer, Bioproducts) y 9.5 μL del Buffer M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific) en cada tubo eppendorf. Luego se llevó ambos tubos a una cocinilla a 95°C por 5 minutos, para desnaturalizar las proteínas de la muestra.

A continuación se realizó la electroforesis en gel, se utilizó un gel de poliacrilamida (Thermo Scientific) por cada tubo eppendorf, luego se colocaron en compartimientos que contenían el buffer de Corrida (Thermo Scientific). Una vez instalado el gel, se procedió a sembrar 20 μL del contenido de las muestras en un carril de cada gel para la identificación de ambos receptores. Se conectó a una fuente de poder a 150 voltios por 42 minutos.

Paralelamente se preparó el buffer de transferencia con un pack de Buffer de glicina (Thermo Scientific) en 400 mL de agua destilada y 100 mL de metanol. Luego se incubaron las membranas de nitrocelulosa en el buffer recientemente preparado. Posteriormente

se removieron los geles de poliacrilamida y se procedió con la transferencia de estos a una membrana de nitrocelulosa, en presencia del Buffer de Transferencia (Thermo Scientific) en el aparato de transferencia, que se conectó a la corriente eléctrica a 14 Voltios por 45 minutos.

Luego se removieron las membranas y se colocaron en diferentes contenedores, a los cuales se le añadió 25 ml de Buffer de Bloqueo a cada uno, se mantuvieron en agitación por 1 hora. Luego se enjuagaron las membranas tres veces con el Buffer de lavado.

Posteriormente se disolvió 2 μL del Anticuerpo anti-receptor de cannabinoide I (ab23703, ABCAM) en 20 ml del Buffer de Bloqueo y se disolvió 40 μL del Anticuerpo anti-receptor de cannabinoide II (ab3561, ABCAM) en 20 ml del Buffer de Bloqueo.

Ambas disoluciones se agregaron a cada uno de los contenedores que contenían las membranas y se dejaron incubando durante 12 horas a 4°C en agitación constante. Transcurrido ese tiempo se lavaron las membranas 3 veces con el buffer de Lavado y se agregó 15 μL del anticuerpo secundario conjugado (ABCAM) a cada membrana, diluido previamente en 15 mL de buffer de Bloqueo. Se incubó por una hora con agitación constante. Luego de la incubación, se procedió a lavar 3 veces cada membrana con el buffer de Lavado. Posteriormente se agregó 6 mL del sustrato quimioluminiscente y se incubó por 5 minutos. Dicho sustrato reaccionó con el anticuerpo secundario produciendo una señal captada por el equipo de detección (Scanner C-DiGit, LI-COR).

2.3 Determinación de la viabilidad celular

Para comprobar el efecto apoptótico del cannabinoide empleado WIN55, 212-2 agonista no selectivo de los receptores cannabinoides I y II, se utilizó el ensayo de viabilidad y proliferación celular MTS, derivado de la técnica MTT. Ambas técnicas tienen el mismo fundamento, son ensayos colorimétricos basados en la reducción de una sal de tetrazolio por una enzima mitocondrial de células metabólicamente activas produciendo un producto formazán que tiene un máximo de absorbancia a 490 nm. Sin embargo la técnica MTS utiliza una sal de tetrazolio diferente a la del MTT llamada (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi- metoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio).^{86,87} Con este ensayo se intentó demostrar la capacidad citotóxica in vitro del cannabinoide en las células de cáncer de cuello uterino (HeLa). Este procedimiento se realizó por triplicado.

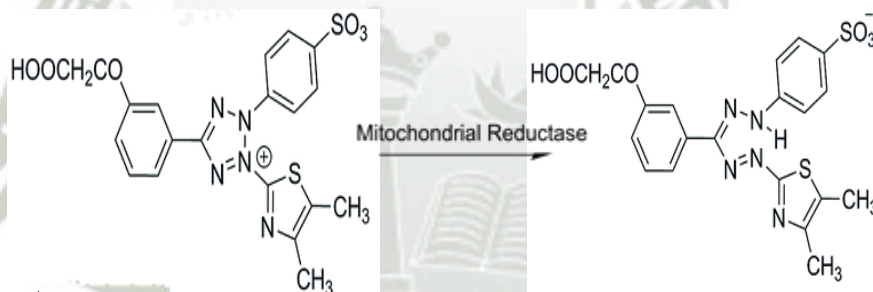


Figura N°13. Fundamento químico del ensayo MTS.

Fuente: Escobar L, 2010.⁸⁷

2.3.1 Influencia del agonista cannabinoide no selectivo WIN55, 212-2 sobre la viabilidad celular

En la Cámara de Flujo Laminar (Labculture reliant) se realizó un subcultivo especificado en el punto 2.1.2 de este capítulo. Una vez disuelto el pellet de células, se tomó 20 μ L de suspensión celular y se colocó en una lámina especial para introducir en el contador electrónico de células (Nexcelom), se programó dicho equipo y se

obtuvo el número de células por ml de suspensión celular. De acuerdo al número de células obtenidas se realizó el cálculo necesario para conocer el volumen adecuando que debe agregarse del medio EMEM a la suspensión celular, con el fin de obtener 30 000 células por pocillo aproximadamente en 170 μL de suspensión celular, la manera como se calculó el volumen de suspensión celular para tener dicha cantidad de células por pocillo esta especificada en los anexos.

Luego de obtenerse la suspensión celular adecuada, se tomó 170 μL y se colocó en cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos, sólo se rellenaron 28 pocillos por placa, distribuidos en 7 columnas y 4 filas, se rellenó una quinta fila con 170 μL de medio completo EMEM. Luego de ello, se incubaron las 3 placas de cultivo a 37°C por 24 horas, para lograr la adherencia de las células a cada pocillo.

Transcurridas las 24 horas se agregó el agonista cannabinoide a diferentes concentraciones. El cannabinoide WIN55, 212-2 fue adquirido de Tocris Bioscience (Minnesota, EEUU). El vial contenía 10 mg del compuesto y fue diluido con 191 μL de DMSO, obteniendo una concentración de 100 mM. Se preparó una solución stock de 1000 μM a partir del vial, utilizando como diluyente medio EMEM.

A partir del nuevo stock se prepararon soluciones del agonista WIN55, 212-2 que tuvieran las concentraciones de 0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM de WIN55, 212-2 en los pocillos utilizados, utilizando como diluyente EMEM.

Se agregó 20 μL de cada concentración en una columna diferente, de la placa de cultivo. La primera columna que quedó sin recibir el agonista (control), fue rellenada con 20 μL de medio EMEM y 0.1% DMSO. Luego se dejó incubar por 24 horas a 37°C.

Tabla N°2. Tabla resumen del tratamiento de las células HeLa con
WIN55, 212-2

Grupo Control	Tratamiento con WIN55, 212,2 (µM)					
Células + Vehículo	Células + 0.1	Células + 0.3	Células + 1	Células + 3	Células + 10	Células + 30
Blanco (Solo medio EMEM + tratamientos/vehículo)						

Fuente: Elaboración Propia

En donde:

- Grupo Control: Esta columna contenía 170 µL de suspensión celular y 20 µL de medio EMEM con 0.1% de DMSO.
- Tratamientos: Cada columna contenía 170 µL de suspensión y 20 µL del tratamiento WIN55, 212-2 en diferentes concentraciones de 0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM y 30 µM.
- Blanco: La última fila estaba compuesta solo por medio EMEM y los tratamientos, en diferentes pocillos.

Cumplido el tiempo se agregó 10 µL del reactivo del reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, Abcam). Finalmente se volvió a incubar por 3 horas a 37°C. Se dio lectura en un espectrofotómetro (Micro Plate Reader, Biotek, Madison) a 490 nm. La viabilidad de los grupos tratados con el agonista fueron expresados como porcentaje del grupo control, que presume tener 100 % de células viables.

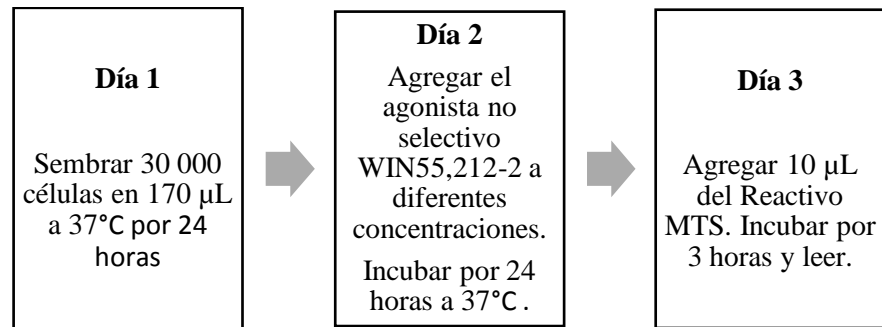


Figura N°14. Esquema Resumen del protocolo del ensayo MTS

Fuente: Elaboración Propia.

2.3.2 Influencia del agonista cannabinoide no selectivo WIN55, 212-2 sobre la viabilidad celular en presencia del antagonista del receptor cannabinoide tipo I AM251

En la Cámara de Flujo Laminar (Labculture reliant) se realizó un subcultivo especificado en el punto 2.1.2 de este capítulo. Una vez disuelto el pellet de células, se tomó 20 µL de suspensión celular y se colocó en una lámina especial para introducir en el contador electrónico de células (Nexcelom), se programó dicho equipo y se obtuvo el número de células por ml de suspensión celular. De acuerdo al número de células obtenidas se realizó el cálculo necesario para conocer el volumen adecuando que debe agregarse del medio EMEM a la suspensión celular, con el fin de obtener 30 000 células por pocillo aproximadamente en 170 µL de suspensión celular. La manera como se calculó el volumen de suspensión celular para tener dicha cantidad de células por pocillo esta especificada en los anexos.

Luego de obtenerse la suspensión celular adecuada, se tomó 170 µL y se colocó en cada pocillo de las placas de cultivo de 96 pocillos, sólo se rellenaron 20 pocillos por placa, distribuidos en 5 columnas y 4 filas, se rellenó una quinta fila con 170 µL de medio completo

EMEM. Luego de ello, se incubaron las 3 placas de cultivo a 37°C por 23 horas.

El antagonista del receptor cannabinoide tipo I AM251 fue adquirido de Tocris Bioscience (Minnesota, EEUU). El vial contenía 10 mg del compuesto y fue diluido con 180 μ L de DMSO, obteniendo una concentración de 100 mM.

Se preparó una solución stock de 1000 μ M a partir del vial, utilizando como diluyente medio EMEM. A partir del nuevo stock se prepararon soluciones del antagonista AM251 que tuvieran las concentraciones de 0.1 μ M, 10 μ M y 30 μ M en los pocillos utilizados, utilizando como diluyente EMEM.

Transcurridas 23 horas de haber agregado la suspensión celular en los pocillos, se añadió 20 μ L del antagonista en las 3 últimas columnas, colocando una concentración por columna, luego se agregó 20 μ L del medio EMEM con 0.1% de DMSO en la primera columna y se dejó incubar a 37°C por 1 hora.

Transcurrida una hora de haberse agregado el antagonista y 24 horas después que la suspensión celular fue agregada, se añadió el agonista WIN55, 212-2 de Tocris Bioscience (Minnesota, EEUU), el vial ya diluido previamente se utilizó para preparar la solución stock a la concentración de 1000 μ M, utilizando medio EMEM como diluyente.

A partir de la solución stock se preparó una solución de 30 μ M de WIN55, 212-2. Posteriormente se agregó 20 μ L de la solución de 30 μ M en las últimas 4 columnas de la placa de cultivo. La primera columna (control) que quedó sin recibir agonista y tampoco el antagonista, fue rellenada con 20 μ L de medio EMEM y 0.1% (vehículo) de DMSO. Luego se dejó incubar por 24 horas a 37°C.

Tabla N°3. Tabla resumen del tratamiento de las células HeLa con WIN55, 212-2 en presencia del antagonista (CB₁) AM251.

Control Negativo	Control Positivo	Tratamiento con 30 μ M de WIN55, 212,2 en presencia de AM251 (μ M)		
		Células	Células	Células
Células +	Células +	Células +	Células +	Células +
Vehículo +	Vehículo +	0.1	10	30
Vehículo	WIN	WIN	WIN	WIN
Blanco (Solo medio EMEM + tratamientos/vehículo)				

Fuente: Elaboración Propia.

En donde:

- Control Negativo: Esta columna solo contenía 170 μ L de suspensión celular y 40 μ L de medio EMEM con 0.1% de DMSO.
- Control Positivo: Esta columna contenía 170 μ L de suspensión celular, 20 μ L de medio EMEM con 0.1% de DMSO y 20 μ L de WIN55, 212-2 a la concentración de 30 μ M.
- Tratamientos: Cada columna contenía 170 μ L de suspensión celular, 20 μ L del antagonista AM251 selectivo para los receptores CB₁ en diferentes concentraciones de 0.1 μ M, 10 μ M y 30 μ M y 20 μ L de WIN55, 212-2 a la concentración de 30 μ M.
- Blanco: La última fila estaba compuesta solo por medio EMEM y los diferentes tratamientos según la columna que corresponda.

Cumplido el tiempo se agregó 10 μ L del reactivo del reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, Abcam). Finalmente se volvió a incubar por 3 horas a 37°C. Se dio lectura en un espectrofotómetro (Micro Plate Reader, Biotek, Madison) a 490 nm. La viabilidad de los grupos tratados con el agonista en presencia de 3 concentraciones diferentes del

antagonista fueron expresados como porcentaje del grupo control, que presume tener 100 % de células viables.

2.4 Determinación de la actividad de la Caspasa 3

Para la medición de la actividad de la Caspasa 3, se utilizó el Kit de luminiscencia Caspase-Glo 3 Assay (Promega, Wisconsin, EEUU). Este método utiliza un sustrato luminogénico que contiene una secuencia tetrapéptida que al contacto con la Caspasa 3, se produce una ruptura entre el sustrato y el tetrapeptido y con la presencia de una luciferasa se genera una señal luminiscente proporcional a la activación de la caspasa 3.⁸⁸

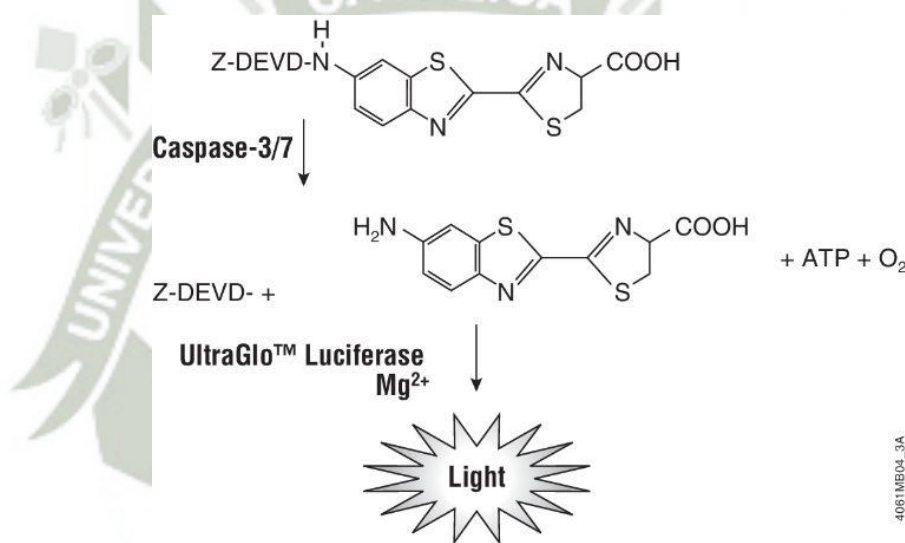


Figura N°15. Fundamento químico del método para identificar la actividad de la Caspasa 3.

Fuente: Promega, 2015.⁸⁸

2.4.1 Determinación de la actividad de la Caspasa 3 en células HeLa tratadas con el agonista cannabinoide no selectivo WIN55, 212-2

En la Cámara de Flujo Laminar (Labculture reliant) se realizó un subcultivo especificado en el punto 2.1.2 de este capítulo. Una vez disuelto el pellet de células, se tomó 20 µL de suspensión celular y

se colocó en una lámina especial para introducir en el contador electrónico de células (Nexcelom), se programó dicho equipo y se obtuvo el número de células por ml de suspensión celular. De acuerdo al número de células obtenidas se realizó el cálculo necesario para conocer el volumen adecuando que debe agregarse del medio EMEM a la suspensión celular, con el fin de obtener 30 000 células por pocillo aproximadamente en 200 μ L de suspensión celular.

Posteriormente se sembraron las células, agregando 200 μ L de suspensión celular en una placa de cultivo de 96 pocillos de color blanco en 24 pocillos separados en 6 columnas y 4 filas. Luego se agregó 200 μ L de medio EMEM en una tercera columna, que se rotuló como el control negativo. Se incubó la placa de cultivo a 37°C por 24 horas.

Antes de cumplirse el tiempo indicado se preparó el agonista WIN55, 212-2 de Tocris Bioscience (Minnesota, EEUU), el vial ya diluido previamente se utilizó para preparar la solución stock a la concentración de 1000 μ M, utilizando medio EMEM como diluyente. A partir de la solución stock se preparó una solución de 30 μ M de WIN55, 212-2.

Transcurridas las 24 horas de haber sembrado las células en la placa de cultivo, se removió el medio de los pocillos con una pipeta automática con cuidado de no tocar el fondo del pocillo y se agregó 80 μ L de medio EMEM no completo, es decir sin Suero Fetal Bovino. Luego se agregó 20 μ L de la solución de 30 μ M de WIN55, 212-2 solamente en una de las columnas que contenía la suspensión celular y el blanco. A la otra columna con suspensión celular y sin tratamiento (grupo control) solo se le agregó medio no completo

EMEM y 0.1% DMSO. Luego se incubó la placa de cultivo a 37°C por 6, 12, 18 y 24 horas.

Tabla N°4. Tabla resumen de los grupos utilizados para la determinación de la actividad de la Caspasa 3 en células HeLa tratadas con WIN55, 212-2.

Grupos	Tratamiento
Blanco	Estos pocillos solo contenían 80 μ L de suspensión celular y el vehículo. Se dispuso de un grupo control para cada tiempo analizado.
Tratamientos	Cada columna contenía 80 μ L de suspensión celular y 20 μ L del tratamiento WIN55, 212-2 a la concentración de 30 μ M. Se dispuso de un tratamiento para cada tiempo analizado.
Blanco	Estos pocillos estaban compuestos solo por 80 μ L de medio EMEM y el tratamiento (20 μ L de WIN55, 212-2 a la concentración de 30 μ M). Se dispuso un blanco para cada tiempo analizado.

Fuente: Elaboración Propia.

Posteriormente se preparó el reactivo del Kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). El Kit contenía dos viales: uno contenía el buffer de dilución y el otro el sustrato liofilizado. Se transfirió todo el contenido del buffer de dilución, previamente equilibrado a temperatura ambiente, al vial que contenía el sustrato liofilizado. Se agitó hasta que todo el contenido de este se disolviera y se almacenó a 4°C.

Al cabo de 6, 12, 18 y 24 horas de haber sido agregado el tratamiento, se agregó 100 μ L del reactivo, previamente equilibrado a temperatura ambiente, se agitó suavemente y se incubó a 37°C. Después de una hora de agregado el reactivo, se procedió a leer en un luminómetro (Micro Plate Reader, Biotek, Madison).

2.4.2 Determinación de la actividad de la Caspasa 3 en células HeLa tratadas con el agonista cannabinoide no selectivo (WIN55, 212-2) en presencia del antagonista del receptor cannabinoide tipo I (AM251)

En la Cámara de Flujo Laminar (Labculture reliant) se realizó un subcultivo especificado en el punto 2.1.2 de este capítulo. Una vez disuelto el pellet de células, se tomó 20 μL de suspensión celular y se colocó en una lámina especial para introducir en el contador electrónico de células (Nexcelom), se programó dicho equipo y se obtuvo el número de células por ml de suspensión celular. De acuerdo al número de células obtenidas se realizó el cálculo necesario para conocer el volumen adecuado que debe agregarse del medio EMEM a la suspensión celular, con el fin de obtener 30 000 células por pocillo aproximadamente en 200 μL de suspensión celular.

Posteriormente se sembraron las células, agregando 200 μL de suspensión celular en una placa de cultivo de 96 pocillos de color blanco en 24 pocillos separados en 6 columnas y 4 filas. Luego se agregó 200 μL de medio EMEM en una tercera columna, que se rotuló como el control negativo. Se incubó la placa de cultivo a 37°C por 24 horas.

Antes de cumplirse el tiempo indicado se preparó en antagonista CB_1 , el vial AM251 Tocris Bioscience (Minnesota, EEUU) previamente diluido tenía una concentración 100mM, a partir de la cual se preparó la solución stock a la concentración de 1000 μM , utilizando medio EMEM como diluyente. A partir de la solución stock se preparó una solución de 30 μM de AM251.

De la misma forma se preparó el agonista WIN55, 212-2 de Tocris Bioscience (Minnesota, EEUU), el vial ya diluido previamente se utilizó para preparar la solución stock a la concentración de 1000 μM , utilizando medio EMEM como diluyente. A partir de la solución stock se preparó una solución de 30 μM de WIN55, 212-2.

Transcurridas las 23 horas de haber sembrado las células en la placa de cultivo, se removió el medio de los pocillos con una pipeta automática con cuidado de no tocar el fondo del pocillo y se agregó 60 μL de medio EMEM no completo, es decir sin Suero Fetal Bovino. Luego se agregó 20 μL de la solución de 30 μM de AM251 solamente en una de las columnas que contenía la suspensión celular y el blanco. A la otra columna con suspensión celular y sin tratamiento (grupo control) solo se le agregó medio no completo EMEM y 0.1% DMSO. Luego se incubó la placa de cultivo a 37°C por 1 hora.

Al cumplirse dicho tiempo se agregó 20 μL de la solución de 30 μM WIN55, 212-2, en los mismos pocillos que se agregó el AM251, a la columna blanco solo se le agregó medio no completo EMEM y 0.1% DMSO y se incubó la placa de cultivo a 37°C por 6, 12 y 24 horas.

Tabla N°5. Tabla resumen de los grupos utilizados para la determinación de la actividad de la Caspasa 3 en células HeLa tratadas con WIN55, 212-2 en presencia del AM251.

Grupos	Tratamiento
Grupo Control	Estos pocillos solo contenían 60 μL de suspensión celular y el vehículo (EMEM +0.1% DMSO). Se dispuso de un grupo control para cada tiempo analizado.
Tratamientos	Cada columna contenía 60 μL de suspensión celular, 20 μL del tratamiento WIN55, 212-2 a la concentración de 30 μM , así como 20 μL de AM251 a la misma concentración. Se dispuso de un tratamiento para cada tiempo analizado.
Blanco	Estos pocillos estaban compuestos solo por 60 μL de medio EMEM y los tratamientos (20 μL de WIN55, 212-2 a 30 μM y 20 μL de AM251 a 30 μM). Se dispuso un blanco para cada tiempo analizado.

Fuente: Elaboración Propia.

Posteriormente se preparó otro reactivo del Kit Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega). El Kit contenía dos viales: uno contenía el buffer de dilución y el otro el sustrato liofilizado. Se transfirió todo el contenido del buffer de dilución, previamente equilibrado a temperatura ambiente, al vial que contenía el sustrato liofilizado. Se agitó hasta que todo el contenido de este se disolviera y se almacenó a 4°C.

Al cabo de 6, 12 y 24 horas de haber sido agregado ambos tratamientos, se agregó 100 µL del reactivo, previamente equilibrado a temperatura ambiente, se agitó suavemente y se incubó a 37°C. Después de una hora de agregado el reactivo, se procedió a leer en un luminómetro (Micro Plate Reader, Biotek, Madison).

2.5 Análisis Estadístico

Todos los resultados se recolectaron en el Programa Microsoft Excel para su posterior análisis. El análisis de los datos obtenidos fue analizado en el programa Sigma Plot (Systat Software Inc). Dicho programa primero realizó un análisis de varianza de un vía (ANOVA) con un nivel de significancia de $P = <0.001$. También se realizó el test de Dunnett para conocer si los datos obtenidos tenían una diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, a un nivel de significancia de $P = <0.05$.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos siguen la secuencia de los métodos presentados en el capítulo anterior.

3.1 Cultivo Celular

Las células de cáncer de cuello uterino (Hela, ATCC), fueron cultivadas a partir de un vial criopreservado. Después del descongelamiento de dicho vial, las células se cultivaron en frascos que contenían el medio. Los frascos se mantuvieron en condiciones específicas y fueron observados a diario, para comprobar el crecimiento celular.

Se realizó el cambio de medio EMEM por medio fresco, cuando se observó un cambio de color (rojo a naranja), este proceso sucedía cada 3 días aproximadamente. El cambio de medio se realizó por dos motivos: Disminución de los nutrientes del medio y Acumulación de productos de desecho. Estos eventos provocan la disminución del pH, produciendo la acidificación del medio y que es manifestado por el viraje del color.

También se controló diariamente la confluencia celular (adherencia de las células a la superficie del frasco de cultivo), cuando se observó que la superficie del frasco estaba totalmente adherida de células, se realizó el subcultivo celular.

En la Figura N°16 se puede apreciar la imagen microscópica de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa) a una vista de 40X. Esta imagen fue capturada con el microscopio invertido (Olympus) el primer día de haber realizado un nuevo subcultivo.

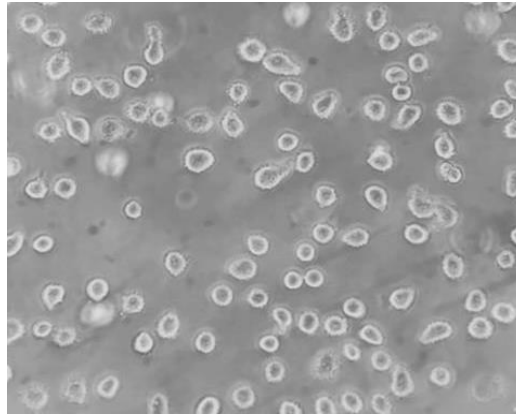


Figura N°16. Imagen microscópica del cultivo de células de cáncer de cuello uterino (HeLa, ATCC) capturada el primer día de cultivo.

Fuente: Elaboración propia

En la Figura N°17 se observa la imagen microscópica de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa) a una vista de 40X. Esta imagen fue capturada con el microscopio invertido (Olympus) al cuarto día de haber realizado un nuevo subcultivo, donde la confluencia celular es del 100 %.

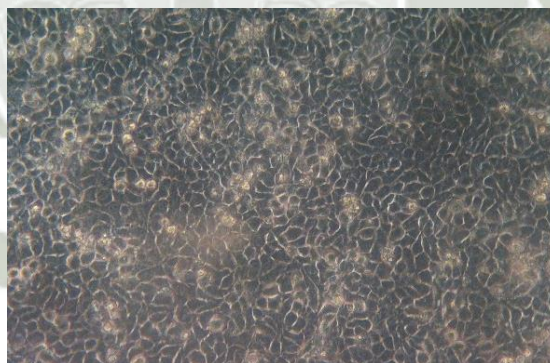


Figura N°17. Imagen microscópica del cultivo de células de cáncer de cuello uterino (HeLa, ATCC) capturada al cuarto día de cultivo.

Fuente: Elaboración propia

La celeridad del crecimiento de las células cancerosas, se observó en el cultivo de la línea HeLa, en la figura N°16 se aprecia la imagen de dicha línea celular en el primer día de cultivo, en la cual no se observa

confluencia celular ni células adheridas al frasco de cultivo. En contraste con la Figura N°17, en la que se observa la imagen del cuarto día de cultivo donde se aprecia un 100% de confluencia celular y en su totalidad adheridas al frasco de cultivo.

Una de las características principales de las células cancerosas es la capacidad de división ilimitada debido a un aumento de las señales de crecimiento e inhibición de los mecanismos apoptóticos.¹⁴ Estos eventos generan que las células cancerosas se repliquen con mayor rapidez que una célula normal.⁵

3.2 Identificación de los receptores CB₁ y CB₂

Tal como se indicó en el capítulo de materiales y métodos se realizó la identificación cualitativa de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ a través de la técnica Western Blot. Previamente a dicha técnica, se realizó un lisado celular de HeLa, luego se desarrolló la cuantificación proteica a través del método del ácido Bicinconínico (BCA). Para hallar la concentración proteica de la muestra se utilizaron 8 estándares y un blanco. Con las absorbancias obtenidas de cada estándar se construyó una curva de calibración apreciada en la Figura N°18.

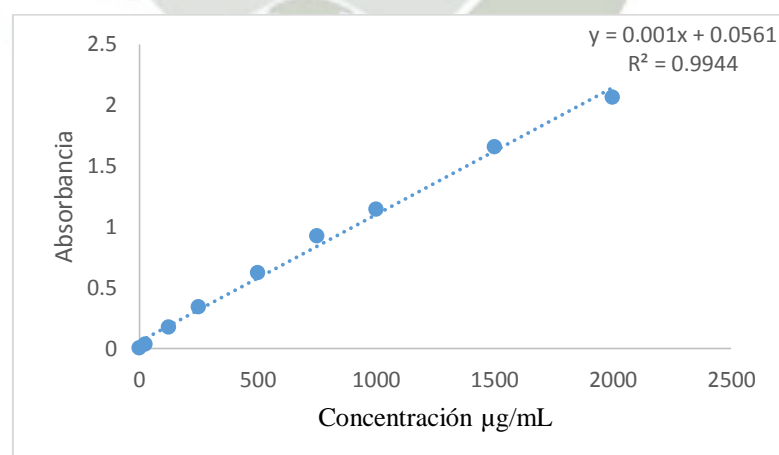


Figura N°18. Curva de Calibración para determinación la concentración proteica.

Fuente: Elaboración Propia

Luego de obtener la curva de calibración a partir de las absorbancias de cada solución estándar, se hallaron los siguientes valores:

Tabla N°6. Valores de obtenidos a partir de la curva de calibración

Intercepto (m)	0.001
Valor B	0.0561
Valor R ²	0.9944

Fuente: Elaboración propia.

Con los valores obtenidos se construyó la ecuación de la recta, presentada a continuación:

$$y = 0.001x + 0.0561$$

Ecuación N°1. Ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración.

Fuente: Elaboración Propia.

Una vez encontrada la ecuación de la recta, se reemplazó el valor del promedio de las absorbancias de la muestra y se reemplazó en la ecuación 1 obteniendo como resultado la concentración proteica total de las células HeLa 8994 $\mu\text{g/mL}$. Después de haber determinado la concentración proteica de las células HeLa, se realizó un cálculo para conocer cuál era el volumen que debía tomarse del lisado celular para obtener 50 μg de proteína en cada muestra, se obtuvo que el volumen que debía tomarse del lisado era 5.6 μL .

Se realizó la desnaturalización de la muestra con el fin de que las proteínas regresen a su estructura primaria, facilitando que las proteínas pueden separarse en función del peso molecular. Las proteínas quedan cargadas negativamente.⁸⁴ Posteriormente se realizó la electroforesis en un gel de poliacrilamida para separar a las proteínas en función de su peso molecular. Se aplicó un campo eléctrico que posibilita la migración de las proteínas hacia un polo positivo.⁸⁴

Es importante remarcar que luego de la electroforesis, se realizó una transferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa para facilitar la marcación de las proteínas en estudio. Las proteínas se adhirieron a la membrana en la misma disposición que en el gel.

La inmunodetección se realizó con los anticuerpos anti-receptor de cannabinoide I y anti-receptor de cannabinoide II en cada muestra. El equipo detectó la presencia de una banda en cada gel, que corresponden a los receptores cannabinoideos. Se trabajaron dos membrana, una para el receptor CB₁ y otra para el receptor CB₂. También se utilizó un control positivo para cada receptor.

En la Figura N°19 se observa dos bandas. En el carril 1 (C1) se aprecia una banda gruesa que corresponde al Control Positivo. En el carril 2 (C2) de la se observa una banda tenue correspondiente a la presencia del receptor CB₁ en las Células de Cáncer de Cuello Uterino.



Figura N°19. Bandas obtenidas con el anticuerpo CB₁ (53 kDa) en las Células HeLa.

Fuente: Elaboración Propia.

En la Figura N°20 se aprecia las bandas obtenidas correspondientes al receptor CB₂ tanto en el control positivo, observado en el carril 1 (C1) como el de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa).



Figura N°20. Bandas obtenidas con el anticuerpo CB₂ (60 kDa) en las células HeLa.

Fuente: Elaboración Propia.

En ambas figuras, se confirma la presencia de los receptores cannabinoides CB₁ (Figura 19) y CB₂ (Figura 20) en las células HeLa. Se utilizó un Protein Ladder traducido como “Marcador de peso Molecular” para comparar la ubicación de las bandas en la muestra con la del marcador. Según el lugar que ocupa la banda en la membrana se puede conocer el peso de las proteínas en kDa. Las proteínas más pesadas se quedan en parte inferior de la membrana, mientras que las más livianas se ubican en la parte superior de la misma.

Comparando las dos membranas, para la identificación de cada receptor, con el del marcador de peso molecular de proteínas que tenía un rango entre (15 y 100 kDa) se obtuvo que las bandas observadas en la primera membrana (Figura N°19) se colocaron a la altura de 50 kDa, con lo que se podría indicar que corresponde al peso del receptor CB₁ (53 kDa) referido en el protocolo del anticuerpo anti-receptor de cannabinoide I (ABCAM).

En el caso de la banda observada en la Figura N°20, también fue comparada con el marcador de peso de proteínas, y se observó que el lugar que ocupaba dicha banda era el mismo de una proteína con un peso entre 60 y 65 kDa, con lo que se podría indicar que corresponde al peso del receptor CB₂ (60 kDa) referido en el protocolo del anticuerpo anti-receptor de cannabinoide II (ABCAM).

A través de la técnica Western Blot se confirmó la presencia cualitativa de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂. Se identificó al receptor cannabinoide tipo I (CB₁) con una banda observada en la Figura N°19, sin embargo la banda obtenida es tenue comparada con la banda del control, indicando que la expresión del receptor CB₁ es menor que en la del control utilizado, el resultado encontrado tiene relación con las afirmaciones mencionadas por Grotenhermen, ya que el receptor CB₁ se encuentra expresado mayormente en el Sistema Nervioso Central y en menor cantidad en tejidos periféricos.^{55,58} En el caso del receptor cannabinoide tipo II (CB₂) se observó que la banda de la muestra y la del control positivo tienen la misma intensidad (Figura N°20). Se puede afirmar que la

línea celular HeLa expresa el receptor CB₂, este dato tiene concordancia con estudios realizados por Galgglje et al y Buckley et al.^{89,90}

3.3 Determinación de la viabilidad celular:

Luego de haber confirmado la expresión de los receptores cannabinoides tipo I y tipo II en la línea celular HeLa, se realizó un ensayo de viabilidad y proliferación celular denominado MTS, derivado del ensayo MTT. Se eligió este método debido a que el reactivo utilizado, se agrega directamente en medio de cultivo, sin necesidad de pasos intermedios, como es necesario en el ensayo MTT. Asimismo el reactivo es reducido por la cadena respiratoria de las células viables a un producto coloreado formazán que también es soluble en el medio de cultivo. Este ensayo fue utilizado para evaluar la viabilidad celular en HeLa 24 horas después de haber sido agregado el cannabinoide WIN55, 212-2.

De acuerdo a la bibliografía revisada, existe evidencia que los cannabinoides tienen un rol importante en la apoptosis de las células cancerígenas. Estudios anteriores, como el de Mayorga et al, revelan la fuerte influencia que tienen los cannabinoides en la muerte celular,⁹¹ otro estudios como los de Velasco y Carracedo destacan la acción de los fitocannabinoides como agentes antitumorales.^{92,93} Se escogió al cannabinoide sintético WIN55, 212-2 por ser un potente agonista sintético no selectivo de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂, para inducir la muerte celular en células de cáncer de cuello uterino (HeLa).

El tratamiento fue el cannabinoide sintético WIN55, 212-2 fue administrado en concentraciones crecientes de de 0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM y 30 µM a pocillos que contenían 30 000 células de cáncer de cuello uterino, por pocillo, a excepción de la primera columna que se denominará grupo control. Luego de 24 horas de haber sido aplicado dicho

tratamiento se agregó el reactivo del Kit de viabilidad celular, MTS y se esperó tres horas para poder leer las absorbancias de las células tratadas.

La viabilidad de los grupos tratados con el agonista fueron expresados como porcentaje del grupo control, que presume tener 100 % de células viables. Este porcentaje se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ Células Viables} = \frac{(P \text{ Abs pocillo} - \text{Abs blanco})}{(P \text{ control} - \text{Abs blanco})} \times 100$$

Ecuación N°2. Ecuación utilizada para determinar el % de células viables.

Donde:

- P Abs pocillo: Representa la absorbancia promedio de los 4 pocillos de los tratamientos.
- Abs blanco: Representa la absorbancia del pocillo que contiene el respectivo blanco del grupo control o el blanco de cada concentración del tratamiento.
- P control: Representa el promedio de las absorbancia del grupo control.

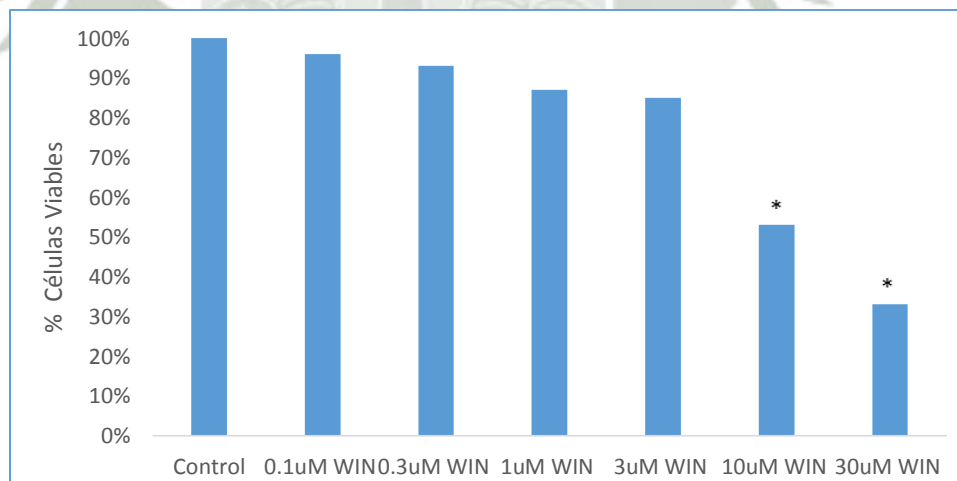
Se reemplazaron los valores en la ecuación 2 para obtener el porcentaje de células viables de las concentraciones empleadas para cada repetición. Este ensayo se realizó por triplicado, los valores individuales se encuentran adjuntados en el Anexo II. Luego se calculó el porcentaje promedio de las tres repeticiones, dichos resultados promedios se presentan en la tabla a continuación:

Tabla N°7. Células Viables (%) promedio del tratamiento con WIN55, 212-2 en células HeLa.

Concentración μM	Células viables %
0.1	96
0.3	93
1	87
3	85
10	53
30	33

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla N°7, se detallan los porcentajes promedio obtenidos a partir de las concentraciones utilizadas de WIN55, 212-2. Estos valores corresponden al porcentaje de células Viables determinada por el ensayo MTS, en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) y están representados en la siguiente figura:



* $p < 0.001$ vs. Control; $n = 3$

Figura N°21. Efecto del WIN-55,212-2 en las células de cáncer de cuello uterino (HeLa)

Fuente: Elaboración propia.

Como se ilustra en la Figura N°21 concentraciones crecientes del cannabinoide WIN 55, 212-2 disminuye el número de células viables de la línea celular HeLa en 24 horas de haber sido administrado. Los datos son expresados como el porcentaje del control. Las concentraciones de 10 μM y 30 μM producen una disminución estadísticamente significativa ($P = <0.001$) comparado con el control en las células HeLa. Los análisis estadísticos fueron realizados por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Dunnett.

Con los datos obtenidos se puede deducir que el cannabinoide WIN55, 212-2 está induciendo la apoptosis o muerte células de las células HeLa a las concentraciones de 10 μM y 30 μM a las 24 horas después de haber administrado dichas concentraciones del tratamiento. La concentración de WIN55, 212-2 a 10 μM reduce la viabilidad de las células HeLa en un 47 % mientras que a la concentración de 30 μM disminuye el número de células viables en un 67% en 24 horas comparado con el grupo control que tuvo un 100% de células viables.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación concuerdan con estudios realizados anteriormente como el de Maccarrone, et al y Mayorga. Se ha demostrado que la anandamida, un cannabinoide endógeno o también llamado endocannabinoide, tiene un efecto citotóxico en células cancerígenas.^{73,91} En los estudios mencionados se ha descrito el rol importante que tiene la anandamida en la apoptosis, proceso que es mediado por la vía de las MAP Quinasas (MAPK).⁷³

En otras investigaciones se han utilizado otros cannabinoides como el THC y otros cannabinoides sintéticos como el WIN55, 212-2 en células de cáncer pancreático, donde se ha demostrado que estos cannabinoides inducen la apoptosis de dichas células en 18 horas de haber sido aplicados los tratamientos antes mencionados.⁹⁴

Los estudios que se han desarrollado con anandamida han probado el efecto apoptótico de dicho compuesto en células de cáncer de mamá.^{95,96} También se ha utilizado el WIN55, 212-2 en este tipo de células logrando una disminución del 50% de la viabilidad celular.⁹⁷

En una investigación realizada por Contassot, et al. se comprobó que la anandamida produce un efecto citotóxico en diferentes células de cáncer de cuello uterino (Caski, HeLa) después de 72 y 120 horas de haber aplicado este endocannabinoide a una concentración de 30 μM .⁹⁸ Es importante resaltar que en dicho estudio se consiguió disminuir las células viables de las células en un 70 y 80% para células Caski, y en un 40 y 70% en células HeLa, después de 72 y 120 horas respectivamente.

En el presente estudio se utilizó un agonista sintético no selectivo de los receptores cannabinoides y se logró disminuir la viabilidad celular en un 50% con 10 μM y un 67% con 30 μM de WIN55, 212-2 en tan solo 24 horas de haber aplicado el tratamiento, con lo que se puede deducir que el cannabinoide WIN55, 212-2 posee una mayor potencia y efectividad que el cannabinoide endógeno anandamida.

A partir de estos resultados, se escogió la concentración de 30 μM de WIN55, 212-2 para la realización de los ensayos posteriores, debido a que dicha concentración demostró tener una mayor efectividad para inducir el efecto apoptótico en células de cáncer de cuello uterino.

Como se detalló en el capítulo de Materiales y Métodos, luego de haber logrado la muerte celular utilizando el cannabinoide WIN55, 212-2, se realizó nuevamente el ensayo MTS para determinar la influencia de un antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB_1 . Este ensayo se realizó con el propósito de determinar si el efecto apoptótico era mediado por dicho receptor.

Se utilizó el compuesto AM251 (TOCRIS) como antagonista selectivo del receptor CB_1 . La función de dicho antagonista es inhibir el posible efecto

que pueda tener dicho receptor. Es decir, si el efecto apoptótico es inducido por el receptor CB₁, el porcentaje de células viables debería incrementarse al administrar el respectivo antagonista, inhibiendo el efecto apoptótico logrado cuando solamente se administró WIN55, 212-2.

Si la muerte celular fuera inducida por el receptor CB₂ u otro receptor, la inhibición del receptor CB₁ inducida por el antagonista AM251, no afectaría la disminución en la viabilidad celular de HeLa cuando se administró el agonista WIN55, 212-2.

Se desarrolló otro ensayo de viabilidad MTS para conocer la influencia del antagonista AM251 sobre la línea celular HeLa. Se aplicó el mismo procedimiento utilizado para determinar la Viabilidad Celular cuando se administró solamente el WIN55, 212-2 sobre las células en estudio. La única variación que se realizó, fue agregar el antagonista AM251 una hora antes de la administración del agonista WIN55, 212-2, de tal manera que el compuesto AM251 pueda inhibir al receptor CB₁ antes de la adición del agonista, bloqueando así los posibles efectos que pueda inducir la activación del receptor cannabinoide CB₁.

Se trabajó con cuatro grupos: control negativo, control positivo, tratamiento y blanco. En el grupo de tratamiento se agregó el antagonista AM251 selectivo para los receptores CB₁ a las concentraciones de 0.1 μM, 10 μM y 30 μM, en la placa de cultivo. Luego de una hora de la adición del antagonista, se agregó el agonista WIN55, 212-2 a la concentración más efectiva (30 μM), y se dejó incubar por 24 horas.

La viabilidad de los grupos tratados tanto con el agonista, como con el antagonista, fueron expresados como porcentaje del grupo control, que presume tener 100 % de células viables. Este porcentaje se calculó con la Ecuación N°2, mencionada anteriormente:

$$\% \text{ Células Viables} = \frac{(P \text{ Abs pocillo} - \text{Abs blanco})}{(P \text{ control} - \text{Abs blanco})} \times 100$$

Ecuación N°2. Ecuación utilizada para determinar el porcentaje de células viables.

Fuente: Elaboración Propia.

Donde:

- P Abs pocillo: Representa la absorbancia promedio de los 4 pocillos, de los tratamientos.
- Abs blanco: Representa la absorbancia del pocillo que contiene el respectivo blanco del grupo control o el blanco de cada tratamiento.
- P control: Representa el promedio de las absorbancia del grupo control.

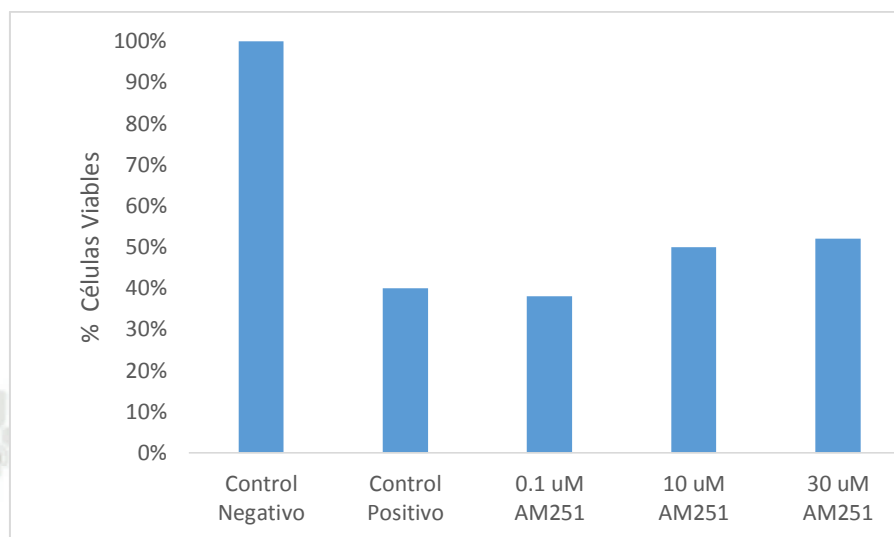
Se reemplazaron los valores en la Ecuación N°2 para obtener el porcentaje de células viables de las concentraciones empleadas para cada repetición. Este ensayo se realizó por triplicado. Luego se calculó el porcentaje promedio de las tres repeticiones, dichos resultados promedios se presentan en la tabla a continuación:

Tabla N°8. Células viables (%) promedio del tratamiento con WIN55, 212- en presencia de antagonista selectivo para el receptor cannabinoide CB₁ (AM251) en células HeLa.

Tratamiento	Células Viables %
Control Negativo	100
Control Positivo	42
0.1 μM AM251	38
10 μM AM251	50
30 μM AM251	52

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla N°8 se detallan los porcentajes promedio obtenidos a partir de las concentraciones utilizadas de WIN55, 212-2 en presencia del antagonista AM251, obtenidos a través del ensayo MTS. A partir de dichos porcentajes se construyó el gráfico que se detalla a continuación.



AM251	-	-	0.1 μ M	10 μ M	30 μ M
WIN55, 212-2	-	30 μ M	30 μ M	30 μ M	30 μ M

* $p < 0.001$ vs. Control; $n = 3$

Figura N°22. Efecto del agonista no selectivo WIN-55,212-2 en presencia del antagonista selectivo para el receptor CB₁ AM251 en células de cáncer de cuello uterino (HeLa).

Fuente: Elaboración propia.

Como se ilustra en la Figura N°22, el control positivo obtiene un porcentaje de células viables alrededor del 40%, es decir; el número de células viables está disminuyendo en más del 60% en un periodo de 24 horas, mostrando una diferencia significativa comparada con el control negativo que tuvo un 100% de células viables. Este resultado vuelve a confirmar el efecto citotóxico del cannabinoide WIN55, 212-2 en células HeLa.

También se observa que concentraciones crecientes (0.1, 10, 30 μM) del antagonista selectivo para el receptor cannabinoide CB_1 AM251, en presencia de una concentración constante de 30 μM de WIN55,212-2 después de 24 horas, presentan una ligera tendencia a incrementar el porcentaje de células viables conforme se aumentó la concentración del antagonista, sin embargo dichos resultados no exhiben una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control positivo. Los datos fueron expresados como el porcentaje del control negativo. Los análisis estadísticos fueron realizados por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por el test de Dunnett.

La disminución del porcentaje de células viables provocada por el agonista cannabinoide no selectivo WIN55, 212-2 (30 μM) en 24 horas, no se ve afectada por la adición del antagonista selectivo del receptor cannabinoide CB_1 AM251. A pesar de la ligera tendencia a incrementar el porcentaje de células viables, este incremento no presenta una diferencia significativa comparada con el resultado del tratamiento realizado solamente con el agonista (control positivo).

Con los datos antes mencionados, se puede deducir que la muerte de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa) no es inducida por el receptor cannabinoide CB_1 , tal como se evidenció con la adición del antagonista selectivo AM251, o que probablemente contribuye con este efecto pero de manera muy escasa, debido a que este receptor se encuentra más difundido en el Sistema Nervioso que en los tejidos periféricos,⁵⁸ como se demostró en los resultados de la técnica del Western Blot (Figura N°19). Por lo tanto el efecto apoptótico producido por el agonista cannabinoide no selectivo WIN55, 212 -2 podría ser inducido por el receptor CB_2 u otro receptor, como el receptor Vanilloide (TRPV1), ya que ambos receptores se encuentran expresados en células de cáncer de cuello uterino.⁹⁸ Desafortunadamente no se pudieron realizar otras pruebas con antagonistas selectivos para dichos receptores, debido a que no se contó con el

presupuesto necesario para adquirirlos en el laboratorio donde se realizó esta investigación (Laboratorio de Farmacología, MCPHS, Boston).

Tomando de referencia estudios anteriores como el de Carracedo, et al⁹⁹ y Mayorga, et al.,⁹¹ etc., que señalan al receptor CB₂ como principal responsable del efecto proapoptótico de células cancerígenas y su rol fundamental en dicho efecto. Se ha comprobado que la muerte de células de cáncer pancreático es producida tras la activación del receptor CB₂.⁹⁴ Esta afirmación es clínicamente relevante debido a que la activación selectiva del receptor CB₂ no está vinculada con los efectos psicoactivos de la planta *Cannabis Sativa*, contrariamente a los efectos provocados tras la activación del receptor CB₁. En contraste con estas afirmaciones, otras investigaciones afirman que la muerte celular es mediada por el receptor CB₁ en células de cáncer de glía (glioblastoma) y neuroblastoma e incluso que su activación, induce a efectos antitumorales,^{91,92,100} lo cual concuerda con el hecho que el receptor CB₁ está ampliamente difundido en el Sistema Nervioso y menor medida en tejidos periféricos, aunque se ha descrito que el único lugar del sistema nervioso donde se encuentra expresado el receptor CB₂ es en las células gliales.⁵⁵

En el marco teórico de esta investigación se habló de la afinidad que tienen los endocannabinoides y otros cannabinoides por otros receptores, como el Receptor Vanilloide.⁵⁸ Algunos estudios demuestran que el cannabinoide endógeno anandamida induce la muerte celular a través del Receptor Vanilloide (TRPV1) en otros tipos de células cancerígenas. En contraste con los estudios mencionados anteriormente, los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ ejercen un rol protector en dichas células.^{98,101}

De acuerdo a los artículos revisados, se puede sugerir que el efecto apoptótico es mediado por el receptor que predomine en el tejido investigado. Por ejemplo en células y tumores provenientes del sistema nervioso, en el que receptor CB₁ se encuentra en mayor proporción, tiene

sentido encontrar que el efecto apoptótico sea mediado por dicho receptor. En el caso de los estudios realizados con células de cáncer pancreático, en los que se afirmó que el efecto apoptótico era mediado por el receptor CB₂, coincide con el hecho de que existe una gran expresión de este receptor en células pancreáticas y una nula expresión del receptor CB₁.⁸⁹ También es importante resaltar el papel recién descubierto del receptor Vanilloide en la muerte celular, que se aconseja investigar en estudios posteriores. Sin embargo la activación del receptor por el cual los cannabinoides ejercen su efecto apoptótico continua en estudio, dado el profundo interés que tienen como futuros tratamientos anticancerígenos.

3.4 Determinación de la actividad de la Caspasa 3

El mecanismo por el cual los cannabinoides tanto endógenos como exógenos inducen la apoptosis de algunas células, no es del todo claro hasta el momento, sin embargo; la actividad enzimática de las proteínas caspasas (sobre todo la Caspasa 3), desempeñan un papel clave en la vía apoptótica de las células. Es por ello que su determinación, es importante para confirmar el efecto apoptótico.¹⁰² En este ensayo se realizó determinación de la actividad de la Caspasa 3, calculando el porcentaje de incremento comparado con un control de células no tratadas, con el fin de corroborar la muerte celular y de verificar si este efecto es producido a través de la cascada de activación de caspasas dando como resultado la apoptosis de las células de cáncer de cuello uterino y con ello descartar que la disminución en el porcentaje de células viables sea producido por otro estímulo como el de la necrosis celular. La determinación de la actividad de la Caspasa 3 es inversamente proporcional con la viabilidad celular, es decir; mientras exista un mayor número de células muertas, la viabilidad celular descenderá, mientras que la actividad de las Caspasas tiende a aumentar.¹⁰³

Se ha demostrado que los cannabinoides inducen la apoptosis de otras células cancerígenas, sin embargo, aún no está definido si dicho proceso utiliza la vía extrínseca o intrínseca para gatillar el proceso de apoptosis. Con la determinación de la actividad de la Caspasa efectora 3, sea cual sea la vía por la que los cannabinoides producen dicho efecto, se podrá confirmar que estos compuestos producen la apoptosis, debido a que la caspasa 3 es activada por ambas vías.

Se trabajó de la misma forma que en el ensayo de viabilidad celular (MTS) con un grupo blanco, un grupo control y el grupo de tratamientos.

La intensidad expresada en URL del tratamiento con 30 μ M de WIN55, 212-2 en los diferentes tiempos (6, 12, 18, 24 horas) fueron expresados como porcentaje del incremento del grupo control en cada tiempo. Este incremento se calculó en base a la medida del número de veces que había superado al grupo control, expresada en la Ecuación N°3.

$$\% \text{ Incremento} = \frac{(\text{URL tratamiento} - \text{URL blanco})}{(\text{URL control} - \text{URL blanco})} \times 100$$

Ecuación n°3. Ecuación utilizada para determinar el incremento de la Caspasa 3.
Fuente: Elaboración Propia.

Donde:

- URL tratamiento: Representa el URL promedio de los pocillos con tratamiento en cada tiempo.
- URL blanco: Representa el URL del pocillo que contiene el respectivo blanco en cada tiempo.
- URL control: Representa el URL del pocillo que contiene el respectivo control en cada tiempo.

Luego de obtener dichos porcentajes de incrementos en la actividad de la caspasa 3, representados en la Tabla N°9, se procedió a construir un gráfico de barras mostrado en la Figura N°23.

Tabla N°9. Incremento (%) de la actividad de la Caspasa 3 en relación al tiempo.

Tiempo	% de Incremento
6h	222%
12h	390%
18h	329%
24h	278%

Fuente: Elaboración propia.

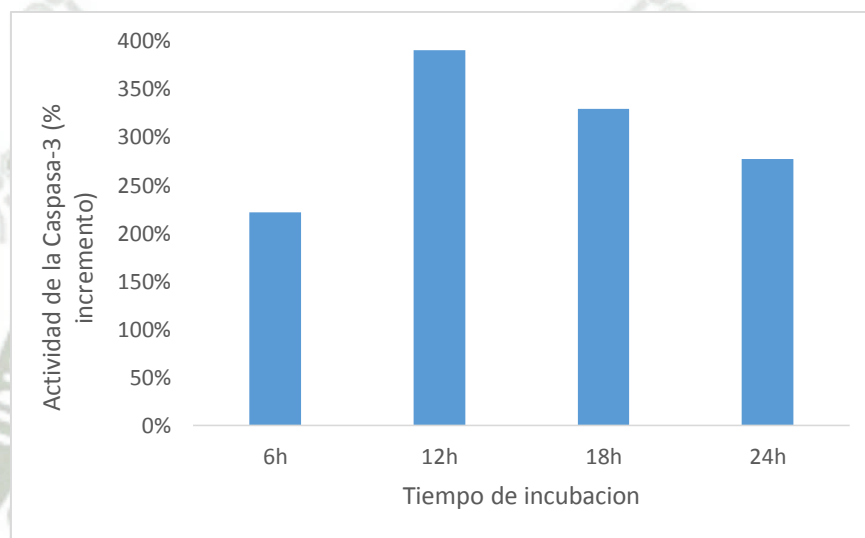


Figura N°23. Incremento (%) de la actividad de la Caspasa 3 en 6, 12, 18 y 24 horas.

Fuente: Elaboración propia

En base al porcentaje de incremento se determinó que la actividad de la Caspasa efectora 3 aumenta conforme avanza el tiempo de incubación hasta las 12 horas, donde se obtiene el máximo porcentaje de incremento (390%), transcurrido ese tiempo, la concentración de Caspasas tiende a descender hasta un 278% en un periodo de 24 horas.

Con los resultados presentados en la tabla 4 y gráfico 3 se confirma que la muerte celular producida por WIN55, 212-2 es a través de la cascada de activación de caspasas generando la apoptosis de las células de cáncer de

cuello uterino (HeLa). Se observa que el porcentaje de incremento máximo es producido a las 12h, en el cual ocurre la máxima activación de la Caspasa 3.

El ensayo de determinación de la actividad de la Caspasa 3 también evaluó el efecto que tiene el agonista no selectivo WIN55, 212-2 en presencia del antagonista AM251 selectivo para receptor CB₁. Se aplicó la misma metodología empleada cuando solamente se analizó el efecto del agonista, excepto que el antagonista AM251 a la concentración de 30 μ M fue añadido una hora antes de la adición del agonista WIN55, 212-2 también a la concentración de 30 μ M. Se escogieron ambas concentraciones puesto que 30 μ M de WIN55, 212-2 demostró ser la concentración más efectiva para producir la muerte celular de HeLa en un periodo de 24 horas y la concentración de 30 μ M del antagonista AM251 porque era el tratamiento que demostró tener mayor efecto inhibitorio al aumentar el número de células viables, a pesar de que este incremento no sea estadísticamente significativo comparado con el tratamiento a base del agonista solamente.

Este ensayo tuvo por objetivo observar el porcentaje de incremento de la actividad de la caspasa 3 producido por el agonista WIN55, 212-2 en presencia del antagonista selectivo AM251. Estos porcentajes de incremento fueron calculados en base a la medida del número de veces que habían superado al grupo control en 6, 12 y 24 horas.

La intensidad generada por el luminómetro fue expresada en Unidades Relativas de Luz (URL), luego de la misma forma en que se calculó los porcentajes de incremento en la prueba realizada solamente con el agonista (Ecuación 3), se obtuvieron los siguientes resultados presentados en la Tabla N°10.

Tabla N°10. Incremento (%) de la actividad de la Caspasa 3 en presencia del antagonista AM251 selectivo para CB₁ en relación al tiempo

Tiempo	% de Incremento
6h	243%
12h	254%
24h	196%

Fuente: Elaboración Propia

A partir de dichos porcentajes de incremento se realizó la gráfica a continuación:

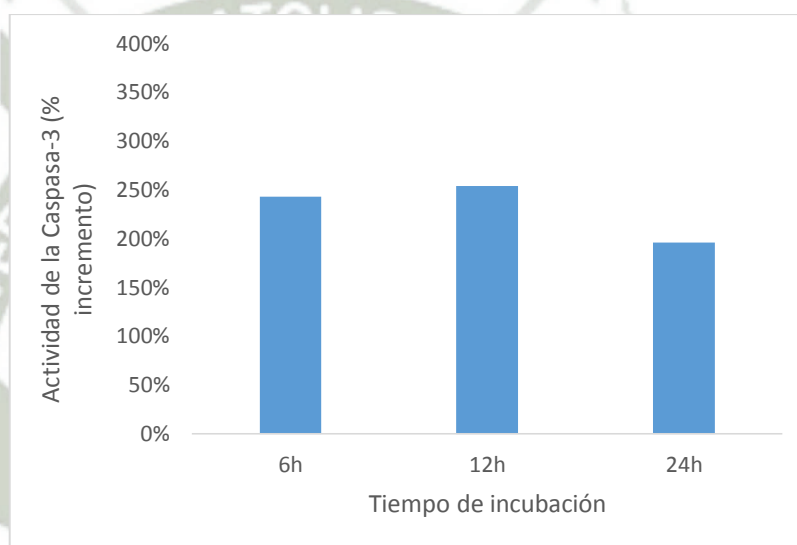


Figura N°24. Incremento (%) de la actividad de la Caspasa 3 en presencia del antagonista AM251 selectivo para CB₁ en 6, 12, 18 y 24 horas.

Fuente: Elaboración propia

Como se ilustra en la Figura N°24, existe una tendencia a incrementar la actividad de la Caspasa efectora 3, con un pico máximo de 254% de incremento comparado con el control en 12 horas. Al igual que en el tratamiento realizado solamente con el agonista WIN55, 212 -2 se produce una tendencia a incrementar hasta las doce horas (máximo incremento) y luego va descendiendo, sin embargo los porcentajes de incremento calculados con el agonista solamente, son mayores que cuando se trató con el agonista y antagonista. Esta diferencia se hace más notoria a las 12

horas, ya que en el primer caso se obtuvo 390% de incremento y en el segundo 254%. Este resultado podría ser explicado por el hecho de que en el ensayo de viabilidad celular realizado con WIN55, 212-2 y AM251, la concentración de 30 μ M de AM251 tiende a incrementar el porcentaje de células viables ligeramente (Figura N°22), por lo tanto es evidente que la actividad de la Caspasa 3 tiende a disminuir. No obstante el incremento observado en Figura N°22, no se diferencia significativamente con el control positivo (tratamiento sólo con WIN55, 212-2).

Si el efecto apoptótico fuera producido a través de la activación del receptor cannabinoide CB₁, no se observaría la activación de la Caspasa efectora 3 cuando se agregó el antagonista selectivo para dicho receptor. Al contrario, con este ensayo se demostró que a pesar de la presencia del antagonista AM251, se observó un incremento en la actividad de la Caspasa efectora 3 comparado con el control, a pesar de que dichos incrementos sean menores comparados con la activación cuando se utilizó solamente el agonista. Con este hecho se puede deducir que el efecto apoptótico es producido primordialmente por el receptor CB₂ u otro receptor como el receptor Vanilloide, tal como se demostró en el ensayo de viabilidad celular.

En la determinación de la actividad de la Caspasa 3, no se realizaron pruebas estadísticas ya que no se contó con las repeticiones necesarias. Este ensayo se realizó únicamente con el fin de observar si el efecto apoptótico era mediado a través de la activación de las caspasas o no. Se puede afirmar que la apoptosis de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa) es producida por el agonista cannabinoide no selectivo WIN55, 212-2 a través de la activación de la caspasa efectora 3, dicho efecto no es mediado por el receptor cannabinoide CB₁, y es muy probable que el efecto se produzca a través de la activación del receptor CB₂ u otro receptor.

Como visión general de este estudio se puede decir que actualmente el tratamiento farmacológico contra el cáncer, en su mayoría, tiene una eficiencia limitada, acompañada de una importante toxicidad que puede desencadenar una serie de efectos secundarios para el paciente. A raíz de esta problemática se ha venido buscando nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad, una de ellas es la apoptosis, que a pesar de desempeñar un papel fundamental en la patogénesis de esta enfermedad, ha surgido como estrategia terapéutica. Se ha vinculado a la apoptosis, en la eliminación de las células potencialmente malignas, hiperplasia y la progresión tumoral.^{35,104}

En el presente estudio, se demostró que WIN-55,212-2, agonista sintético no selectivo de los receptores cannabinoides, induce la muerte celular o apoptosis *in vitro* de la línea celular HeLa, correspondiente a cáncer de cuello uterino. Esa afirmación concuerda con otros estudios realizados anteriormente, en el que se utilizó el endocannabinoide Anandamida.^{98,101} Este efecto citotóxico fue reflejado en la disminución del número de células viables a medida que se aumentó la concentración del cannabinoide, tal como se puede apreciar en la Figura N°21. Se determinó que las concentraciones efectivas para inducir el efecto pro-apoptótico son 10 μM y 30 μM , ya que a dichas concentraciones, la viabilidad celular disminuye hasta un 50% con la primera concentración y en un 67% con la segunda concentración, después de 24 horas aplicado el cannabinoide, en contraste con el endocannabinoide Anandamida (30 μM) usado en estudios previos, en el que se logró efectos parecidos en 72 y 120 horas de haber aplicado dicho tratamiento.

El efecto pro-apoptótico del WIN-55,212-2 se evidenció con la activación de las Caspasa efectora 3 (Figura N°22). Puede apreciarse que la concentración de las mismas aumenta conforme avanza el tiempo de incubación hasta las 12 horas, donde se obtiene el máximo incremento (390%), transcurrido ese tiempo, la concentración de Caspasas empezó a descender.

Se demostró que la línea celular en estudio expresa ambos tipos de receptores cannabinoides: CB₁ y CB₂, dicho resultado fue evidenciado por la aparición de las bandas mostradas en las Figuras N°19 y 20 que fueron realizadas por medio del ensayo Western Blot. A pesar de expresar ambos receptores, se demostró que con la adición del antagonista AM251, selectivo para el receptor CB₁, no ocurrieron cambios significativos en el efecto apoptótico inducido por el WIN-55,212-2, según el ensayo de viabilidad celular que se aprecia en la Figura N°22. Por lo tanto se puede decir que el efecto apoptótico inducido por el cannabinoide empleado, no se ejerce a través de la unión con el receptor CB₁.

Tomando como referencia estudios anteriores,^{91,94} que indican al receptor CB₂, como principal responsable del efecto pro-apoptótico de los cannabinoides en células cancerígenas, se podría deducir que dicho efecto es mediado por el receptor cannabinoide CB₂. Esta afirmación es clínicamente relevante, ya que la activación selectiva del receptor CB₂ no está vinculada con los efectos psicoactivos de la marihuana, contrariamente a los efectos provocados tras la activación del receptor CB₁.

Otros estudios evidencian que el endocannabinoide anandamida y otros cannabinoides, inducen la muerte celular a través de la unión de otro receptor llamado “Receptor Vanilloide” (TRPV1).^{98,101}

Sin embargo el mecanismo por el cual los cannabinoides ejercen su efecto apoptótico continua en estudio, dado el profundo interés que tienen como futuros tratamientos anticancerígenos debido a que existe una fuerte evidencia que los cannabinoides tanto endógenos como exógenos, pueden actuar selectivamente sobre células cancerígenas y por lo tanto su acción sobre las células sanas es mínima al ser menos sensibles a la acción de dichos compuestos.^{91,105} En un estudio realizado con THC se comprobó la apoptosis sobre células de glioblastoma, mientras que en los astrocitos se observó una acción protectora contra el estrés oxidativo.¹⁰⁶



CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

CONCLUSIONES

1. El cannabinoide WIN-55,212-2 induce la apoptosis de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa).
2. La línea celular de Cáncer de Cuello Uterino (HeLa) expresa ambos receptores cannabinoides (CB₁ y CB₂).
3. La concentración más efectiva de WIN-55,212-2 para lograr el efecto apoptótico era la de 30 μ M, ya que con ella la viabilidad de las células de cáncer de cuello uterino disminuye en un 67% en 24 horas.
4. Se comprobó que el efecto apoptótico del WIN-55, 212,2 es producido vía la activación de las Caspasas Efectoras.
5. El efecto apoptótico no es inducido a través de la activación del receptor cannabinoide CB₁.

SUGERENCIAS

1. Se propone identificar cuantitativamente la presencia de los receptores cannabinoides CB_1 y CB_2 , así como la del receptor Vanilloide en la línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa).
2. Se sugiere evaluar la viabilidad celular en presencia de un agonista no selectivo de los receptores cannabinoides, como el WIN55, 212,2 y un antagonista selectivo para el receptor CB_2 y el receptor Vanilloide.
3. Se plantea realizar el mismo tratamiento con WIN55, 212,2 en células de cuello uterino normales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. *The lancet oncology*. 2012;13(8):790-801.
2. Poquioma E. Epidemiología del Cáncer en el Perú y en el mundo [Internet]. INEN. 2013 [citado 30 de abril de 2016]. p. 34. Disponible en: http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014_Epidemiologia_Dr_Poquioma.pdf
3. Metropolitana L, Metropolitana L. Programa de prevención y Control del Cáncer [Internet]. Perú: Enfermedades no Transmisibles y Transmisibles. 2013 [citado 30 de abril de 2016]. p. 36-43. Disponible en: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1152/cap02.pdf
4. Meza-junco J, Montaña-loza A, Aguayo-gonzález Á. Bases moleculares del cáncer. 2006;58(1):56-70.
5. Monzón OG, Padilla EM, Tobar LT, Gutiérrez LD, Rubi C. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER. *Editorial-Editorials*. 2011;20(4):210.
6. Román TMD, García MEF, Prado M del CA. Factores etiopatogénicos y moleculares en la génesis del cáncer. *Rev Cubana Oncol*. 1998;14(1):42-50.
7. Weinstein IB. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment—twenty-seventh GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Research*. 1988;48(15):4135-43.
8. Darzynkiewicz Z, Smolewski P, Bedner E. Use of flow and laser scanning cytometry to study mechanisms regulating cell cycle and controlling cell death. *Clinics in laboratory medicine*. 2001;21(4):857-73.
9. Celada A. Factores de transcripción y control de la expresión génica. *Investigación y ciencia*. 1991;(179):42-51.
10. Nasmyth K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*. 1996;274(5293):1643-5.
11. Prober DA, Edgar BA. Growth regulation by oncogenes—new insights from model organisms. *Current opinion in genetics & development*.

- 2001;11(1):19-26.
12. Zink D, Mayr C, Janz C, Wiesmueller L. Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene*. 2002;21(31):4788-800.
 13. Lewin B. *Oncogenes and cancer*. GENES VII São Paulo: Artmed. 2000;837-73.
 14. Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB. *The molecular basis of cancer*. Elsevier Health Sciences; 2014.
 15. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 1999;55(1):64-75.
 16. Xia H, Qi H, Li Y, Pei J, Barton J, Blackstad M, et al. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(8):1233-41.
 17. Hernández M, Menéndez MH. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol*. 2001;17(1):65-71.
 18. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-37.
 19. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*. 1980;68:251-306.
 20. Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2001;15(5):931-56.
 21. Ahmed S, Alpi A, Hengartner MO, Gartner A. *C. elegans* RAD-5/CLK-2 defines a new DNA damage checkpoint protein. *Current Biology*. 2001;11(24):1934-44.
 22. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*. 2008;18(1):134-47.
 23. Cheung I, Schertzer M, Rose A, Lansdorf PM. High incidence of rapid telomere loss in telomerase-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic acids research*. 2006;34(1):96-103.
 24. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):9-18.
 25. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. En: *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2009. p. 329-37.
 26. Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(26):2814-23.
 27. Dávila Gómez HL, García Valdés A, Álvarez Castillo F. Cáncer de cuello

- uterino. Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología. 2010;36(4):603-12.
28. Collado RC, Montosa JX, Vizcaíno MÁC. Virus del papiloma humano y cáncer de cuello de útero. Ed. Médica Panamericana; 2007. 179 p.
 29. Clara S, Clara V, Uterino CDEC. Cáncer de cuello uterino. Medicentro. 2007;11(2):11-2.
 30. Menéndez AA. Virus del papiloma humano . Aspectos virológicos e inmunitarios. Semergen. 2007;33(2):3-8.
 31. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. Journal of virology. 2004;78(21):11451-60.
 32. Squiquera L. Virus de papiloma humano: Revisión e indicaciones terapéuticas. Rev argent dermatol. 2006;87(1):28-41.
 33. Society AC. Prevención y detección temprana del cáncer de cuello uterino. American Cancer Society. 2014;1:1-29.
 34. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000;407(6805):770-6.
 35. Wong RSY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of experimental & clinical cancer research : CR [Internet]. 2011;30(1):87. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3197541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 36. Kasibhatla S, Tseng B. Minireview Why Target Apoptosis in Cancer Treatment? Molecular cancer therapeutics. 2003;2(June):573-80.
 37. Machado JP, Concepción AEL. Apoptosis, mecanismo de acción. Apoptosis. 2012;1:1-16.
 38. Prado M del CA, Fernández LL, Román TD, García MEF. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. Revista Cubana Oncología. 1997;13(2):126-34.
 39. Pérez C, Pérez IC. Apoptosis: una muerte silenciosa. CENIC Ciencias Biológicas. 2006;37(1):13-7.
 40. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. The American journal of pathology. 1995;146(1):3.
 41. Elinos-Baez C, Maldonado V, Melendez J. Caspasas: Moléculas inductoras de apoptosis. Gaceta Médica de México. 2003;139(5):493-9.
 42. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. New England Journal of Medicine. 2003;348(14):1365-75.
 43. Fibao. Caspasas [Internet]. Medicina Molecular. 2008 [citado 10 de junio

- de 2016]. Disponible en: <http://medmol.es/glosario/80/>
44. Silvestris F, Ribatti D, Nico B, Silvestris N, Romito A, Dammacco F. [Apoptosis or programmed cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms]. *Annali italiani di medicina interna: organo ufficiale della Societa italiana di medicina interna*. 1994;10(1):7-13.
 45. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annual review of immunology*. 1995;13(1):513-43.
 46. Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in cell biology*. 1994;4(11):394-9.
 47. Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell*. 1993;74(4):609-19.
 48. Jordán J. Apoptosis : muerte celular programada. *Bioquímica*. 2003;22(6):100-6.
 49. Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International journal of cell biology*. 2010;2010.
 50. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(3):178-94.
 51. Amar M Ben. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;105(1):1-25.
 52. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life sciences*. 2005;78(5):539-48.
 53. Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other Cannabis constituents. En: *Marijuana and the Cannabinoids*. Springer; 2007. p. 17-49.
 54. Durán M, Capellà D. Uso terapéutico de los cannabinoides. *Eguzkilore*. 2005;19:139-49.
 55. Rodriguez U, Carrillo E, Soto E. Cannabinoides : Neurobiología y usos médicos. *Elementos*. 2005;60:3-9.
 56. Onaivi ES, Sugiura T, Di Marzo V. *Endocannabinoids: the brain and body's marijuana and beyond*. CRC Press; 2005.
 57. Mustata CM, Torrens MAT, Farre M, Skutle A, Flesland L, Furia L. Spice drugs : los cannabinoides como nuevas drogas de diseño. *Adicciones*. 2009;21(3):181-6.
 58. Grotenhermen F. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*. 2006;1(1):10-4.
 59. Ujváry I, Grotenhermen F. ubiquitous yet underresearched cannabinoid . A

- re- view of the literature. *Cannabinoids*. 2014;9(1):1-8.
60. Pertwee RG. Pharmacological Actions of Cannabinoids. En: Pertwee RG, editor. *Cannabinoids* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 1-51. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/3-540-26573-2_1
 61. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003;4(11):873-84.
 62. Ottani A, Giuliani D. HU 210: a potent tool for investigations of the cannabinoid system. *CNS drug reviews*. 2001;7(2):131-45.
 63. Compton DR, Johnson MR, Melvin LS, Martin BR. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992;260(1):201-9.
 64. Aung MM, Griffin G, Huffman JW, Wu M-J, Keel C, Yang B, et al. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB 1 and CB 2 receptor binding. *Drug and alcohol dependence*. 2000;60(2):133-40.
 65. Wiley JL, Compton DR, Dai D, Lainton JAH, Phillips M, Huffman JW, et al. Structure-activity relationships of indole-and pyrrole-derived cannabinoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998;285(3):995-1004.
 66. Escalante D. Síntesis y caracterización de potenciales agonistas del receptor cannabinoide CB2. [Arequipa]: Universidad Católica de Santa María; 2013.
 67. Grotenhermen F. Review of therapeutic effects. *Cannabis and cannabinoids Pharmacology, toxicology, and therapeutic potential*. 2002;123-42.
 68. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*. 2002;54(2):161-202.
 69. McAllister SD, Glass M. CB 1 and CB 2 receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2002;66(2):161-71.
 70. Atance JAR, Ruiz JF. Sistema cannabinoide endógeno: ligandos y receptores acoplados a mecanismos de transducción de señales. *Adicciones*. 2000;12(5):59-81.
 71. Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*. 2002;66(2):173-92.
 72. Richardson D, Pearson RG, Kurian N, Latif ML, Garle MJ, Barrett DA,

- et al. Research article Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. 2008;10(2):1-14.
73. Maccarrone M, Finazzi-Agró A. The endocannabinoid system , anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Nature*. 2003;10:946-55.
 74. Melck D, Rueda D, Galve-Roperh I, De Petrocellis L, Guzmán M, Di Marzo V. Involvement of the cAMP/protein kinase A pathway and of mitogen-activated protein kinase in the anti-proliferative effects of anandamide in human breast cancer cells. *FEBS letters*. 1999;463(3):235-40.
 75. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics*. 2003;42(4):327-60.
 76. Clementi F, Fumagalli G. *General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action*. John Wiley & Sons; 2015.
 77. Tamosiunas G, Pagano E, Artagaveytia P. Una introducción al perfil farmacológico y terapéutico de la marihuana. *Archivos de Medicina Interna*. 2013;35(3):113-6.
 78. Perez-Reyes M. The psychologic and physiologic effects of active cannabinoids. En: *Marihuana and medicine*. Springer; 1999. p. 245-52.
 79. Dewey WL. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacological reviews*. 1986;38(2):151-78.
 80. De la Torre AH, Expósito C, Armendáriz CR, Pozuelo MR. Nuevas perspectivas terapéuticas de los compuestos cannabinólicos. *Revista de toxicología*. 2002;19(2):89-92.
 81. Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, de Fonseca FR. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000;21(6):218-24.
 82. Tocris. Certificate of Analysis WIN55,212-2 [Internet]. Vol. 86, TOCRIS. 2016 [citado 19 de junio de 2016]. p. 0-1. Disponible en: <https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1995#.V41tNzUXeDY>
 83. TOCRIS. Certificate of Analysis: AM251 [Internet]. Tocris. 2016 [citado 19 de junio de 2016]. p. 0-1. Disponible en: <https://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=2200#.V41yHjUXeDY>
 84. Veiga A. Western Blot: Introducción y Optimización [Internet]. ABCAM. 2013 [citado 25 de junio de 2016]. p. 49. Disponible en: docs.abcam.com/pdf/events/spanish-wb-webinar.pdf
 85. Brescia P, Banks P, Ph D, Instruments B. In-situ Micro-Volume Bicinchoninic Acid Protein Assay [Internet]. 2010 [citado 21 de agosto de 2016].

- 2016]. p. 3-6. Disponible en: <http://www.biotek.pt/pt/resources/articles/in-situ-micro-volume-bicinchoninic-acid-protein-assay.html>
86. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*. 2002;47(4):236-42.
 87. Escobar L, Rivera A, Aristizabal F. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS DE RESAZURINA Y MTT EN ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN LINEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS. *VITAE*. 2010;17(1):67-74.
 88. Promega. Caspase-Glo 3/7 Assay Technical Bulletin [Internet]. Promega Corporation. 2015 [citado 20 de junio de 2016]. p. 20. Disponible en: https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&q=Caspase-Glo@+3/7+Assay+Instructions+for+Use+of+Products+G8090,+G8091,+G8092+and+G8093+Revised&spell=1&sa=X&ved=0ahUKEwj2j6K1yKHOAhXH2R4KHdFXAHgQBQgbKAA&biw=1252&bih=604&bav=on,or.r_cp.&bvm=bv.128617741
 89. Galgglje S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrikre D, Camyon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Biochemistry*. 1995;61:54-61.
 90. Buckley N, Hansson S, Harta G. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience*. 1998;82(4):1131-49.
 91. Mayorga F, Cardenas R. LOS ENDOCANABINOIDES : UNA OPCIÓN TERAPÉUTICA. *VITAE*. 2009;16:259-67.
 92. Velasco G, Galve-Roperh I, S??nchez C, Bl??zquez C, Guzm??n M. Hypothesis: Cannabinoid therapy for the treatment of gliomas? *Neuropharmacology*. 2004;47(3):315-23.
 93. Carracedo A, Lorente M, Egia A, Bl??zquez C, Garc??a S, Giroux V, et al. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*. 2006;9(4):301-12.
 94. Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzman M, Velasco G, et al. Cannabinoids Induce Apoptosis of Pancreatic Tumor Cells via Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes. *Cancer Research*. 2006;66(13):6748-56.
 95. De Petrocellis L, Melck D, Palmisano A, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(14):8375-80.
 96. Sarnataro D, Pisanti S, Santoro A, Gazerro P, Malfitano AM, Laezza C,

- et al. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (SR141716) inhibits human breast cancer cell proliferation through a lipid raft-mediated mechanism. *Molecular pharmacology*. 2006;70(4):1298-306.
97. Qamri Z, Preet A, Nasser MW, Bass CE, Leone G, Barsky SH, et al. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(11):3117-29.
98. Contassot E, Tenan M, Schnüriger V, Pelte MF, Dietrich PY. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecologic Oncology*. 2004;93(1):182-8.
99. Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer research*. 2008;68(2):339-42.
100. Tomiyama K, Funada M. Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in « Spice » products : The role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicology Letters* [Internet]. 2011;207(1):12-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.08.021>
101. Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agrò A. Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(41):31938-45.
102. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(10):2665-72.
103. McCarthy NJ, Evan GI. 15 Methods for Detecting and Quantifying Apoptosis. *Current topics in developmental biology*. 1997;36:259-78.
104. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 1972;26(4):239.
105. Flygare J, Sander B. The endocannabinoid system in cancer—Potential therapeutic target? En: *Seminars in cancer biology*. Elsevier; 2008. p. 176-89.
106. Carracedo A, Geelen MJH, María D, Hanada K, Guzmán M, Velasco G. Ceramide sensitizes astrocytes to oxidative stress: protective role of cannabinoids. *Biochemical Journal*. 2004;380(2):435-40.

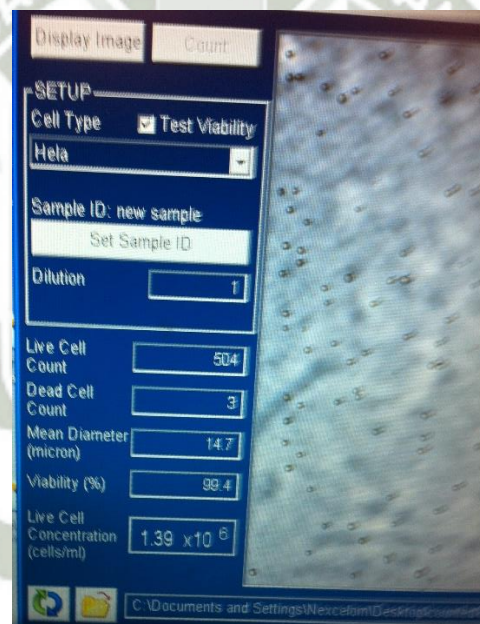
ANEXO I

Cálculo para determinar el volumen de suspensión celular para obtener 30 000 células por pocillo aproximadamente.

Ejemplo:

Para determinar la influencia del cannabinoide WIN55, 212,2 sobre la viabilidad celular de las células de cáncer de cuello uterino (HeLa) se utilizó 170 μL de suspensión celular por pocillo que tuviera 30 000 células aproximadamente.

Previamente al cálculo se colocaron 20 μL de suspensión celular en contador electrónico de células Nexcelom. En la que se obtenía un resultado como el de la siguiente figura:



En la que se observa que existe una cantidad de 1.39×10^6 células/mL.

$$30\,000 \frac{\text{células}}{\text{pocillo}} \times \frac{1\text{ mL}}{1.39 \times 10^6 \text{ células}} = 0.0216 \frac{\text{mL}}{\text{pocillo}} = 21.6 \frac{\mu\text{L}}{\text{pocillo}}$$

Se utilizaron 35 pocillos:

$$21.6 \frac{\mu\text{L}}{\text{pocillo}} = 35 \text{ pocillos} = 756 \mu\text{L} = 0.75 \text{ mL de suspensión celular}$$

$$170 \frac{\mu\text{L}}{\text{pocillo}} = 35 \text{ pocillos} = 5950 \mu\text{L} = 5.95 \text{ mL de suspensión celular total}$$

$$5.95 \text{ mL} - 0.75 \text{ mL} = 5.2 \text{ mL de Medio EMEM completo.}$$

Por lo tanto se agregó en un tubo de centrifuga 0.75 mL de suspensión celular y se diluyó con 5.2 mL de medio EMEM completo. Se resuspendió y posteriormente se tomó 170 μL de la nueva suspensión celular para cada pocillo.



ANEXO II

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO MTS CON EL AGONISTA WIN55, 212,2 SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO (HeLa)

	Grupo Control	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM
Repetición 1	1.807	1.651	1.646	1.514	1.328	0.943	0.761
	1.719	1.631	1.789	1.499	1.758	1.106	0.753
	1.662	1.627	1.401	1.491	1.547	0.995	0.748
	1.646	1.623	1.46	1.483	1.469	0.989	0.739
Blanco	0.229	0.229	0.236	0.251	0.259	0.223	0.242
Promedio	1.4795	1.404	1.338	1.24575	1.2665	0.78525	0.50825
Desviación Estándar	0.0728	0.0124	0.1773	0.0132	0.1796	0.0692	0.0092
% Células Viables	100%	95%	90%	84%	86%	53%	34%

	Grupo Control	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM
Repetición 2	1.419	1.434	1.381	1.305	1.309	0.899	0.602
	1.338	1.324	1.398	1.319	1.245	0.778	0.652
	1.41	1.421	1.351	1.293	1.237	0.887	0.639
	1.532	1.385	1.331	1.278	1.238	0.852	0.618
Blanco	0.1975	0.203	0.2	0.1995	0.1985	0.2005	0.2055
Promedio	1.2273	1.188	1.1653	1.0993	1.0588	0.6535	0.4223
Desviación Estándar	0.0802	0.0492	0.0299	0.0174	0.0347	0.0544	0.0221
% Células Viables	100%	97%	95%	90%	86%	53%	34%

	Grupo Control	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM
Repetición 3	1.306	1.300	1.391	1.239	1.161	0.867	0.574
	1.49	1.327	1.251	1.214	1.189	0.724	0.569
	1.332	1.325	1.249	1.205	1.175	0.853	0.570
	1.359	1.314	1.347	1.240	1.169	0.826	0.563
Blanco	0.194	0.1995	0.192	0.199	0.1985	0.197	0.197
Promedio - Blanco	1.178	1.117	1.1175	1.0255	0.975	0.6205	0.372
Desviación Estándar	0.0817	0.0124	0.0710	0.0177	0.0118	0.0646	0.0045
% Células Viables	100%	95%	95%	87%	83%	53%	32%

ANEXO III

ABSORBANCIAS OBTENIDAS A PARTIR DEL ENSAYO MTS CON EL AGONISTA WIN55, 212,2 EN PRESENCIA DE UN ANTAGONISTA SELECTIVO DE LOS RECEPTORES CB₁ SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE CUELLO UTERINO (HeLa)

	Control (-)	Control (+)	0.1 μM	10 μM	30 μM
Repetición 1	1.463	0.735	0.718	0.794	0.874
	1.478	0.726	0.667	0.767	0.891
	1.325	0.689	0.62	0.886	0.863
	1.422	0.717	0.652	0.868	0.845
Blanco	0.195	0.201	0.198	0.214	0.256
Promedio	1.227	0.51575	0.46625	0.61475	0.61225
Desviación Estándar	0.0689	0.0199	0.0408	0.0573	0.0193
% Células Viables	100%	42%	38%	50%	50%

	Control (-)	Control (+)	0.1 μM	10 μM	30 μM
Repetición 2	1.628	0.742	0.737	0.899	0.939
	1.632	0.735	0.772	0.872	0.956
	1.598	0.764	0.725	0.951	0.938
	1.611	0.735	0.757	0.933	0.943
Blanco	0.211	0.201	0.194	0.198	0.197
Promedio	1.40625	0.543	0.55375	0.71575	0.747
Desviación Estándar	0.0157	0.0137	0.0209	0.0352	0.0083
% Células Viables	100%	39%	39%	51%	53%

	Control (-)	Control (+)	0.1	10	30
Repetición 3	1.404	0.686	0.659	0.735	0.851
	1.419	0.655	0.648	0.758	0.832
	1.377	0.672	0.591	0.827	0.804
	1.363	0.669	0.637	0.809	0.786
Blanco	0.205	0.202	0.198	0.202	0.198
Promedio	1.18575	0.4685	0.43575	0.58025	0.62025
Desviación Estandar	0.0254	0.0127	0.0299	0.0430	0.0289
% Células Viables	100%	40%	37%	49%	52%