

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EFECTO ANTIPROLIFERATIVO EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO
U87 TRATADAS CON ENDOCANNABINOIDES E INHIBIDORES DE SU
DEGRADACIÓN”**

Tesis presentada por los Bachilleres:

**JUÁREZ VALDEZ, ALEJANDRA YAQUELINE
PAREDES QUIROZ, JOSÉ MAURICIO**

Para optar el Título Profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: José A. Villanueva Salas, PhD.

Arequipa- Perú

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por acompañarnos cada día, a nuestros padres y hermanos que, con su apoyo y amor, estuvieron con nosotros en el camino que nos llevó a conseguir este objetivo.

Agradecemos también al Dr. José Villanueva Salas y a al Dr. Alejandro Pino Figueroa por brindarnos su conocimiento y consejos, así como su paciencia para guiarnos en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	X
HIPÓTESIS.....	XII
OBJETIVOS	XIII
CAPÍTULO I	XIII
MARCO TEÓRICO.....	1
1. Cáncer	1
1.1 Tipos de cáncer según su origen tisular o celular	2
1.2 Diseminación tumoral	3
1.3 Glioblastoma multiforme (Células U87).....	5
2. Muerte celular	7
2.1 Necrosis.....	7
2.2 Apoptosis	8
2.3 Autofagia	9
2.4 Parthanatos	9
2.5 Enzimas relacionadas a la muerte celular	10
3. Sistema Endocannabinoide	16
3.1 Receptores cannabinoides.....	18
.....	18
3.2 Ligandos endocannabinoides.....	22
4. Inhibidores de enzimas de degradación de endocannabinoides	26
4.1 Inhibido de MAGL, JZL-184	26
4.2 Inhibidor de FAAH, OL-135	27
4.3 Inhibidor dual JZL-195	28
5. Cultivos celulares	29

5.1	Línea celular.....	30
5.2	Cultivo celular en mono capa	31
5.3	Medios de cultivo	31
6.	Ensayo de viabilidad	39
7.	Western Blot.....	40
7.1	Preparación de la muestras	41
7.2	Electroforesis.....	42
7.3	Transferencia a la membrana o blotting	42
7.4	Lavado y bloqueo.....	43
7.5	Adición de anticuerpos.....	43
7.6	Detección.....	43
CAPÍTULO II.....		45
MATERIALES Y MÉTODOS.....		45
1.	Materiales	45
1.1	Material biológico	45
<input type="checkbox"/>	Células de Glioblastoma humano U87.....	45
<input type="checkbox"/>	Anticuerpo anti PARP-1. Abcam®	45
<input type="checkbox"/>	Anticuerpo anti BCL-2/Bax Abccam®	45
<input type="checkbox"/>	Anticuerpo secundario burro/anticabra (Thermo Fisher Scientific®).....	45
1.2	Instrumentos	45
1.3	Materiales y reactivos.....	47
1.4	Lugar de investigación	48
2.	Metodología	48
2.1	Cultivo celular.....	48
2.2	Tratamiento con aea y 2-ag.....	49
2.3	Tratamiento CON JZL-184, OL-135 y JZL-195	53
2.4	Tratamiento sinergismo AEA y 2-AG	59
2.5	Determinación de caspasas	61
2.6	Lisis celular	62
2.7	Cuantificación de proteínas por bca	63

2.8	Western blot	64
2.9	Análisis estadístico de resultados	66
2.10	Análisis de sinergismo en combinación de drogas	66
CAPÍTULO III		67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		67
1.	Cultivo de células	67
2.	Elección de cantidad óptima celular	70
3.	Tratamiento con Anandamida	73
4.	Tratamiento con 2- Araquinodilglicerol	79
5.	Tratamiento con JZL-184	85
6.	Tratamiento con OL-135	90
7.	Tratamiento con Anandamida y 2- Araquinodilglicerol	95
8.	Ensayo de sinergismo entre AEA y 2-Araquidonilglicerol.	101
9.	JLZ-195, Anandamida y 2-AG	104
10.	Ensayo de inmunoblotting Western blot	111
11.	Ensayo de luminiscencia de caspasas	115
CAPÍTULO IV		118
CONCLUSIONES		118
SUGERENCIAS		120
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1: Preparación de soluciones de trabajo.....	50
Fuente: Elaboración propia.....	50
Tabla II.2 Esquema de tratamiento para células U87 con AEA.	51
Fuente: Elaboración propia.....	51
Tabla II.3: Preparación de soluciones de trabajo.....	52
Fuente: Elaboración propia.....	52
Tabla II.4 Esquema de tratamiento para células U87.....	52
Fuente: Elaboración propia.....	52
Tabla II.5: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).	54
Tabla II.6 Esquema de tratamiento para células U87 con JZL-184 y 2-AG.....	54
Tabla II.7: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).	56
Tabla II.8 Esquema de tratamiento para células U87 con OL-135 y AEA.	56
Tabla II.9: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).	57
Tabla II.11 Esquema de tratamiento para células U87 con JZL-195, AEA y 2-AG.	58
Tabla II.12: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).....	60
Tabla II.13 Esquema de trabajo para medición de actividad de caspasas.....	61
Tabla III.1. Promedio de absorbancia.....	71
Tabla III.2. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS	75
Tabla III.3. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS	80
Tabla III.4. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas con JZL-184 y 2- Araquinodilglicerol	87
Tabla III.5. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas con OL-135 y Anandamida	92
Tabla III.6. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas Anandamida y 2- Araquinodilglicerol.....	97

Tabla III.7. Tabla de comparación de índice de combinación	101
Tabla III.8. Índices de combinación hallados mediante el programa Compusyn .	102
Tabla III.9. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas Anandamida, 2- Araquinodilglicerol y JZL-195 .	106
Tabla III.10. Densitometría de las bandas obtenidas por el ensayo de westernblot para la proteína PARP1	112
Tabla III.11. Densitometría de las bandas obtenidas por el ensayo de westernblot para la proteína BLC-2	112
Tabla III.12 Luminiscencia producida por luciferasa que mide la actividad de las caspasas 3 y 7	116
Tabla III.13 Luminiscencia producida por luciferasa que mide la actividad de las caspasas 8	116



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Diseminación metastásica de células tumorales de mama.....	4
Figura I.2: Proceso de autofagia y necrosis.....	8
Figura I.3: Diferencias entre Parthanatos y los distintos tipos de muerte celular. .	10
Figura I.4 Descripción de las caspasas, sitio de acción y nomenclatura.....	15
Figura I.5: Estructura de los receptores cannabinoides CB1 y CB2.....	18
Figura I.6: Señalización de los receptores cannabinoides.	21
Figura I.7: Síntesis, liberación y recaptación de anandamida.	23
Figura I.8: Rutas metabólicas de la anandamida.	25
Figura I.9: Bioquímica del sistema endocannabinoide.	26
Figura I.10. Estructura química de JZL-184.....	27
Figura I.11. Estructura química de OL-135.....	28
Figura I.12. Estructura de JZL-195.....	29
Figura I.13 Etapas que comprenden la técnica de Western blot.	44
Fuente: Mahmood T , 2012 (52)	44
Figura III.1. Células U87 vistas en microscopio invertido.....	69
Figura III.2. Curva de dispersión número de células.....	72
Figura III.3. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida.....	76
Figura III.4. ANOVA generado por el programa GraphPad del tratamiento de células U87 con Anandamida	76
Figura III.5. Test de Dunnett generado por el programa GraphPad del tratamiento de células U87 con Anandamida	77
Figura III.7. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquidilglicerol	81
Fuente: Elaboración propia.....	81
Figura III.8. Tabla de ANOVA generada por el programa GraphPad, tratamiento de células U87 con 2- Araquidilglicerol.....	82
Figura III.9. Test de Dunnett generado por el programa GraphPad, tratamiento de células U87 con 2- Araquidilglicerol	82

Figura III.11. Estadística generada para hallar el IC50 del tratamiento por 24 con 2- Araquinodilglicerol en células U87.	84
Figura III.12. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquinodilglicerol y JZL-184	88
Figura III.13. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con 2- Araquinodilglicerol y la combinación de JZL-184 y 2-AG	88
Figura III.14. Comparación entre células tratadas sólo con 2-AG y células tratadas con la combinación de JZL-184 y 2-AG	88
Figura III.15. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquinodilglicerol y JZL-184	89
Figura III.16 Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con JZL-184 y la combinación de JZL-184 y 2-AG	90
Figura III.17. Comparación entre células tratadas sólo con JZL-184 y células tratadas con la combinación de JZL-184 y 2-AG, mediante el test de Dunnett.....	90
Figura III.18. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y OL-135	93
Figura III.19. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con Anandamida y la combinación de OL-135 y AEA	93
Figura III.20. Comparación entre células tratadas sólo con AEA y células tratadas con la combinación de OL-135 y AEA, mediante el test de Dunnett	93
Figura III.21. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con AEA y OL-135 .	94
Figura III.22. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con OL-135 y la combinación de OL-135 y AEA	94
Figura III.23. Comparación entre células tratadas sólo con OL-135 y células tratadas con la combinación de inhibidor y AEA, mediante el test de Dunnett	95
Figura III.24. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y 2- Araquinodilglicerol.....	98
Figura III.26. Tabla de comparación entre vehículo, 2- Araquinodilglicerol 30 µM y Anandamida 10 µM con el tratamiento generado mediante el test de Dunnett	98

Figura III.27. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y 2-Araquidilglicerol.....	99
Figura III.28. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con 2-AG y la combinación de 2-AG y AEA	100
Figura III.29. Tabla de comparación entre vehículo, 2- Araquidilglicerol 30 μM y Anandamida 10 μM.....	100
Figura III.30. Plot generado por el programa Compusyn,.....	102
Figura III.31. Isoblograma obtenido, donde A representa la fracción D2(Dx2) y B a la fracción D1(Dx1) del teorema de Índice de combinación.....	103
Figura III.32. Isoblograma normalizado.....	104
Figura III.33. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con la combinación de endocannabinoides y JZL-195.....	107
Figura III.35. Comparación entre células tratadas sólo con AEA y células tratadas con la combinación, mediante el test de Dunnett.....	108
Figura III.36. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con la combinación de endocannabinoides y JZL-195.....	108
Figura III.37. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con 2-AG.....	109
Figura III.38. Comparación entre células tratadas sólo con 2-AG y células tratadas con la combinación, mediante el test de Dunnett.....	109
Figura III.39. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con la combinación de endocannabinoides y JZL-195.....	110
Figura III.40. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con JZL-195.....	110
Figura III.41. Comparación entre células tratadas sólo con JZL-195 y células tratadas con la combinación, mediante el test de Dunnett.....	111
Figura III.42. En la parte superior las bandas después de revelar el ensayo de westernblot para PARP1 en células U87.....	112
Figura III.43. Porcentaje de las bandas de densitometría del ensayo de westernblot para la proteína PARP1.....	113
Figura III.44. Porcentaje de las bandas de densitometría del ensayo de westernblot para la proteína BLC-2.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA: Anandamida
2-AG 2-Araquinodilglicerol
WB: Westernblot
SBF: Suero bovino fetal
PBS: Buffer fostato salino
MEM: Medio de culvito Minimum Essential Media
FSM: Medio de cultivo sin suero bovino fetal
CB1: Receptor CB1 del sistema cannabinoide
CB2: Receptor CB2 del sistema cannabinoide
EMT: Transición epitelial-mesenquimal
GBM: Glioblastoma multiforme
HSP: Heat Stock Proteins
TOR: Target de rapamicina
NAD: Nictamida adenina dinucleótido
PARP-1: ADP ribosa polimerasa-1
ICE: Interleucina-1 β de cisteína proteasa de mamífero
NE: Noladín éter
VIR: Virodamida
NADA: N-araquidonil-dopamina
AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico
GAB: Ácido γ -aminobutírico
AC: Aadenilato ciclasa
PKA: Proteína quinasa A.
MAPKs: Proteínas quinazas activadas por mitógenos
PI3K: Fosfatidilinositol quinasa

Δ 9-THC: Tetrahidrocannabinol

NE: Noladín éter

VIR: Virodamida

NADA: N-araquidonil-dopamina

TRPV1: Vanilloide

NAPE: Araquidonil-fosfatidiletanolamina

AA: ácido araquidónico

FAAH: Amidohidrolasa de Ácidos Grasos

LOX: Lipooxigenasas

COX₂: Ciclooxygenasas 2

DAG: Diacilglicerol

MAGL: Monoacilglicerol lipasa





RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo y según el Ministerio de Salud se ha posicionado en el primer lugar de las causas de muerte en el Perú.

Cada año, el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas realiza aproximadamente 550 intervenciones quirúrgicas para tratar tumores a nivel cerebral siendo el Glioblastoma multiforme la neoplasia más común. Frente a este panorama se ha vuelto necesario buscar nuevas moléculas que tengan la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas.

El presente estudio ha sido realizado en la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences – Boston, Facultad de Farmacia, en el área de Farmacología molecular.

En esta investigación, se trabajó con una línea celular de Glioblastoma Humano U87, se hizo uso de dos endocannabinoides: Anandamida y 2-araquidonil glicerol; además de inhibidores de su degradación para evaluar sus efecto sobre las células mencionadas, por medio de la

determinación del porcentaje de viabilidad celular, el cual se obtuvo, usando el método colorimétrico MTS.

Se evaluó también, la existencia del efecto sinérgico en el tratamiento con la combinación de ambos cannabinoides endógenos a diferentes concentraciones, a través de una simulación computarizada de combinación de drogas, confirmando la existencia de un sinergismo entre Anandamida y 2-araquidonil glicerol, por medio del análisis de isobogramas.

Finalmente se quiso buscar el tipo de muerte celular que favorecía la disminución de viabilidad de las células U87, para esto, se utilizaron dos técnicas: I) en primer lugar la técnica de inmunoblotting Western blot, en donde fue posible determinar la presencia de PARP-1 y Bcl-2, que indicaba la posible vía de la apoptosis. II) La segunda técnica utilizada fue la medición de caspasas por luminiscencia, ya que la actividad de las caspasas aumenta cuando se desencadenan procesos apoptóticos; en este caso, la actividad de las caspasas se encontraba en niveles normales, lo que sirvió para descartar a la apoptosis, como vía de la muerte celular en este estudio.

Se concluye que los endocannabinoides, Anandamida y 2-araquidonilglicerol, ejercen un efecto antiproliferativo sobre las células de glioblastoma U87, lo que sugiere como un posible tratamiento contra este cáncer; además, es posible ver que el uso de inhibidores de las enzimas que degradan a los cannabinoides endógenos, permiten ampliar el efecto que ya tienen sobre la viabilidad de esta línea celular.

Palabras claves: Anandamida, 2-Araquidonilglicerol, sistema endocannabinoide.



ABSTRACT

Cancer is one of the most common diseases in the world; according to the Ministry of Health, has positioned itself as the leading cause of death in Peru.

The National Institute of Neoplastic Diseases performs 550 surgical interventions to treat brain tumors each year. The Glioblastoma multiforme is the most common neoplasia. So it's necessary to look for new molecules that have the capacity to inhibit the proliferation of cancer cells.

The present study was made at the Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences - Boston, Faculty of Pharmacy, in the of Molecular Pharmacology area.

In this research, we worked with a human Glioblastoma cell line U87, we used two endocannabinoids; Anandamide and 2-arachidonyl glycerol, as well as inhibitors of its degradation, to evaluate its effect on the mentioned cells, by means of the determination of the cellular viability percentage, which was obtained, thanks to the MTS colorimetric method.

The existence of the synergistic effect in the treatment with the combination of both endogenous cannabinoids at different concentrations was also evaluated through a computerized simulation of drug combination, confirming the existence of a synergism between Anandamide and 2-arachidonyl glycerol, by the analysis of isobolograms.

Finally, we wanted to find the type of cell death that favored the reduction of viability of U87 cells. We used two techniques: Western blot immunoblotting technique, where it was possible to determine the presence of PARP-1 and Bcl-2, which indicated the possible pathway of apoptosis.

The second one was the measurement of caspases by luminescence, since the activity of the caspases increases when apoptotic processes are triggered; In this case, the activity of the caspases was at normal levels, which served to rule out apoptosis, as a cell death pathway in this study.

So we can conclude that the endocannabinoids, Anandamide and 2-arachidonylglycerol, exert an antiproliferative effect on the cells of glioblastoma U87, being able to tempt a possible treatment against this cancer, in addition, it is possible to see that the use of inhibitors of the enzymes that degrade the Endogenous cannabinoids, allow to amplify the effect they already have on the viability of this cell line.

Keywords: Anandamide, 2-Arachidonylglycerol, endocannabinoid system.

HIPÓTESIS

Dado que existen estudios que demuestran que los Endocannabinoides poseen un efecto antiproliferativo, es posible que Anandamida y 2- Araquidonilglicerol juntos y en combinación con inhibidores de su degradación, tengan un efecto antiproliferativo en células de glioblastoma U87, además ambos neurotransmisores podrían actuar de manera sinérgica.

OBJETIVOS

1. Determinar si los endocannabinoides ejercen un efecto antiproliferativo en las células U87.
2. Evaluar si existe efecto sinérgico o aditivo entre ambos endocannabinoides.
3. Evaluar si la combinación de endocannabinoides e inhibidores de las enzimas de su degradación, producen un efecto significativo sobre la viabilidad en células U87.
4. Proponer un mecanismo de acción por el cual, se produce la muerte celular.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Cáncer

El cáncer es una de las enfermedades más frecuentes en el mundo; se ha posicionado en el primer lugar de las causas de muerte en el Perú (1).

Cada año, el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, realiza aproximadamente, 550 intervenciones quirúrgicas para tratar tumores a nivel cerebral y registra un promedio de 10 550 casos nuevos de cáncer (2). Frente a este panorama se ha vuelto necesario buscar nuevas moléculas que tengan la capacidad de inhibir la proliferación de células cancerígenas.

El cáncer es originado por la proliferación descontrolada de células en tejidos del organismo, esto se debe a la transformación de células sanas como consecuencia del daño del ADN; las células cancerosas formadas tienen la capacidad de invadir y destruir otros tejidos (3, 4).

Existen muchos factores que pueden desatar un cáncer en el organismo: infecciones por virus, traumas, herencia, etc. Se calcula que el cáncer puede ser hereditario de 5 a 10% de las veces; siendo de los más comunes, el cáncer de mama y colon. Otro factor importante para el desarrollo del cáncer es la exposición a sustancias químicas, como alquitrán, arsénico, que son relacionados a cáncer de pulmón y cáncer a la piel, respectivamente.

Las radiaciones, son catalogadas como uno de los factores más reconocidos en el origen del cáncer, pues produce mutaciones en el ADN, como rupturas de cadenas o

transposiciones cromosómicas, que dañan la célula y desatan la proliferación descontrolada (4).

1.1 Tipos de cáncer según su origen tisular o celular

1.1.1 Carcinoma

Es uno de los cánceres con mayor incidencia; se producen en el tejido epitelial como la piel o que tapiza cavidades y órganos, tejidos glandulares de mama y próstata.

Se divide en dos subtipos; los carcinomas de células escamosas, que se derivan de células epidermoides o no glandulares; y los adenocarcinomas que se originan en células glandulares (3,4).

1.1.2 Leucemias y linfomas

Las leucemias son originadas por células de la médula ósea que se encargan de la producción de células sanguíneas.

Los linfomas se originan en el ganglio linfático, producen inflamación y sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros.

1.1.3 Sarcoma

Se desarrollan el tejido conectivo de nervios, vasos sanguíneos, músculos, huesos y tejido adiposo.

Se produce en todo el organismo, predominando en las extremidades y órganos internos (4).

1.1.4 Glioma

Los gliomas son tumores formados en las células gliales o tejido de sostén cerebral.

Dentro de este tipo de cáncer se encuentran el astrocitoma que engloba subtipos de la enfermedad según su nivel de anomalía, entre ellos el glioblastoma (5).

1.2 Diseminación tumoral

La diseminación tumoral, es un proceso que permite establecer tumores secundarios en sitios alejados de su origen en el organismo. Este proceso se lleva a cabo gracias a eventos que permiten a las células movilizarse, nutrirse y crecer. Estos procesos son:

1.2.1 Angiogénesis

La angiogénesis es la capacidad de las células tumorales para producir la formación de nuevos vasos sanguíneos indispensables para la nutrición y crecimiento del tumor. Esto es logrado mediante la secreción de factores de crecimiento responsables de la formación de las redes capilares (6).

1.2.2 Proteólisis

Es la sobreproducción de proteasas por parte de las células cancerosas, que induce la producción de las mismas en células adyacentes a estas a través de la secreción de citosinas o factores de crecimiento para la degradación de la matriz extracelular, y favorecer la diseminación (8).

1.2.3 Pérdida de adherencia celular

Para poder diseminarse, las células cancerosas necesitan desprenderse del tejido de origen, esto es realizado cuando la célula pierde proteínas de anclaje; un ejemplo de estas proteínas es la E-cadherina. Esta proteína mantiene a las células epiteliales unidas, su carencia, hace pasar a la célula a un estado de movilidad, un cambio conocido como transición epitelial-mesenquimal (EMT).

Una vez desprendidas las células, migran a espacios alejados de su lugar de origen, por medio del sistema linfático o circulatorio (7).

1.2.4 Metástasis

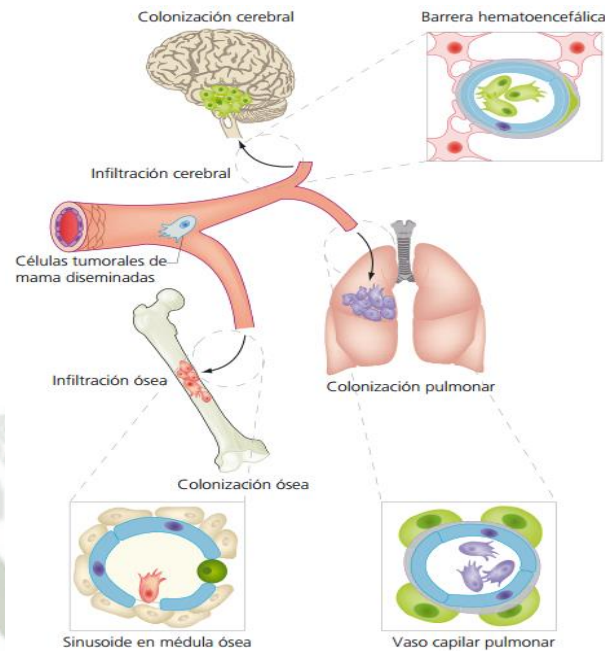
Este proceso por el cual las células cancerosas tienen la capacidad de reproducirse y movilizarse por el organismo, es lo que diferencia a un tumor maligno de uno benigno.

La metástasis se da luego de la creación de redes de vasos sanguíneos para la nutrición de nuevas células cancerosas, la destrucción proteolítica de la matriz extracelular de sostén, la posterior pérdida de la adherencia a ésta y la movilidad mediante vasos sanguíneos y linfáticos (8).

Los órganos más propensos a sufrir metástasis: el hígado, pulmones, huesos y cerebro (Figura I.1) (7).

Figura I.1: Diseminación metastásica de células tumorales de mama, diseminadas a través de vasos sanguíneos hacia células del cerebro, huesos y pulmón.

Fuente: Evolución y metástasis del cáncer (2009) (7).



1.3 Glioblastoma multiforme (Células U87)

El glioma de Grado IV, glioblastoma multiforme (GBM), es el tumor cerebral maligno primario más común con aproximadamente 16 000 nuevos diagnósticos cada año en los Estados Unidos. GBMs tienen una tasa de supervivencia de un año de sólo 29,6%, lo que es uno de los tipos más mortales de cáncer. Debido a su naturaleza altamente agresiva y las malas opciones terapéuticas la comprensión de la etiología genética de GBM es de gran interés y por lo tanto, GBM ha sido seleccionado como uno de los tres tipos iniciales de cáncer a ser estudiados a fondo (10).

1.3.1 Células Gliales

Células gliales La glía o células de la glía, son células que pertenecen al tejido nervioso, en donde tienen de soporte complementando a las neuronas, estas células constituyen una matriz interneuronal en donde hay una gran

variedad de células estrelladas y fusiformes, la diferencia de estas es que carecen la propiedad de producir potencial de acción.

Las células gliales controlan, fundamentalmente, el microambiente celular en lo que respecta a la composición iónica, los niveles de neurotransmisores y el suministro de citoquinas y otros factores de crecimiento (9).

1.3.2 Neoplasias en células gliales: Astrocitomas

Los astrocitos son las principales y más numerosas células gliales. Se trata de células de linaje neuroectodérmico que asumen un elevado número de funciones clave para la realización de la actividad nerviosa. Derivan de las células encargadas de dirigir la migración de precursores durante el desarrollo (5).

Los astrocitomas son un grupo de neoplasias intracraneales primarias del sistema nervioso central que aparecen en el parénquima. Forman parte del grupo de los mencionados anteriormente gliomas, se trata de tumores cerebrales primarios, es decir, tumores que se originan a partir de las células que conforman la estructura cerebral normal.

Dentro del grupo de los gliomas, los astrocitomas suponen los tumores más frecuentes (10).

1.3.3 Línea celular U87

U87MG o U87 es un glioblastoma, línea celular de astrocitoma derivada de gliomas malignos humanos. Las células son células epiteliales adherentes.

La línea celular U87MG usas en más de 1700 publicaciones. Una de las principales características del genoma U87MG es el gran número de

anormalidades cromosómicas, que pueden ser típicas de las líneas celulares de cáncer y los cánceres primarios (9).

Se sabe ya ampliamente que las líneas celulares derivadas de tumores humanos son herramientas para el trabajo en cultivo celular e indispensable en oncología. Tienen una vida útil “infinita” (dependiendo de la línea celular tienen un máximo de pasajes antes de que las células ya no den un resultado fiable y reproducible) y son fáciles de manejar y escalables, y los resultados pueden obtenerse con alta reproducibilidad. Sin embargo, las líneas celulares derivadas de tumor en muchos casos no es auténtica al tumor de origen por la intervención de varias variables (9, 10).

2. Muerte celular

2.1 Necrosis

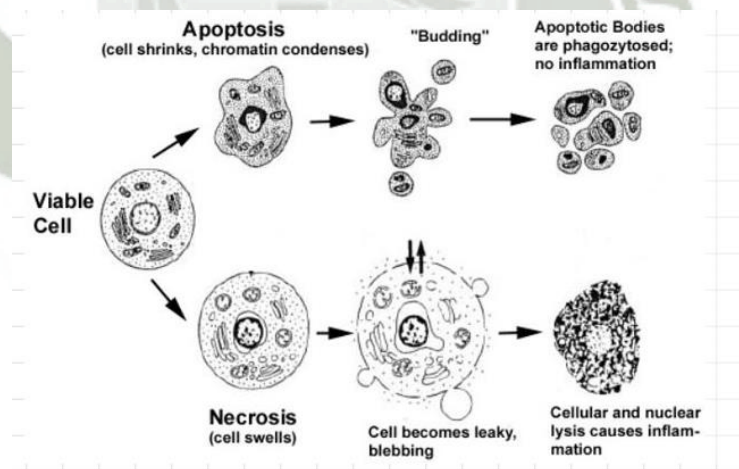
Una célula es necrosada cuando agentes externos como traumatismos, infecciones, sustancias tóxicas, entran en contacto con ésta produciendo su muerte.

Cuando el agente inductor de necrosis altera las membranas plasmática y mitocondrial las bombas de iones aumentan sus efectos para generar un mecanismo de defensa y mantener el equilibrio iónico; el núcleo celular inicia la transcripción de Heat Shock Proteins (HSP) o proteínas protectoras, con la finalidad de reparar el daño producido en la célula. Cuando esta respuesta de defensa no es suficiente, la célula entra en estado de turgencia, lo que finalmente, destruye la membrana plasmática (12).

2.2 Apoptosis

La muerte celular programada o apoptosis, se da por distintos estímulos que desencadenan procesos genéticos, finalizando en la muerte de la célula por decisión propia; ésta es la razón principal que diferencia a la necrosis de la apoptosis.

Cuando la célula entra en un proceso apoptótico, sufre una serie de cambios morfológicos, como la condensación de cromatina, deteniendo la actividad transcripcional del ADN, esta alteración lleva a la carencia de ARN mensajero, ribosomal y de transferencia, lo que imposibilita la síntesis de proteínas, ocasionando la muerte y ruptura de la célula, formando vesículas esféricas que son los cuerpos apoptóticos (Figura I.2) (11). Éstos luego serán fagocitados por macrófagos, y se desencadenará un proceso inflamatorio.



Figura

I.2:

Proceso de autofagia y necrosis.

Fuente: La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. 1997 (13).

2.3 Autofagia

Este es el proceso en el cual los organelos y citoplasma de la célula, son digeridos dentro de los lisosomas, como producto del estrés producido por falta de nutrientes para la célula; un ejemplo de esto es que la proteína TOR (Target de rapamicina), es un sensor inhibitor de la autofagia, al ser una central rica en nutrientes **(11)**.

Además de la autofagia puede darse por razones homeostáticas y biosintéticas, pues degrada a células u organelos que no son necesarios en el organismo o ya se han terminado de utilizar; por ejemplo digestión de peroxisomas.

El mecanismo de autofagia empieza con la inducción del proceso, sigue la selección de carga y embalaje, luego de esto se forma la vesícula, crece y madura; ésta una vez totalmente desarrollada fija un objetivo, pasa a fusionarse con el lisosoma, finalmente se da la formación del cuerpo autofágico **(11,12)**.

2.4 Parthanatos

Es un tipo de muerte celular, bioquímica y morfológica mente distinto a necrosis, autofagia o apoptosis (Figura III.3).

Este proceso, no depende caspasas a diferencia de la apoptosis, si no que se da con la intervención de la enzima reparadora de ADN, la ADP ribosa polimerasa-1 (PARP-1), que se activa cuando existe un estrés genotóxico, actuando junto a la proteína 53 (p53), en la restauración genética **(14)**.

Cuando se da una excesiva activación de PARP-1, esta enzima se trasloca desde el núcleo al citosol y promueve la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF), el cual, se encuentra en dos sectores de la célula, 80% en la mitocondria y 20% en el citosol, al ser liberado en la célula favorece la fragmentación del ADN y por último, la muerte celular. (14,15)

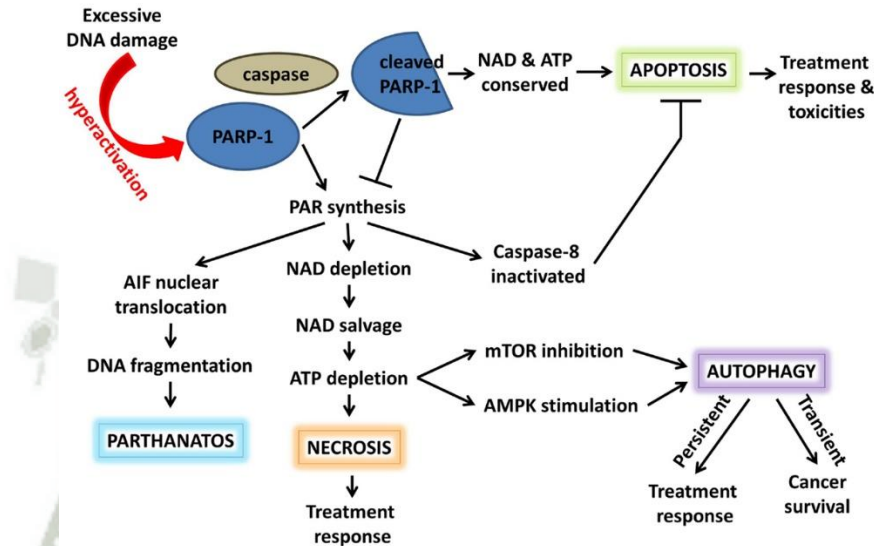


Figura I.3: Diferencias entre Parthanatos y los distintos tipos de muerte celular.

Fuente: Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cáncer (2013) (15).

2.5 Enzimas relacionadas a la muerte celular

2.5.1 ADP ribosa polimerasa-1 (PARP-1)

PARP-1 también como poli (ADP-ribosa) sintetasa es una proteína nuclear que comprende tres dominios funcionales. El dominio de unión a ADN amino-terminal contiene dos dedos de zinc que son importantes para la unión de PARP1 a rupturas de una hebra o dos. Recientemente se describió un tercer dedo de zinc y se descubrió que era dispensable para la unión al ADN,

pero es importante para acoplar los cambios inducidos por daño en el dominio de unión al ADN a alteraciones en la actividad catalítica de PARP1. (16) Paul Mendel y su grupo descubrieron por primera vez una actividad enzimática nuclear que sintetiza un polímero parecido al ARN y que contiene adenina, estudios posteriores demostraron que esta enzima está compuesta dos ribosas y dos fosfatos por unidad de polímero. Posteriormente descubrieron la activación del PARP 1 por rupturas del ADN, un trabajo hecho por Sydney Shall y colaboradores demostró que PARP 1 está involucrado en la reparación del ADN.

Otros experimentos demostraron que la sobreexpresión de PARP1 conduce a nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) y el agotamiento de ATP después de varios tipos de daño del ADN.

Potencialmente contribuyen a la única forma de muerte celular metabólica (parthanatos), se comenzó a estudiar más, por el descubrimiento de que la inhibición de PARP es particularmente tóxico en las líneas celulares de cáncer y tumores humanos.

PARP1 es una proteína nuclear que comprende tres dominios funcionales. El dominio de unión a ADN amino-terminal contiene dos dedos de zinc que son importantes para la unión de PARP1 a rupturas de una sola hebra y roturas de doble hebra. Recientemente se describió un tercer dedo de zinc y se descubrió que era dispensable para la unión al ADN, pero es importante para acoplar los cambios inducidos por daño en el dominio de unión al ADN a alteraciones en la actividad catalítica de PARP1.

Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es la fuente de ADP-ribosa utilizada por poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP) para producir poli (ADP-ribosa) (pADPr). Debido a que la hiperactivación de PARP1 consume los depósitos citosólicos y nucleares de NAD⁺ para generar pADPr, la

síntesis de pADPr representa intensidad del daño del ADN en función a los cambios en la energía celular. Bajo a moderado daño del ADN desencadena pADPr reparación del ADN. En el caso de daño excesivo en el ADN, la hiperactivación de PARP1 conduce a una síntesis prolongada de pADPr y un consumo extenso de NAD⁺. Dependiendo del contexto celular, esta intensa síntesis de pADPr puede inducir la muerte celular a través de varios mecanismos. Los pADPr largos y ramificados (60 dímeros y más largos) pueden desencadenar directamente una forma de muerte celular denominada parthanatos. Además, debido a que varias vías metabólicas celulares son dependientes de NAD⁺, la célula puede intentar reponer el pool de NAD⁺ citosólico, una reacción que agota el ATP celular e induce la muerte celular necrótica (17).

2.5.2 Regulador anti apoptótico BCL-2 y regulador pro apoptótico BAX

Bcl-2, se identificó originalmente como un oncogén implicado en el linfoma folicular humano de origen de células B2 (Bakhshi et al., 1985; Cleary & Sklar 1985; Tsujimoto et al. 1985; Tsujimoto & Croce 1986) el segundo miembro de una serie de proteínas encontradas en los linfomas humanos de células B con la translocación cromosómica t [14, 18] (18).

En 1988, Vaux et al. Descubrieron la actividad anti-apoptótica de esta proteína en un sistema en el que se indujo la apoptosis por privación de IL-3. (19)

Después se descubrió la familia de proteínas Bcl-2, compuestas de proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas que desempeñan un papel muy importante en la regulación de la apoptosis, especialmente a través de la vía intrínseca, ya que regular el daño celular irreversible y actúan principalmente a nivel mitocondrial. Bcl-2 fue la primera proteína de esta familia que se identificó

y está codificada por el gen BCL2, Todos los miembros Bcl-2 están situados en la membrana mitocondrial externa. Son responsables de la permeabilidad de la membrana ya sea en forma de un canal iónico o mediante la creación de poros.

Se dividen en tres grupos: el primer grupo son las proteínas anti-apoptóticas que contienen cuatro dominios y protegen a la célula de los estímulos apoptóticos. Algunos ejemplos son Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, A1 / Bfl-1 y Bcl-B / Bcl2L10; el segundo grupo está constituido por las proteínas BH-3, denominadas así porque en comparación con los otros miembros, están restringidas al dominio BH3. Ejemplos en este grupo incluyen Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk y Bik.

En tiempos de tensiones celulares tales como daño al ADN, privación del factor de crecimiento y estrés del retículo endoplásmico, se activan las proteínas BH3, que son iniciadores de la apoptosis, por lo tanto, son pro-apoptóticos.

Los miembros del tercer grupo contienen los cuatro dominios BH y también son pro-apoptóticos. Algunos ejemplos incluyen Bax, Bak, y Bok / Mtd.

Cuando hay disrupción en el equilibrio de los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2, el resultado es la apoptosis desregulada en las células afectadas. Esto puede ser debido a una sobreexpresión de una o más proteínas anti-apoptóticas o una Subexpresión de una o más proteínas pro-apoptóticas o una combinación de ambas. **(19)**.

2.5.3 Caspasas

En 1993, después de reconocerse de que tienen idéntica secuencia la enzima de conversión interleucina-1 β de cisteína proteasa de mamífero (ICE) y el gen ced-3 (en el nematodo *Caenorhabditis elegans*) codifica una proteína necesaria para la muerte celular del desarrollo, se identificaron nueve proteasas relacionadas con ICE.

Aparecieron varias confusiones con el nombre como consecuencia de adición de grupos para aislar las proteasas. Para resolver esto, se unificó una nomenclatura, el nombre trivial que se propone para todos los miembros de la familia es la caspasa, la 'c' que denota una cisteína proteasa y la 'aspasa' que se refiere a la capacidad de estas enzimas de escindirse después de un residuo de ácido aspártico.

A continuación, haremos referencia a estas proteasas en orden de publicación, teniendo en cuenta que ICE es el primer miembro de esta familia, caspasa 1. (Figura I.4).

Las caspasas se dividen en tres grupos: las caspasas del Grupo I (caspasas -1, -4, -5,) escinden la secuencia del sustrato (W / L) EHD. Esta secuencia está ausente en la mayoría de los sustratos de apoptosis y estas caspasas son responsables de la generación de señales inflamatorias y la regulación inmune en lugar de en la señalización de la muerte celular.

Grupo II (caspasas -2, -3, -7), que prefieren un motivo DEXD, y caspasas del grupo III (caspasas -6, -8, -9, -10). Las caspasas -8, -9 y -10 (caspasas iniciadoras) inician la propagación de las señales apoptóticas mientras que las caspasas -3, -6, y -7 (caspasas

efectoras) ejecutan el programa apoptótico mediante la escisión de numerosas proteínas celulares. (20)

Caspase	Other names	Active site	Cleavage site(s) between large and small subunits	CrmA inhibition
Caspase-1	ICE	QACRG	WFKD ↓ S; FEDD ↓ A	+++
Caspase-2	Nedd2, ICH-1	QACRG	DQQD ↓ G; EESD ↓ A	±
Caspase-3	CPP32, Yama, apopain	QACRG	IETD ↓ S	±
Caspase-4	ICE _{II} , TX, ICH-2	QACRG	WRVD ↓ S; LEED ↓ A	+++
Caspase-5	ICE _{III} , TY	QACRG	WRVD ↓ S; LEAD ↓ S	?
Caspase-6	Mch2	QACRG	DWVD ↓ N; TEVD ↓ A	±
Caspase-7	Mch3, ICE-LAP3, CMH-1	QACRG	IQAD ↓ S	±
Caspase-8	MACH, FLICE, Mch5	QACRG	VETD ↓ S; LEMD ↓ L	+++
Caspase-9	ICE-LAP6, Mch6	QACRG	DQLD ↓ A	?
Caspase-10	Mch4	QACRG	SQTD ↓ V; IEAD ↓ A	±

Figura I.4 Descripción de las caspasas, sitio de acción y nomenclatura.

Fuente: Caspases: the executioners of apoptosis 1998. (22)

Las caspasas se sintetizan como pro enzimas inactivas, que se activan después de la escisión en sitios específicos de escisión de aspartato. La activación de caspasas se lleva a cabo mediante otra caspasa iniciadora. Una vez activadas, las caspasas efectoras son responsables de la escisión proteolítica de un amplio espectro de blancos celulares, lo que conduce en última instancia a la muerte celular. La respuesta apoptótica se activa a través de la vía intrínseca o extrínseca, dependiendo del origen de los estímulos de muerte. La vía intrínseca se activa en respuesta a una amplia gama de estímulos de muerte que se generan desde dentro de la célula, como la activación del oncogén y el daño del ADN.

La vía intrínseca está mediada por las mitocondrias: En respuesta a los estímulos apoptóticos varias proteínas, como el citocromo c, se liberan del espacio intermembrana de las mitocondrias en el citoplasma. El citocromo c se une y activa la proteína APAF1 en el citoplasma que permite que APAF1 se una a ATP / dATP y

forme el apoptosoma, que media la activación de la caspasa-9, desencadenando así una cascada de activación de caspasa. La vía extrínseca se inicia por unión de un ligando de muerte extracelular, tal como FasL y TNF-alfa, a su receptor de muerte en la superficie celular, tal como FasR y TNFR. La proteína adaptador FADD, TRADD, RIDD transmiten la señal de activación a las caspasas efectoras caspasa-2, -8 y -10. La caspasa-10 puede funcionar independientemente de la caspasa-8 en la iniciación de Fas.

El IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina 1) exhibe una fuerte actividad anti-apoptótica. IGF-1 estimula la activación de AKT (RAC serina / treonina-proteína quinasa) y AKT-inducida por la fosforilación inhibitoria de la caspasa-9. Por lo tanto, IGF-1 inhibe la apoptosis mediada por caspasa-9.

La vía extrínseca puede interferir con la vía intrínseca a través de la clivación mediada por caspasa-8 de BID (un miembro BH3-ONLY de la familia BCL2 de proteínas), que entonces desencadena la liberación de proteínas mitocondriales.

Caspasa-3 y caspasa-6 son necesarias para la división de un gran número de proteínas nucleares esenciales para la apoptosis asociados cromatina condensada, la fragmentación del ADN, y el colapso nuclear. (21)

3. Sistema Endocannabinoide

El estudio del sistema cannabinoide, es sin duda de gran interés desde el descubrimiento del sistema endógeno en el ser humano. El sistema endógeno cannabinoide o endocannabinoide (SEC) está constituido por receptores cannabinoideos, ligandos y enzimas de producción y degradación (23).

Los receptores cannabinoides que han sido descritos hasta el momento, son: CB₁, CB₂, CB₃ (GPR 55) y CB₄ (GPR119); y los ligandos endógenos o endocannabinoides son: araquidonil-etanolamina (AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG), noladín éter (NE), virodamida (VIR) y N-araquidonil-dopamina (NADA). Además también existen compuestos endógenos con efectos similares pero que no forman parte de los ligandos endocannabinoides propiamente dichos, sino que son compuestos cannabimiméticos como: palmitoiletanolamida, homo- γ -linolenoiletanolamida, docosatetraenoiletanolamida, y oleamida (24).



3.1 Receptores cannabinoides

Los receptores cannabinoides, pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (Figura I.5). El primer receptor en ser clonado fue el receptor cannabinoide CB₁, en 1988, seguido por el segundo receptor cannabinoide CB₂, que fue descrito en 1993 (24).

Estudios posteriores, dieron evidencia de efectos que estaban mediados por cannabinoides no afines a CB₁ o CB₂, sugiriendo así la existencia de otros puntos diana para estos componentes y la presencia de nuevos receptores cannabinoides. Esto llevó al descubrimiento del receptor cannabinoide CB₃, descrito como el receptor huérfano acoplado a proteínas G 55 (GPR55), que es activado por ligandos endocannabinoides como anandamida (AEA), 2-araquidonilglicerol (2-AG) y virodamida (24,25).

Posteriormente, se describió el receptor CB₄, siendo también un receptor huérfano acoplado a proteínas G (GPR119), activado por el compuesto cannabimimético. N-oleoiletanolamida (25).

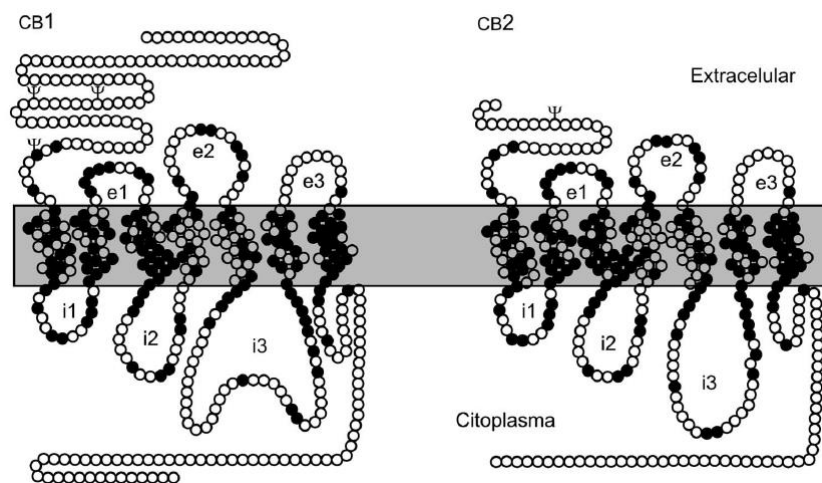


Figura I.5:

Estructura de los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ acoplados a proteínas G transmembrana. Donde ● son los aminoácidos comunes a ambos receptores,

o los aminoácidos distintos; se muestra las secciones extracelulares de los receptores (e1, e2 y e3) y las secciones intracelulares (i1, i2 e i3).

Fuente: Cannabinoides: Neurobiología y usos médicos (2005) (32).

3.1.1 Receptor cannabinoide CB₁

Este receptor, es un polipéptido de 476 aminoácidos, que presenta 7 dominios transmembrana y se encuentra acoplado a proteínas G inhibitorias (G_i, G_o) insertadas en la membrana plasmática celular; su gen se está expresado en el cromosoma 6, en los seres humanos. Es el receptor más abundante acoplado a proteínas G (24).

El receptor CB₁ es considerado principalmente como un receptor pre sináptico. Se encuentra abundantemente, en el sistema nervioso central, su mayor densidad está localizada en los ganglios basales: sustancia negra, núcleo entopenduncular, globo pálido y putamen lateral. Es en estos núcleos, en donde también existe la presencia de numerosas neuronas que sintetizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) es por esto, que los receptores CB₁ pueden modificar la liberación de este neurotransmisor (24,27).

Los receptores CB₁ están en la capa molecular del cerebelo, y en partes del hipocampo. Este receptor tiene una presencia moderada en la corteza cerebral (capas I y IV), está en neuronas productoras de glutamato que forman la vía principal para la entrada de señales tipo excitatorio para las células estriadas responsables del movimiento (27).

Estos receptores existen también en el hipotálamo, en células gliales, tallo cerebral y médula espinal. Además se encuentran, en células adiposas, corazón, próstata, útero y ovario. (23,26, 31).

3.1.2 Receptor endocannabinoide CB₂

El receptor CB₂, también denominado receptor periférico, es un polipéptido de 360 aminoácidos y pertenece a la familia de los receptores unidos a proteínas G_{i/o} (24).

Tiene una marcada diferencia con el receptor CB₁, respecto a su localización. Se encuentra fundamentalmente en el bazo, timo, amígdalas, médula ósea y células del sistema inmune como linfocitos B, monocitos, mastocitos y linfocitos T. También se ha evidenciado la presencia de estos receptores en microglía y pulmones (26, 28)

Ya que, los receptores CB₂ se encuentran de forma muy marcada en el sistema inmunológico y que las poblaciones celulares que lo componen, intervienen en procesos de inflamación es posible explicar los efectos moduladores que ejercen la fito y el endocannabinoides sobre la respuesta inmune del organismo (27, 28).

3.1.3 Señalización y mecanismos de transducción de los receptores cannabinoides

La unión de los cannabinoides y endocannabinoides a los receptores da como resultado la intervención de una cadena de segundos mensajeros que pueden ser: adenosín monofosfato cíclico (AMPc), inositoles fosfato y calcio o ceramidas (27).

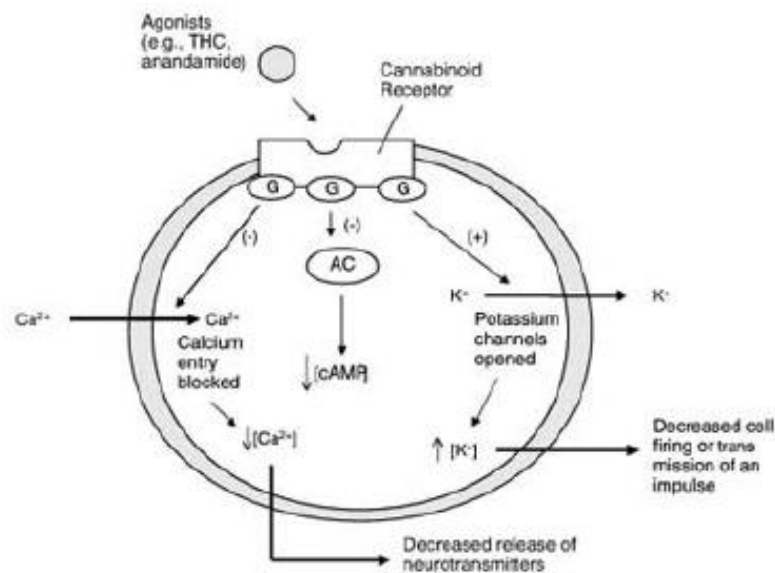
Ambos receptores, CB₁ y CB₂, al estar acoplados a proteínas G inhibitoras (G_{i/o}), se fosforilan e inhiben a la enzima adenilato ciclasa (AC), esto origina una disminución en los niveles de AMPc, éste a su vez, reduce la actividad de la proteína quinasa A (PKA). A consecuencia de esto, se abren los canales de potasio y se bloquean los canales de calcio dependientes de voltaje (Figura I.6) (32).

Ya que, es así como se da la señalización en los receptores cannabinoides, se explica uno de los principales efectos del receptor CB₁; la modulación de liberación de neurotransmisores como dopamina, serotonina, GABA entre otros (27).

Estos receptores también modulan la activación y fosforilación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y fosfatidilinositol quinasa (PI3K), mediante ceramidas, proteínas de vesículas sinápticas, proteínas que regulan la transcripción genética y enzimas. (32, 33).

Figura I.6: Señalización de los receptores cannabinoides. Las proteínas G

se



activan por la unión del ligando con el receptor. Se inhibe a la adenósín ciclasa AC, lo que origina una disminución de AMPc, bloqueándose los canales de calcio y abriendo los de potasio.

Fuente: Uso terapéutico del cannabis: Farmacología básica (2007) (34).

3.2 Ligandos endocannabinoides

Como resultado de la identificación de receptores cannabinoides en el organismo, se vio la necesidad de buscar ligandos cannabinoides endógenos para estos receptores (29,30).

En 1993, el grupo Mechoulam, logró identificar un compuesto derivado del ácido araquidónico, la araquidonil-etanolamina (AEA), que tenía efectos farmacológicos similares al tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC, compuesto cannabinoide exógeno, proveniente de *Cannabis sativa*) y afinidad por los receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ (30).

Posteriormente, fue descrito en 1995, el 2-araquidilglicerol (2-AG), encontrado en el intestino canino, evidenciando, al igual que AEA, tener efectos similares al Δ^9 -THC (23,30).

En 2001, el tercer endocannabinoide en ser identificado, fue denominado noladín éter (NE), que tiene mayor afinidad por el receptor CB₁ con respecto al CB₂. Un año después se describió el cuarto endocannabinoide, O-araquidoniletanolamina o virodamida (VIR) que presentaba el mismo peso molecular de AEA pero poseía un tiempo de retención corto; al ser analizado, evidenció tener una estructura opuesta a AEA, al ser una molécula de ácido araquidónico y etanolamina, unidos por un éster (29).

Finalmente, se identificó a N-araquidonil-dopamina (NADA), que junto con AEA, no sólo se acoplan a receptores cannabinoides, sino que también, pueden activar al receptor vanilloide (TRPV1) (28).

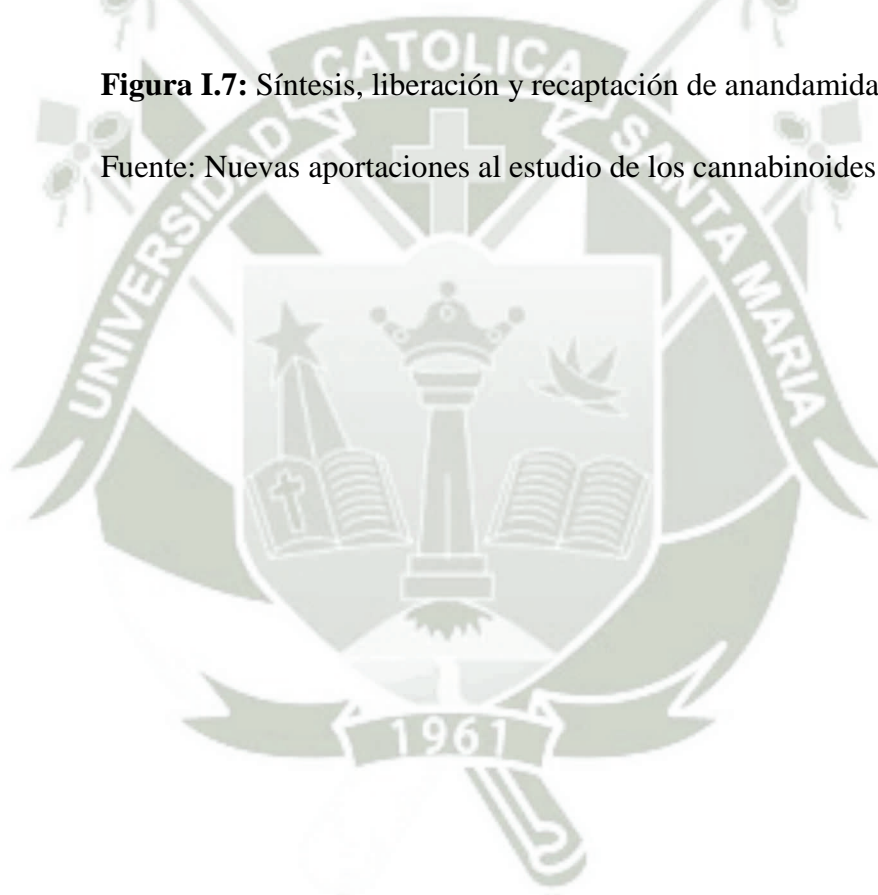
3.2.1 Araquidonil-etanolamida o Anandamida (AEA)

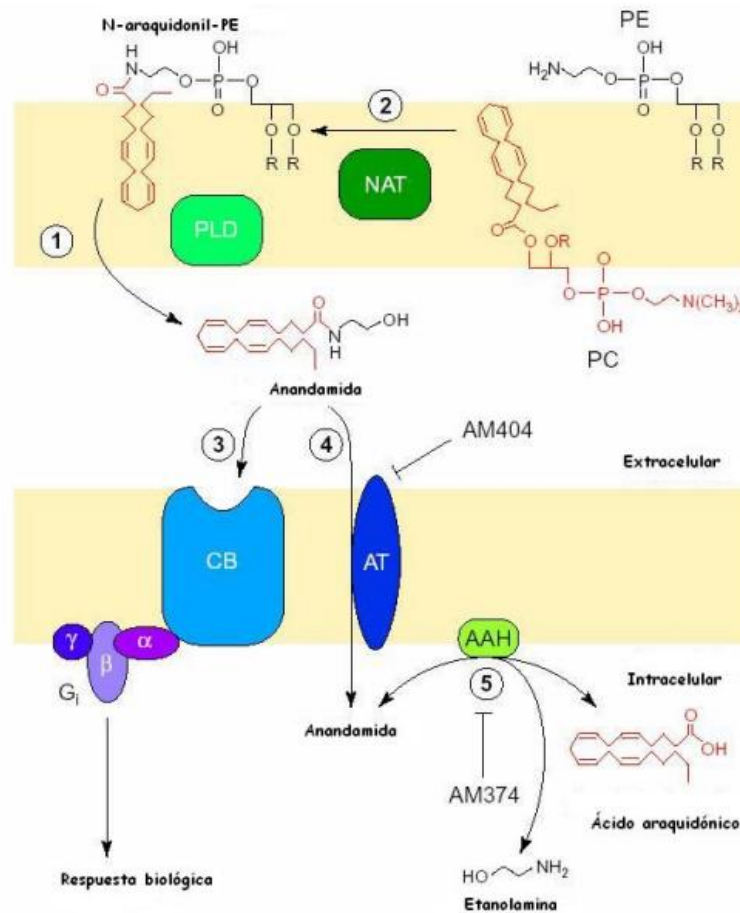
La anandamida o araquidonil-etanolamida (AEA) es un endocannabinoide, derivado del ácido araquidónico (AA). Este endocannabinoide tiene afinidad por ambos receptores cannabinoides CB₁ y CB₂ y cuenta con un efecto farmacológico similar al cannabidiol (33).

La anandamida (AEA) se sintetiza a partir de la hidrólisis de N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE), un precursor fosfolipídico; esta acción es realizada por la enzima fosoflipasa D, resultando en la liberación de ácido fosfatídico y N- aciletanolaminas como la AEA (Figura I.7) (29,24).

Figura I.7: Síntesis, liberación y recaptación de anandamida.

Fuente: Nuevas aportaciones al estudio de los cannabinoides (2003) (24).





A diferencia de otros neurotransmisores, los endocannabinoides, no se almacenan en vesículas, sino, en forma del precursor del que provienen, porque se sintetizan a demanda, quiere decir, que la anandamida se produce justo en el momento en el que el organismo requiere de su acción (29).

La anandamida es liberada, al espacio intersináptico, por difusión facilitada bidireccional que se realiza a favor de la gradiente de concentración y luego es recaptada selectivamente por células gliales y neuronas (24).

AEA es metabolizada rápidamente por lo que su efecto es muy corto, su principal vía de degradación es la hidrólisis producida por la amidohidrolasa

de ácidos grasos (FAAH) que la degrada en etanolamina y ácido araquidónico (AA). Además de la hidrólisis por FAAH, la anandamida es metabolizada por otros mecanismos como la oxidación por ciclooxygenas 2 (COX₂), lipooxygenas (LOX) y la degradación por citocromo P450 (CYP450) que la transforma en 20 metabolitos activos y además metaboliza el AA resultante de la hidrólisis por FAAH (Figura I.8) (24, 35).

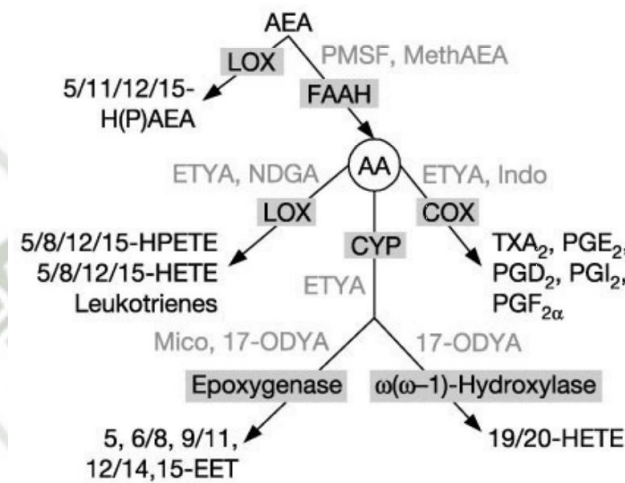


Figura I.8: Rutas metabólicas de la anandamida.

Fuente: Nuevas aportaciones al estudio de los cannabinoides (2003) (24).

3.2.2 2-araquidonilglicerol (2-AG)

El segundo endocannabinoide más importante en el organismo es el 2-araquidonilglicerol (2-AG), siendo 200 veces más abundante que la anandamida a nivel cerebral y con una afinidad por ambos receptores CB₁ y CB₂, siendo del segundo, su principal molécula de unión (36).

El 2-AG se forma del ácido araquidónico, sin embargo necesita de glicerol para llegar a su forma final, esto sucede cuando el diacilglicerol (DAG) del fosfolípido, que contiene ácido araquidónico, sufre una transformación a

causa de la enzima diacilglicerol lipasa (DAGL). Cabe mencionar, que este endocannabinoide, a diferencia de otros neurotransmisores, se produce a demanda y no se almacena en vesículas y que es degradado por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), FAAH y otra enzimas, pero que la degradación por MAGL se produce hasta en un 85% de los casos (37).

En la figura I.9 podemos ver la bioquímica del sistema endocannabinoide, en donde se muestran las vías de síntesis de ambos endocannabinoides: AEA: hidrólisis de NAPE; 2-AG: por la acción de DAGL sobre DAG a partir de fosfolípidos en las membrana celular (PI). También se aprecia las enzimas encargadas de la degradación de AEA y 2-AG, que son FAAH y MAGL, respectivamente y sus productos finales.

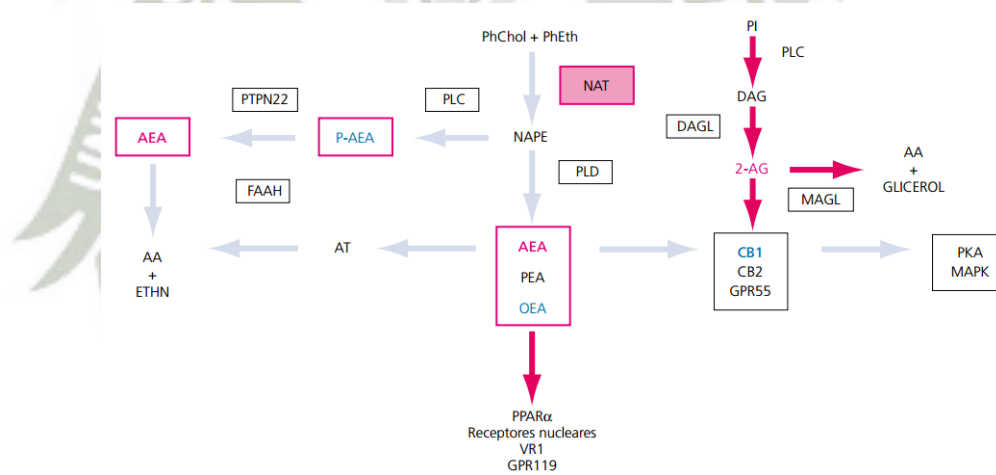


Figura I.9: Bioquímica del sistema endocannabinoide.

Fuente: Bioquímica de la adicción a cannabis. (2012) (37)

4. Inhibidores de enzimas de degradación de endocannabinoides

4.1 Inhibido de MAGL, JZL-184

JZL-184(4-[Bis (1,3-benzodioxol-5-yl) hidroximethyl]-1-ácido piperidín

Carboxílico 4-nitrophenil éster) (Figura I.10), es un potente inhibidor de la enzima degradadora de 2- Araquidilglicerol, MAGL.

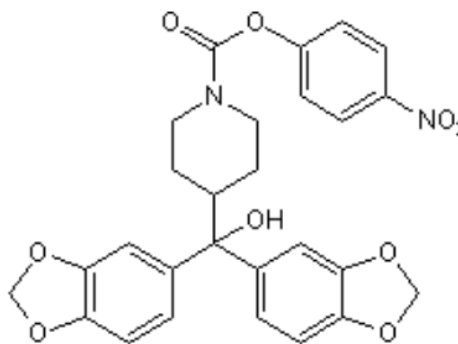


Figura I.10. Estructura química de JZL-184. 4-[Bis (1,3-benzodioxol-5-yl) hidroximethyl]-1-ácido piperidín carboxílico 4-nitrophenil éster

Fuente: Tocris (2017) (38)

Se le ha descrito también, como un inhibidor de FAAH, pero su efecto es 300 veces menor, comparado a su acción inhibitoria con MAGL. Además también existe evidencia de ejercer acción sobre ácidos grasos en tumores primarios.

Se han hecho estudios en los que se muestra a JZL-184 como una posible herramienta terapéutica, pues tiene la capacidad de incrementar los niveles de 2-AG y reducir metabolitos como ácido araquidónico, prostaglandinas, etc. (39).

4.2 Inhibidor de FAAH, OL-135

OL-135 (1-Oxo-1-[5-(2-piridil) oxazol-2-il]-7-phenilheptano, 7-Phenil-1-[5-(2-piridinil)-2-oxazolil]-1-heptanona) (Figura I.11), es un inhibidor selectivo, reversible de la enzima que hidroliza a anandamida, FAAH (40).

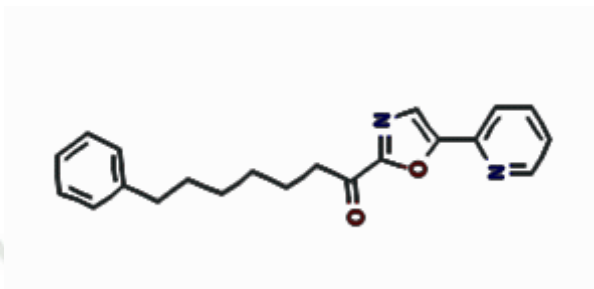


Figura I.11. Estructura química de OL-135. 1-Oxo-1-[5-(2-piridil) oxazol-2-il]-7-phenilheptano, 7-Phenil-1-[5-(2-piridinil)-2-oxazolil]-1-heptanona.

Fuente: Pub Chem, (2017) (42)

Está sujeto a estudios que demuestran su efecto analgésico, al aumentar los niveles de anandamida en el sistema nervioso central. También se han realizado estudios para probar su efecto en pacientes con ansiedad, trastornos del miedo, etc. ya que, los endocannabinoides pueden tener un punto de señalización en la amígdala del hipotálamo, que es crítica la generación de recuerdos de ansiedad (42).

4.3 Inhibidor dual JZL-195

JZL-195(4-nitrofenil-4-(3-fenoxibenzil) piperazina-1-carboxilato) (Figura I.12), es un potente inhibidor dual, que tienes la capacidad de detener la hidrólisis tanto de Anandamida como 2-araquidonilglicerol, inhibiendo la acción de FAAH y MAGL, respectivamente.

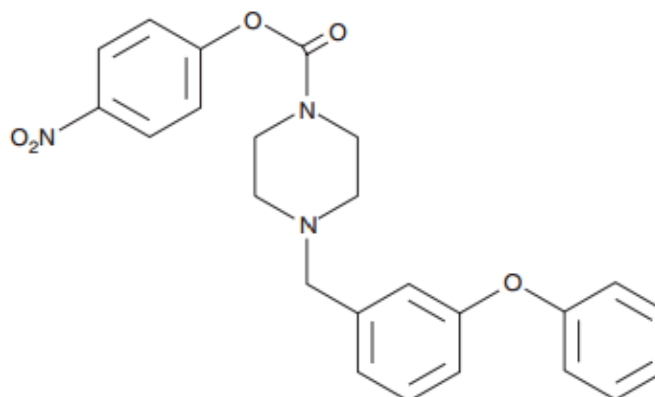


Figura I.12. Estructura de JZL-195. 4-nitrofenil-4-(3-fenoxibenzil) piperazina-1-carboxilato.

Fuente: Cayman Chemical (2017) (43).

En estudios *in vitro*, la capacidad inhibitoria de JZL-195 es comparable a inhibidores selectivos de cada enzima individualmente, como JZL-184 o PF-3835, además aumenta los niveles de AEA y 2-AG en el cerebro, produciendo efectos catalépticos, de hipo movilidad y antinociceptivos.

5. Cultivos celulares

Cultivo celular es el proceso de remover o extraer células eucariotas y procariontas de su fuente de origen y su crecimiento subsiguiente en un medio o ambiente artificial favorable. Normalmente las células son separadas del tejido directamente y desagregarse por medios enzimáticos o mecánicos o también pueden ser derivado de una línea celular por medio de los llamados pasajes (44).

El cultivo celular es una herramienta utilizada en biología celular y molecular, son excelentes modelos para estudiar la bioquímica, el efecto de fármacos, compuestos tóxicos, comportamiento, carcinogénesis, etc. Se utiliza también para el desarrollo de fármacos y vacunas. La ventaja de esta técnica es la reproducibilidad de resultados. Con esta técnica

ya se comenzó a dejar de utilizar animales como base para la prueba de fármacos o tóxicos, primero se prueba en células y cuando hay buenos resultados se pasa a animales, así se evita daño a estos (45).

5.1 Línea celular

Después de que las células se aíslan del tejido y proliferan en las condiciones apropiadas hasta que ocupan todo el sustrato, es decir llegan a la confluencia, las células tienen que ser subcultivadas (hacer pasaje) transfiriéndolas a otro recipiente con más espacio y con las mismas condiciones para que se multipliquen. Este cultivo se conoce como una línea celular o subclón. Estas líneas celulares derivadas tienen una vida útil limitada ya que a medida que se hacen pasajes predominan las células con mayor capacidad de crecimiento esto da lugar a un grado de uniformidad.

Las células que son extraídas de un tejido sano se dividen solo un número limitado de veces o se puede decir que tienen un número limitado de pasajes antes de perder la capacidad de proliferación (células de cultivo primarias). Sin embargo algunas líneas celulares se vuelven inmortales, que sucede por una transformación química, viral o espontánea. También tienen estas características las células que son extraídas de tumores o tejido con cáncer (células de cultivo secundarias).

Para que las células se multipliquen, como se mencionó, tienen que tener un ambiente adecuado y tienen que estar en un medio de cultivo adecuado, estas condiciones varían ampliamente entre cada tipo de célula y también dentro de la misma célula (dependiendo del objetivo del experimento). Lo que no varía es su entorno artificial en el cual la célula se cultiva, el cual debe contener lo siguiente, un sustrato o medio que suministra los nutrientes esenciales (aminoácidos,

carbohidratos, vitaminas, minerales), factores de crecimiento, gases como CO₂. Un ambiente fisicoquímico regulado el pH, presión osmótica y temperatura). La mayoría de las células son dependientes del anclaje y deben cultivarse mientras están unidas a un sustrato sólido o semisólido (cultivo adherente o monocapa), mientras que otras pueden crecer flotando en el medio de cultivo (cultivo en suspensión) (45).

5.2 Cultivo celular en mono capa

Se refiere a que las células van a estar ancladas (por un enlace debido a las proteínas de la membrana celular) al plástico del recipiente que contiene el medio de cultivo. Normalmente los procesos de subcultivo o pasajes tienen los siguientes pasos: romper el enlace de las células con el recipiente el cual se hace con ayuda de enzimas como la tripsina, dispasa o colagenasa; normalmente estas enzimas están acompañadas de un quelante de cationes divalentes (46).

5.3 Medios de cultivo

Como se mencionó, para que la célula se desarrolle y multiplique se necesita un medio de cultivo adecuado. Los requisitos básicos para que las células se desarrollen óptimamente son cuatro elementos: la naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células, las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio, la naturaleza y composición de la fase gaseosa y las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura (47). Es considerado el paso más importante y crucial en el cultivo celular la selección del medio de crecimiento (48). El medio de cultivo puede ser un líquido o un gel que está diseñado para ayudar en el crecimiento de la célula. Un medio de cultivo común está compuesto por un complemento de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero además como fuente de factores de crecimiento,

hormonas y factores de unión. Además de esto el medio ayuda a mantener el pH y la osmolaridad (49).

Cuando se usa el modelo de monocapa las células crecen unidas a un soporte sólido. El crecimiento en suspensión está usualmente restringido a algunas líneas celulares especialmente de células hematopoyéticas y tumores ascíticos. Según si necesita unirse al sustrato se dice que es dependiente o independiente (suspensión) de anclaje. Los tipos de sustratos empleados en la actualidad son los siguientes: vidrios, plásticos desechables, membranas plásticas porosas, microsoportes de poliestireno, sustratos metálicos de paladio (para células de la glía), matrices tridimensionales (geles de colágeno), sustratos no adherentes (agar, agarosa o methocel), frascos o botellas de Roux (pueden ser ventiladas o no), multiplacas (desde 6 a 96), etc.

Los componentes más significativos de la fase gaseosa son el oxígeno y el dióxido de carbono. La demanda de oxígeno para la mayor parte de cultivo de células es cubierta por la tensión atmosférica (McKeehan y col., 1976 propusieron que los requerimientos de selenio en el medio podrían ser debidos a su papel en la detoxificación de radicales de oxígeno, especialmente en los medios sin proteínas séricas). El dióxido de carbono es muy importante debido a que influye en el pH y la cantidad de iones bicarbonato.

Sin embargo, se emplean otras sustancias tamponadoras en la formulación de muchos medios en la actualidad, lo que permite una estabilidad superior del pH en el medio, así como una mayor capacidad tamponadora (los denominados Good's buffers: HEPES, Tricina, etc. (Good et al., 1966)). Los cultivos crecidos a baja densidad en un recipiente abierto precisan una atmósfera de CO₂, cuya concentración esté en equilibrio con el bicarbonato sódico en el medio. A concentraciones celulares muy reducidas (por ej. durante el clonaje) es necesario

añadir CO₂ en la fase gaseosa de los frascos cerrados. Cuando la concentración celular es más elevada puede no ser necesario añadir CO₂ a frascos cerrados, pero si en frascos abiertos. En los casos en los que la densidad celular sea elevada, con mucha producción de ácido es recomendable, por la elevada producción de CO₂ endógeno, mantener abierto el recipiente de modo que se pueda eliminar el exceso.

5.3.1 Propiedades Físicas de los Medios de Cultivo

Las propiedades físicas que tiene los medios de cultivo: pH, osmolaridad, temperatura, viscosidad y tensión superficial. El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7,4 aunque existen pequeñas variaciones: células epidérmicas pueden ser mantenidas a pH 5,5 (Eisinger y col., 1979). El indicador de pH que se suele emplear es rojo fenol, que presenta color rojo a pH 7,4, naranja a pH 7,0, amarillo a pH 6,5. El medio de cultivo debe estar tamponado, a fin de evitar los cambios bruscos de pH. La solución tamponadora más empleada sigue siendo el tampón bicarbonato, que equilibra el CO₂ atmosférico. HEPES es una opción por su elevada capacidad tamponadora en el rango 7,2 a 7,6, y se emplea en concentraciones de 10 a 20 mM. Osmolaridad, la mayoría de células que se cultivan tienen gran tolerancia a cambios entre el rango de 260 a 320 mOsm/kg.

Temperatura, es una propiedad que tiene una gran influencia en el crecimiento de las células, por eso es la importancia de un buen control.

Viscosidad, es determinada principalmente por el contenido en suero y tiene poca influencia sobre el crecimiento. Sí es importante para evitar el daño celular en la agitación del cultivo (menor daño a más viscosidad) y en la tripsinización (48).

5.3.2 Clasificación de los medios de cultivo

Los medios se pueden clasificar en dos: medios naturales y medios artificiales. Los medios naturales están constituidos por fluidos biológicos únicamente. La desventaja de estos es la reproducibilidad, por la falta de conocimiento de la composición de estos. Los medios artificiales se preparan por la adición de nutrientes orgánicos e inorgánicos, vitaminas, sales, O₂ y CO₂ fases de gases, proteínas séricas, carbohidratos, cofactores.

Los medios artificiales se utilizan principalmente para estos propósitos: 1) supervivencia inmediata (una solución salina equilibrada, con pH específico y presión osmótica); 2) supervivencia prolongada (una solución salina equilibrada suplementada con diversas formulaciones de compuestos orgánicos y / o suero); 3) crecimiento indefinido; 4) funciones especializadas (47). Poseen:

- Soluciones salinas equilibradas (BSS). Una solución salina equilibrada es una mezcla de sales inorgánicas, incluyendo usualmente bicarbonato sódico, y suplementada con glucosa. Se usan para diluir medios más completos, como medio de disección o lavado, o para incubaciones cortas que requieren un medio isotónico no completo nutricionalmente.
- Aminoácidos, un suplemento común es el de glutamina, a 2 mM final, aunque hay algunas líneas celulares pueden usar el glutamato. La glutamina es inestable en el medio, y se recomienda añadirla a partir de un stock concentrado (100×) que se mantiene congelado.
- Vitaminas
- Glucosa
- Suplementos orgánicos

- Hormonas y factores de crecimiento. En los medios no definidos suele aportarlos el suero. Los tipos de suero empleados son suero de ternera ("calf serum", CF), suero bovino fetal (SBF), suero de caballo ("horse serum", HS) y suero humano ("human serum", HuS).
- Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos). A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. Debe ser muy bien controlada para evitar efectos negativos en el cultivo o experimento. Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos. Las mezclas de uso más común son:
 - Penicilina (100 U/mL) / Estreptomicina (100 µg/mL). Combinación anti-microbiana.
 - Penicilina (100 U/mL) / Estreptomicina (100 µg/mL) / Fungizona. Combinación anti-microbiana y anti-fúngica.
 - Gentamicina (50 µg/mL). Anti-microbiana, conviene ir alternándola con la penicilina-estreptomicina.
 - Anfotericina-B (2,5 µg/mL). Antifúngico y antilevaduras. Se han observado algunos efectos secundarios sobre el crecimiento de células de médula ósea humana en cultivo.

Además estos medios artificiales están agrupados en cuatro categorías:

Medios que contienen suero, SBF (suero bovino fetal) es el suero más común utilizado cuando se hacen crecer células animales. Es utilizado por su bajo costo. También el suero proporciona vehículos o agentes quelantes para los nutrientes, hormonas y factores de crecimiento, inhibidores de proteasa y se une y neutraliza restos tóxicos.

Medios libres de suero, este presenta algunos inconvenientes en ciertos experimentos por malas interpretaciones principalmente en estudios inmunológicos. Estos medios están generalmente formulados específicamente para soportar el cultivo de un solo tipo de célula e incorporan cantidades definidas de factores de crecimiento purificados, lipoproteínas y otras proteínas, que de lo contrario normalmente son proporcionadas por el suero. Estos medios también se denominan medios de cultivo definidos, ya que los componentes de estos medios son conocidos.

Medio químicamente definido, no tienen ingredientes inorgánicos y orgánicos. Sus componentes se producen en bacterias o levaduras gracias a adición de vitaminas, colesterol, aminoácidos y ácidos grasos.

Medios libres de proteínas: No tienen ninguna proteína, a diferencia del suero promueve el crecimiento celular superior y la expresión de proteínas y facilita la purificación cualquier producto expresado. Formulaciones como MEM, RPMI-1640 son libres de proteínas y suplemento de proteínas se proporciona cuando sea necesario (49).

5.3.3 Principales medios de cultivo y sus aplicaciones:

- Medio Basal de Eagle (BME). Medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.
- Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10%).
- RPMI 1640. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.
- Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM). Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT o HT
- Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM). Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, et... Es muy útil para el cultivo de linfocitos en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones.
- Medio L-15 de Leibovitz. Utilizado para el cultivo de virus.

- Medio F-10 de Ham. Para el crecimiento de líneas celulares humanas, debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, Cu, Zn. Es útil para el cultivo de células amnióticas.
- Medio F-12 de Ham. Útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos. Combinado con IMDM es un medio que se usa como libre de suero **(48)**.

5.3.4 Medio Mínimo Esencial (MEM)

Desarrollado por Harry Eagle, es uno de los medios de cultivo celular artificiales más utilizados. Los primeros intentos de cultivar fibroblastos normales de mamíferos y ciertos subtipos de células HeLa revelaron que tenían requerimientos nutricionales específicos que no podían cumplirse con el Medio Basal de Eagle (BME). Estudios posteriores usando estas y otras células en cultivo indicaron que se podrían hacer adiciones a BME para ayudar al crecimiento de una variedad más amplia de células fastidiosas. MEM, que incorpora estas modificaciones, incluye concentraciones más altas de aminoácidos, de modo que el medio se aproxima más a la composición proteica de células de mamífero. MEM se ha utilizado para el cultivo de una amplia variedad de células cultivadas en mono-capas. La suplementación opcional de aminoácidos no esenciales a las formulaciones que incorporan sales de Hank o de Eagles ha ampliado la utilidad de este medio. La formulación se ha modificado adicionalmente mediante eliminación opcional de calcio para permitir el crecimiento de células en suspensión **(47, 48)**.

6. Ensayo de viabilidad

Desde hace años, se han utilizado diversos compuestos de tetrazolio para detectar células viables. Los compuestos más comúnmente usados incluyen: MTT, MTS, XTT y WST-1. Se dividen en dos categorías básicas: 1) MTT que está cargado positivamente y penetra fácilmente en células viables; 2) aquellas como MTS, XTT y WST-1 que están cargadas negativamente y no penetran fácilmente en las células. La última clase (MTS, XTT, WST-1) se usa típicamente con un aceptor de electrones intermedio que puede transferir electrones desde el citoplasma o membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio en el producto de formazano coloreado (50).

Es un método colorimétrico para la cuantificación sensible de células viables en el ensayo de proliferación y citotoxicidad. El método se basa en la reducción del compuesto de tetrazolio MTS por células viables para generar un producto formazán coloreado que es soluble en medios de cultivo celular. Se cree que esta conversión se lleva a cabo por enzimas deshidrogenasas dependientes de NAD (P) H en células metabólicamente activas. El colorante de formazán producido por células viables puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 490-500 nm.

El ensayo de MTS puede usarse para medir la proliferación celular en respuesta a citoquinas, mitógenos y nutrientes, etc. También puede usarse para el análisis de compuestos citotóxicos como fármacos contra el cáncer y muchos otros agentes tóxicos y compuestos farmacéuticos. (51)

Los compuestos de tetrazolio que se ajustan a esta categoría incluyen MTS, XTT y la serie WST. Estos reactivos de tetrazolio mejorados (a comparación de MTT) eliminan una etapa de manipulación de líquidos durante el procedimiento de ensayo porque no es necesaria una segunda adición de reactivo a la placa de ensayo para solubilizar los precipitados de formazán, haciendo de este modo los pasos más sencillos y convenientes en la manipulación de células. Se cree que la carga negativa de los productos de formazano que contribuyen a

la solubilidad en el medio de cultivo celular limita la permeabilidad celular del tetrazolio. Este conjunto de reactivos de tetrazolio se utiliza en combinación con reactivos aceptor de electrones intermedios tales como fenazina metil sulfato (PMS) o fenazina etil sulfato (PES) que pueden penetrar células viables, se reducen en el citoplasma o en la superficie celular y salir de las células donde pueden convertir el tetrazolio en el producto de formazán soluble.

Debido a la naturaleza tóxica potencial de los aceptores de electrones intermedios, la optimización puede ser aconsejable para diferentes tipos de células y condiciones de ensayo individuales. Puede haber un rango estrecho de concentraciones de aceptor intermedio de electrones que resulten en un rendimiento óptimo (50).

7. Western Blot

Western blot o también llamado inmunoblotting, es una técnica muy importante en biología celular y molecular. Mediante el uso de este somos capaces de identificar proteínas específicas de una mezcla compleja que ha sido fraccionada en un gel e inmovilizada sobre una membrana, para llegar a esto se utiliza un anticuerpo específico que tiene un antígeno particular. La técnica de Western blot se usa para determinar características importantes de las proteínas, la presencia de estos y la cantidad, el peso molecular relativo de la cadena poli peptídica, además se puede determinar la eficiencia de la extracción de la proteína. Esta técnica utiliza tres elementos para realizar esta tarea: 1 separación por tamaño, 2 transferencias a un soporte sólido, y 3 marcaciones de la proteína diana usando un anticuerpo primario y secundario apropiado para visualizar. (52)

La inmunotransferencia se produce en seis etapas (Figura I.13):

1. Extracción y cuantificación de muestras de proteínas;
2. Resolución de la muestra de proteína en electroforesis en gel desnaturizante;
3. Transferencia de los polipéptidos

separados a un soporte de membrana; 4. Bloquear sitios de unión no específicos en la membrana; 5. Adición de anticuerpos; Y 6. Detección. (53)

7.1 Preparación de la muestras

La preparación de la muestra es importante para obtener una separación precisa de las proteínas sobre la base del peso molecular. Dependiendo de donde se encuentre la proteína en cuestión, extracelular, citoplásmico, nuclear o membrana diferentes procedimientos podrían ser necesarios para preparar la muestra. Aunque muchas proteínas nucleares y citoplásmicas solubles pueden solubilizarse mediante buffers de lisis que contienen el detergente no iónico y ni sales ni concentraciones relativamente altas de sal (NaCl 0,5 M). La eficacia de la extracción es afectada generalmente por el pH del buffer y la presencia o ausencia de agentes quelantes tales como EDTA. (53)

Los lisados celulares son la forma más común de muestra utilizada para la transferencia Western. Se debe hacerse a temperatura fría con inhibidores de proteasa para evitar la desnaturalización de las proteínas. Cuando la muestra tiene una estructura más grande o compleja es necesario intervenir con métodos mecánicos, como homogenización, centrifugación o sonicación, con el fin de obtener una buena lisis. Seguido de la extracción lo más común para tener conocimiento de la concentración del extracto es medir el extracto por espectrofotometría. La muestra por lo general se diluye con un buffer de carga y se calienta con la finalidad de desnaturalizar las estructuras grandes de las proteínas, la desnaturalización de las estructuras grandes garantiza que la carga de los aminoácidos no se neutralice, lo que permite que se mueva en un campo eléctrico.

7.2 Electroforesis

En la técnica de Western blot se usa dos tipos de gel de agarosa: apilamiento y separación. El gel de apilamiento es ligeramente más ácido y tiene menos concentración de acrilamida haciéndolo un gel poroso, lo que le hace que haya un pobre separación de proteínas pero permita obtener unas bandas delgadas, claras y definidas. El gel de separación también llamado de resolución es de naturaleza básica pH 8.8, y tiene más concentración de acrilamida haciendo que los poros del gel sean más pequeños, es así que las proteínas se separan mejor por su tamaño en este gel, las proteínas pequeñas se desplazan más fácil y por lo tanto más rápido que las proteínas de mayor peso.

Las proteínas que son sembradas en el gel tienen una carga negativa, al ser desnaturada por calor, y ellas migraran hacia el electrodo positivo cuando un voltaje es aplicado. Este gel se sumerge en buffer de carga dentro de una cámara y todo esto se conecta a una fuente de poder que ayuda y permite que la corrida. En esta parte el voltaje es importante, a más voltaje más rápido es la migración, pero un alto voltaje puede sobrecalentar y distorsionar las bandas.

7.3 Transferencia a la membrana o blotting

Después de la separación de las proteínas, se transfieren a una membrana, esto se realiza usando un campo eléctrico orientado perpendicularmente sobre la superficie del gel, haciendo que migren hacia la membrana. La membrana se coloca entre la superficie del gel y el electrodo positivo. El stack o sándwich incluye una esponja en los extremos y papeles filtro para proteger el gel y la membrana. Se puede hacer en dos condiciones semisecas o húmedas con un buffer de transferencia. Las condiciones húmedas suelen ser más fiables, ya que es menos probable que se seque el gel, y se prefiere para las proteínas más grandes.

7.4 Lavado y bloqueo

Después de la transferencia es importante lavar la membrana, generalmente se hace con buffer fosfato salino, para eliminar el remanente de buffer de transferencia, posteriormente también se tiene que lavar la membrana entre cada paso. El bloqueo es muy importante porque evita que los anticuerpos se unan a la membrana de forma no específica, esto se hace generalmente con leche diluida con TBST.

7.5 Adición de anticuerpos

Los anticuerpos se agregan a la membrana después de ser bloqueada, la concentración de estos varía según el fabricante, y estos se diluyen por lo general en TBST. Se deja en incubación en agitación por 8 horas u “overnight”. Es importante lavar después de esta etapa para remover los anticuerpos que no se unieron, así se minimiza el background. Se le agrega después un anticuerpo secundario con afinidad al anticuerpo primario, este anticuerpo secundario está marcado con una enzima general mente peroxidasa.

7.6 Detección

En el último paso se le agrega el sustrato a la peroxidasa unido a un compuesto luminiscente que después es medido en un software. Es muy importante tener en cuenta que los datos producidos con una transferencia western se considera típicamente semicuantitativa. Esto se debe a que proporciona una comparación relativa de los niveles de proteína, pero no una medida absoluta de la cantidad. Hay dos razones para esto; En primer lugar, hay variaciones en las velocidades de carga y transferencia entre las muestras en carriles separados que son diferentes en transferencias separadas. Estas diferencias habrán de estandarizarse

antes de poder hacer una comparación más precisa. En segundo lugar, la señal generada por la detección no es lineal a través del intervalo de concentración de las muestras. Por lo tanto, dado que la señal producida no es lineal, no debe usarse para modelar la concentración. (52).

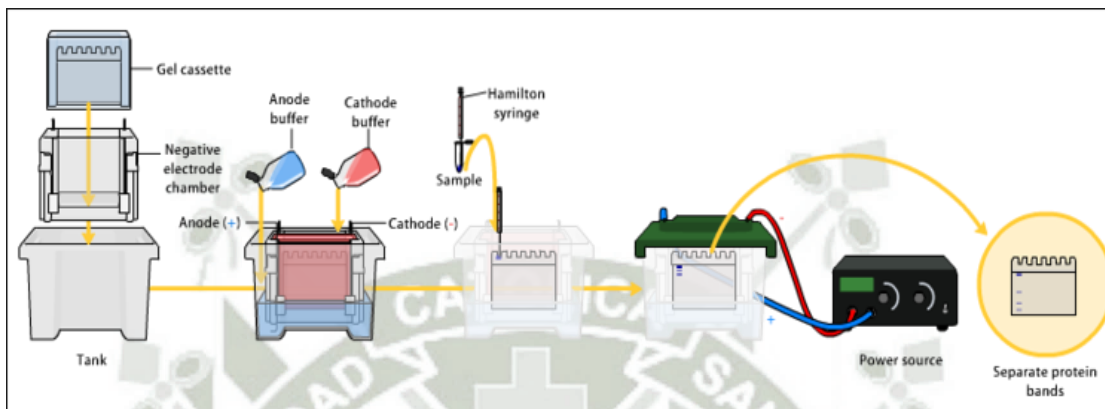


Figura I.13 Etapas que comprenden la técnica de Western blot.

Fuente: Mahmood T , 2012 (52)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Material biológico

- Células de Glioblastoma humano U87.
- Anticuerpo anti PARP-1. Abcam®
- Anticuerpo anti BCL-2/Bax Abccam®
- Anticuerpo secundario burro/anticabra (Thermo Fisher Scientific®).

1.2 Instrumentos

- Frascos de cultivo de 25 cm², 75 cm² y 125 cm².
- Tubos de centrifuga 25 mL y 50 mL Falcon.
- Plato de cultivo de 96 pocillos Falcon.
- Plato de cultivo blanco de 96 pocillos Falcon.
- Pipeta automática 0.1µL -2µL; 10µL -100µL; 20µL -200µL y 100µL - 1000µL.
- Puntas de pipeta.
- Tubos Eppendorf.
- Raspador de células.
- Pipeta automática multicanal 20 µL- 200 µL.
- Lector de microplatos – pozos (Synergy, serial number 264036).
- Lector de luminiscencia (Synergy, serial number 264036).
- Cámaras de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2).
- Incubadora con fuente de CO₂ (VWR® symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators).

- Microscopio invertido (Olympus®, CKX31).
- Contador celular (Nexelom Bioscience®, Cellometer® Auto T4).
- Centrífuga. (Clay Adams™ DYNAC® III Centrifuge, Model 420104).
- Baño térmico de perlas metálicas (Lab Armor®, Bead Bath™ Model 74300-706).
- Fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad®, PowerPac™ HC High-Current Power Supply).
- Cámara de electroforesis (Bio-Rad®, Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell)
- Sistema de transferencia (Bio-Rad® Trans-Blot®, Turbo™ transfer system).
- Scanner de lectura blots para medición de densitometría (Scanner C-DiGit, LI-COR).
- Refrigerador a -20 C.
- Refrigerador a -80 C.
- Agitador Vórtex (Fisher Vortex).
- Termómetro metálico.
- Sonificador (Thermo Scientific).
- Herramienta para análisis estadístico Graphpad.
- Programa de determinación de sinergismo Compusyn.

1.3 Materiales y reactivos

- Minimun Essential Media (Thermo Fisher Scientific®).
- Suero Fetal Bovino (ATCC®).
- Anandamida (Tocris Bioscience®).
- 2- araquinodilglicerol (Tocris Bioscience®).
- Penicilina/estreptomicina 10.000 U.I./10 mg por ml
- Azul de Tripán 0.4% (Sigma-Aldrich®, T8154).
- MTS (CellTiter 96®)
- Alcohol absoluto. (ATCC®).
- Dimetil sulfóxido, DMSO (Sigma-Aldrich®).
- Buffer Fosfato Salino, PBS (Sigma-Aldrich®).
- Solución de Tripsina al 0.25% en EDTA (ATCC®)
- Buffer M-PER (Thermo Fisher Scientific®)
- Buffer de lavado TBS-Tween 20X (Thermo Fisher Scientific®).
- Buffer de transferencia (Thermo Fisher Scientific®).
- Buffer tris-glicina SDS 10X (Thermo Fisher Scientific®).
- Gel de tris glicina 10% (Thermo Scientific®)
- Marcador de peso proteico ladder (PageRuler™ Thermo Fisher Scientific®).
- Leche en polvo sin calorías (Boston BioProducts®).
- Membrana de nitrocelulosa (Thermo Fisher Scientific®).
- Kit de Medición de proteínas BCA(Thermo Scientific®).
- Papel filtro de Western-Blot (Thermo Fisher Scientific®).
- Sustrato quimioluminiscente (Thermo Scientific®).
- JZL-184 (Tocris Bioscience®).
- JZL-195 (Tocris Bioscience®).
- OL-135 (Sigma-Aldrich®, SML0933).
- Kit de luminiscencia para caspasas 3 y 7 (Promega®, Caspase-Glo® assay, G8090).

- Kit de luminiscencia para caspasa 8 (Promega®, Caspase-Glo® assay, G8200).

1.4 Lugar de investigación

La investigación se realizó en los laboratorios de post-grado del área de Farmacología, Escuela de Farmacia de la Universidad de Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, Boston- Estados Unidos y la Universidad Católica Santa Maria.

2. Metodología

2.1 Cultivo celular

Para el cultivo celular, primero se preparó el medio completo, en la cámara de flujo laminar, para esto se utilizó un botella de 500 mL de medio MEM a la que se añadió 50 mL de Suero Bovino Fetal como fuente de nutrientes (10%) y 5 mL de la solución de Penicilina/Estreptomina (1%), para evitar la contaminación de las células.

Luego de esto, se preparó el medio incompleto, que se compone de 500 mL de medio MEM y 5mL de solución de Penicilina/Estreptomina (1%).

Una vez obtenidos los medios, se procedió a hacer el pasaje de células; en la cámara de flujo laminar se destapó el frasco de cultivo de 75 cm² que contenía las células, se procedió a extraer el medio del frasco de cultivo y a enjuagar con Buffer Fosfato salino (PBS), luego se agregó 3 mL de solución de tripsina-EDTA al 0.25% y se dejó en la incubadora por 5 minutos, una vez que la capa de células adheridas al frasco de cultivo, se despegan por causa de la tripsina agregada, se agregó 15 mL de medio incompleto, se mezcló la solución con una la ayuda de una pipeta y se pasó esta mezcla a un tubo, se llevó a centrifugación por 5 minutos a 1000 rpm.

Luego de este tiempo, se decanta el sobrenadante sin remover el pellet. Se agregó 15 mL de medio completo MEM y se repartió 5 mL en cada frasco de cultivo, llevándolos a incubación por 72 horas, que era el tiempo en el que la línea celular U87 consigue la confluencia óptima.

2.2 Tratamiento con aea y 2-ag

Para el tratamiento con AEA y 2-AG se usaron soluciones con las siguientes concentraciones: 30 μM , 10 μM , 3 μM , 1 μM y 0.3 μM . Se prepararon soluciones de trabajo con concentraciones 200 veces mayores a las deseadas, 6000 μM , 2000 μM , 600 μM , 200 μM y 60 μM .

ANANDAMIDA

I. Preparación de Soluciones de trabajo (concentración 200 veces mayor a la deseada) (Tabla II.1)

Solución stock: Anandamida (5mg) pre disuelta en 1 mL de etanol (99.9%) se obtiene una concentración de 14,30 mM.

1. Para preparar la primera dilución de 6000 μM , se tomó 83.39 μL de la solución stock y se diluyó con etanol hasta 200 μL .
De esta dilución se tomó 20 μL y se diluyó con etanol hasta 200 μL obteniéndose una solución de 600 μM .
Para preparar la solución de 60 μM , se tomó 20 μL de la solución de 600 μM y se diluyó con etanol (99.9%) hasta 200 μL .
2. Para preparar la dilución de 2000 μM , se tomó 27.79 μL de la solución stock y se diluyó con etanol (99.9%) hasta 200 μL .
De esta dilución se tomó 20 μL y se diluyó con etanol (99.9%) hasta 200 μL obteniéndose una solución de 200 μM .

- II. Se tomó 25 μL de cada solución de trabajo y se diluyeron hasta 5 mL de Medio incompleto(FSM), obteniéndose las soluciones para el tratamiento.

Tabla II.1: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).

Soluciones de trabajo (μM)	6000	2000	600	200	60
Soluciones para tratamiento (μM)	30	10	3	1	0.3

Fuente: Elaboración propia.

- III. Para la preparación de solución vehículo, se tomó 25 μL de etanol (99.9%) y se diluyó con FSM hasta 5 mL.

Luego de incubar las células por 24 horas, se retiró el medio completo y se agregó 200 μL de las soluciones preparadas de acuerdo a la Tabla II.2

:

Tabla II.2 Esquema de tratamiento para células U87 con AEA.

Blanc o	Vehícu l	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto. 4	Tto. 5
FSM	Sol. Vehículo	sol. 0.3 μM	sol. 1 μM	sol. 3 μM	sol. 10 μM	sol. 30 μM

Fuente: Elaboración propia.

IV. Después de incubar las células con tratamiento por 24 horas, se preparó una solución de MTS y FSM (10 μL en cada 200 μL de solución).

Se retiró el tratamiento y se colocó 200 μL de la solución de MTS en cada pocillo o pocillo, excepto en la columna BLANCO, se incubó durante 2 horas y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

2- ARAQUIDONIL GLICEROL

I. Preparación de Soluciones de trabajo (concentración 200 veces mayor a la deseada) (Tabla II.3)

Solución stock: 2-AG (10 mg) disuelto en 264.1 μL DMSO se obtiene una concentración de 100 mM.

1. Para preparar la primera dilución de 6000 μM , se tomó 30 μL de la solución stock y se diluyó con DMSO hasta 500 μL .

De esta dilución se tomó 50 μL y se diluyó con DMSO hasta 500 μL obteniéndose una solución de 600 μM .

Para preparar la solución de 60 μM , se tomó 50 μL de la solución de 600 μM y se diluyó con DMSO hasta 500 μL .

2. Para preparar la dilución de 2000 μM , se tomó 10 μL de la solución stock y se diluyó con DMSO hasta 500 μL .
De esta dilución se tomó 20 μL y se diluyó con DMSO hasta 200 μL obteniéndose una solución de 200 μM .
3. Se tomó 25 μL de cada solución de trabajo y se diluyeron hasta 5 mL de Medio incompleto(FSM), obteniéndose las soluciones para el tratamiento.

Tabla II.3: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).

Soluciones de trabajo (μM)	de	6000	2000	600	200	60
Soluciones para tratamiento (μM)	para	30	10	3	1	0.3

Fuente: Elaboración propia.

4. Para la preparación de solución vehículo, se tomó 25 μL de etanol (99.9%) y se diluyó con FSM hasta 5 mL.

Luego de incubar las células por 24 horas, se retiró el Complete media y se agregó 200 μL de las soluciones preparadas de acuerdo a la Tabla II.4:

Tabla II.4 Esquema de tratamiento para células U87.

Blanco	Vehículo	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto. 4	Tto. 5
FSM	Sol. Vehículo	sol. 0.3 μM	sol. 1 μM	sol. 3 μM	sol. 10 μM	sol. 30 μM

Fuente: Elaboración propia.

5. Después de incubar las células con tratamiento por 24 horas, se preparó una solución de MTS y FSM (10 μL en cada 200 μL de solución).

Se retiró el tratamiento y se colocó 200 μL de la solución de MTS en cada pocillo, excepto en la columna BLANCO, se incubó durante 2 horas y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

2.3 Tratamiento CON JZL-184, OL-135 y JZL-195

Se prepararon soluciones de trabajo con concentraciones 200 veces mayores a las deseadas, de la misma forma que se preparó para la Anandamida y el 2-Araquinodilglicerol.

JZL-184

I. Preparación de Soluciones de trabajo (Tabla II.5)

Solución stock de 2-AG (10 mg) disuelto en 264.1 μL de DMSO se obtiene una concentración de 100 mM.

Solución stock de JZL-184 (10 mg) disuelto en 192 μL de DMSO se obtiene una concentración de 100 mM.

1. Se preparó la solución de trabajo de JZL-184 con una concentración de 60 μM , 200 μM , 600 μM y 2000 μM , siguiendo la preparación de las drogas anteriores.
 2. Se preparó la solución de trabajo de 2-AG a 4×10^4 μM .
- II. Se tomó 25 μL de cada solución de trabajo y se diluyeron hasta 5 mL de Medo incompleto(FSM), obteniéndose las soluciones para el tratamiento con JZL-184. De la misma manera se trabajó la solución de trabajo de 2-AG, llegando a una concentración de 200 μM .

Tabla II.5: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).

Soluciones de trabajo (μM)	2000	600	200	60
Soluciones para tratamiento (μM)	10	3	1	0.3

Fuente: Elaboración propia

- III. Para la preparación de solución vehículo, se tomó 25 μL de DMSO y se diluyó con FSM hasta 5 mL. (Tabla II.6)
- IV. Luego de incubar las células por 24 horas, se retiró el Complete media y se agregó 180 μL las diferentes concentraciones de JZL-184 (Tabla II.6).
- V. Se dejó incubar por 30 minutos, después de esto se agregó 20 μL de la solución de 2-AG.

Tabla II.6 Esquema de tratamiento para células U87 con JZL-184 y 2-AG.

Blanco	Vehículo	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto. 4	Tto. 5	Tto. 6
FSM	Sol. Vehículo	Sol. 10 μM 2-AG	Sol. 10 μM de JZL-184	sol. 0.3 μM JZL-184 y sol. 10 μM 2-AG	sol. 1 μM JZL-184 y sol. 10 μM 2-AG	sol. 3 μM JZL-184 y sol. 10 μM 2-AG	sol. 10 μM JZL-184 y sol. 10 μM 2-AG

Fuente: Elaboración propia.

VI. Después de incubar las células con tratamiento por 24 horas, se preparó una solución de MTS y FSM (10 μ L en cada 200 μ L de solución).

Se retiró el tratamiento y se colocó 200 μ L de la solución de MTS en cada pocillo, excepto en la columna BLANCO, se incubó durante 2 horas y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

OL-135

I. Preparación de Soluciones de trabajo (Tabla II.7)

Solución stock: Anandamida (5mg) pre disuelta en 1 mL de etanol (99.9%) se obtiene una concentración de 14,30 mM.

Solución stock de OL-135 (5 mg) disuelto en 1 mL de DMSO se obtiene una concentración de 14.95 mM.

1. Se preparó solución de trabajo de OL-135 con una concentración de 200 μ M, 600 μ M, 2000 μ M y 6000 μ M siguiendo la preparación de las drogas anteriores.
2. Se preparó la solución de trabajo de AEA a 12000 μ M.
3. Se tomó 25 μ L de cada solución de trabajo y se diluyeron hasta 5 mL de Medo incompleto(FSM), obteniéndose las soluciones para el tratamiento. De la misma manera se trabajó la solución de trabajo de AEA llegando a una concentración de 60 μ M.

Tabla II.7: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).

Soluciones de trabajo (μM) de OL-135	6000	2000	600	200
Soluciones para tratamiento (μM) de OL-135	30	10	3	1

Fuente: Elaboración propia.

4. Para la preparación de solución vehículo, se tomó 25 μL de DMSO y se diluyó con FSM hasta 5 mL (Tabla II.8).
5. Luego de incubar las células por 24 horas, se retiró el Complete media y se agregó 180 μL las diferentes concentraciones de OL-135 (Tabla II.8)..
6. Se dejó incubar por 30 minutos, después de esto se agregó 20 μL de la solución de AEA.

Tabla II.8 Esquema de tratamiento para células U87 con OL-135 y AEA.

Blanco	Vehículo	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto. 4	Tto. 5	Tto. 6
FSM	Sol.	Sol. 3	Sol. 30	sol. 1	sol. 3	sol. 10	sol. 30
	Vehículo	μM	μM de	μM OL-	μM OL-	μM OL-	μM OL-
		AEA	OL-135	135 y	135 y	135 y	135 y
				sol. 3	sol. 3	sol. 3	sol. 3
				μM	μM	μM	μM
				AEA	AEA	AEA	AEA

Fuente: Elaboración propia.

7. Después de incubar las células con tratamiento por 24 horas, se preparó una solución de MTS y FSM (10 μ L en cada 200 μ L de solución).

Se retiró el tratamiento y se colocó 200 μ L de la solución de MTS en cada pocillo, excepto en la columna BLANCO, se incubó durante 2 horas y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

JZL-195

- I. Preparación de Soluciones de trabajo (Tabla II.9)

Solución stock: Anandamida (5mg) pre disuelta en 1 mL de etanol se obtiene una concentración de 14,30 mM.

Solución stock de 2-AG (10 mg) disuelto en 264.1 μ L de DMSO se obtiene una concentración de 100 mM.

Solución stock de JZL-195 (10 mg) disuelto en 461 μ L de DMSO se obtiene una concentración de 50 mM.

1. Se preparó solución de trabajo de JZL-195 con una concentración de 60 μ M, 200 μ M, 600 μ M y 2000 μ M, siguiendo la preparación de las drogas anteriores.
 2. Se preparó la solución de trabajo de AEA junto con 2-AG a 4×10^4 μ M y 1.2×10^5 respectivamente.
- II. Se tomó 25 μ L de cada solución de trabajo y se diluyeron hasta 5 mL de Medo incompleto(FSM), obteniéndose las soluciones para el tratamiento con JZL-184. De la misma manera se trabajó la solución de trabajo de AEA junto con 2-AG, llegando a una concentración de 2000 μ M y 6000 μ M.

Tabla II.9: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).

Soluciones de trabajo (μM) de OL-135	2000	600	200	60
Soluciones para tratamiento (μM) de OL-135	10	3	1	0.3

Fuente: Elaboración propia

- III. Para la preparación de solución vehículo, se tomó 25 μL de DMSO y se diluyó con FSM hasta 5 mL (Tabla II.10).
- IV. Luego de incubar las células por 24 horas, se retiró el Complete media y se agregó 180 μL las diferentes concentraciones de JZL-195 (Tabla II.10).
- V. Se dejó incubar por 30 minutos, después de esto se agregó 20 μL de la solución de AEA y 2-AG juntas.

Tabla II.11 Esquema de tratamiento para células U87 con JZL-195, AEA y 2-AG.

Blanco	Vehículo	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto. 4	Tto. 5	Tto. 6	Tto. 7
FSM	Sol. Vehículo	Sol. 10 μM AEA	Sol. 30 μM de 2- AG	Sol. 10 μM de JZL- 195	sol. 0.3 μM JZL- 195 y sol. 10 μM AEA y 30 μM 2-AG	sol. 1 μM JZL- 195 y sol. 10 μM AEA y 30 μM 2-AG	sol. 3 μM JZL- 195 y sol. 10 μM AEA y 30 μM 2- AG	sol. 10 μM JZL- 195 y sol. 10 μM AEA y 30 μM 2-AG

Fuente: Elaboración propia.

VI. Después de incubar las células con tratamiento por 24 horas, se preparó una solución de MTS y FSM (10 μ L en cada 200 μ L de solución).

Se retiró el tratamiento y se colocó 200 μ L de la solución de MTS en cada pocillo, excepto en la columna BLANCO, se incubó durante 2 horas y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

2.4 Tratamiento sinergismo AEA y 2-AG

Para el tratamiento con AEA y 2-AG se usaron soluciones con las siguientes concentraciones: 30 μ M, 10 μ M, 3 μ M Y 1 μ M de 2-AG y 10 μ M de AEA. Se prepararon soluciones de trabajo con concentraciones 200 veces mayores a las deseadas, 6000 μ M, 2000 μ M, 600 μ M y 200 μ M de 2-AG y 2000 μ M de AEA.

I. Preparación de Soluciones de trabajo (concentración 200 veces mayor a la deseada) (Tabla II.12).

Solución stock: Anandamida (5mg) pre disuelta en 1 mL de etanol se obtiene una concentración de 14,30 mM.

Solución stock de 2-AG (10 mg) disuelto en 264.1 μ L de DMSO se obtiene una concentración de 100 mM.

1. Se preparó solución de trabajo de AEA con una concentración de 2000 μ M, siguiendo la preparación de las drogas anteriores.

3. Se preparó la solución de trabajo de 2-AG con una concentración de μ M, 200 μ M, 600 μ M, 2000 μ M y 6000 μ M siguiendo la preparación de las drogas anteriores.

II. Se tomó 25 μ L de AEA y 25 μ L de 2-AG de cada solución de trabajo y se diluyeron hasta 5 mL de Medo incompleto(FSM), obteniéndose las soluciones para el tratamiento.

III. Para la preparación de solución vehículo, se tomó 25 μL de etanol y 25 μL de DMSO se diluyó con FSM hasta 5 mL.

Luego de incubar las células por 24 horas, se retiró el Complete media y se agregó 200 μL de las soluciones preparadas de acuerdo a la Tabla II.12.

Tabla II.12: Preparación de soluciones de trabajo (soluciones de trabajo para tratamiento).

Blanco	Vehículo	Tto. 1	Tto. 2	Tto. 3	Tto. 4	Tto. 5	Tto. 6
FSM	Sol. Vehículo	Sol. 10 μM AEA	Sol. 30 μM de 2-AG	sol. 1 μM 2-AG y sol. 10 μM AEA	sol. 3 μM 2-AG y sol. 10 μM AEA	sol. 10 μM 2-AG y sol. 10 μM AEA	sol. 30 μM 2-AG y sol. 10 μM AEA

Fuente: Elaboración propia

IV. Después de incubar las células con tratamiento por 24 horas, se preparó una solución de MTS y FSM (10 μL en cada 200 μL de solución).

Se retiró el tratamiento y se colocó 200 μL de la solución de MTS en cada pocillo, excepto en la columna BLANCO, se incubó durante 2 horas y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

2.5 Determinación de caspasas

Para la medición de la actividad de Caspasas 7/3 y 8, se utilizaron platos de 96 pozos, cada pozo tenía la capacidad volumétrica de 200 μ L.

Se utilizó el kit de luminiscencia para medir la actividad de caspasas 7/3 y 8, en el que vienen incluidos 2.5 mL de Buffer y 1 botella de substrato liofilizado, éste último es mezclado con el buffer para conseguir la solución de medición de caspasas, es necesario que esto se realice a temperatura ambiente y que la agitación se suave.

Se realizaron dos repeticiones para este ensayo siguiendo el esquema de la Tabla II.13.

Tabla II.13 Esquema de trabajo para medición de actividad de caspasas.

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Blanco	Control positivo	Control negativo	Tratamiento con AEA	Tratamiento con 2-ag
Sin células	Células	Células	Células	Células
5 μ L DE DMSO hasta 1 mL de medio incompleto	100 μ L Staurosporina	5 μ L DE DMSO hasta 1 mL de medio incompleto	Anandamida 10 μ M	2-AG 30 μ M

Fuente: Elaboración propia.

Se usaron las 5 primeras columnas del plato, haciendo 2 repeticiones por cada pozo, en primero se dejó en blanco y se sembraron células en los 4 restantes con medio completo MEM, se dejó incubar por 24 horas; pasado este tiempo, se retiró el medio completo y se procedió a agregar 100 μ L de Anandamida de 10 μ M, en la columna 4; y 100 μ L de 2-AG de 30 μ M, en la columna 5.

Para el blanco y el control negativo, se preparó una solución que con 5 μL de DMSO que se completó con medio incompleto hasta 1 mL. Una vez preparada la solución, se colocó 100 μL en la columna 1 y 3.

Para el control positivo, se preparó una solución de Staurosporina, un potente activador de caspasas, a una concentración de 100 nM de Staurosporina. Esta solución se preparó también con medio incompleto. Obtenida la dilución se procedió a colocar 100 μL en la segunda columna.

Una vez realizado este procedimiento, se colocó el plato a la incubadora por 3 horas.

Se agregó en cada pozo, 100 μL de la solución de caspasas, se cubrió con aluminio, ya que esta es una técnica de luminiscencia y se llevó a un plato mezclador por 30 segundos a temperatura ambiente.

Luego de este tiempo, se lleva a incubación por 1 hora y se procede a leer en el Plate Reader, configurado para la medición de luminiscencia.

Después de esta medición, se procederá a hacer una segunda lectura pasadas 3 horas.

2.6 Lisis celular

La lisis celular se hizo en las células tratadas con AEA y 2-AG, además también se consideró un blanco, como células sin tratar. Estas células tenían que pasar por el mismo procedimiento que se usó para la viabilidad celular de células tratadas con AEA y 2-AG.

Pasado el tiempo de incubación, se procedió a retirar el medio de cada frasco de cultivo, y se enjuagó con 1 mL de PBS frío en un baño de hielo. Luego de

descartar el PBS, se procedió a agregar 1 mL de solución de PBS y buffer de lisis (5 mL de M-PER + 50 uL de cocktail + 50 uL de EDTA 0.5M) , se utilizó una escobilla para raspar la superficie y despegar la capa celular del envase. Posteriormente, se colocó el contenido en un tubo eppendorff y se sonicó por 3 veces cada vez por 5 minutos con descansos de 5 minutos. Después se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, después de este tiempo se extrajo el sobrenadante y se guardó a -80°C , para los experimentos posteriores.

2.7 Cuantificación de proteínas por bca

Para la realización de la cuantificación proteica se utilizó el Kit Pierce BCA Protein, que contenía dos reactivos, A y B; el primero constaba de carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinonónico y tartrato de sodio a 0.1 M con hidróxido de sodio. El reactivo B constaba de sulfato cúprico al 4%, que actuaba como cromóforo. Además, también se contaba con ampollas que contenían Albúmina de suero bovino (BSA) a 2 mg/mL en 0.9% de medio salino.

Este método de cuantificación de proteínas está basado en la reacción biuret, que consta en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por una proteína en un medio alcalino. El color púrpura producido en este ensayo se forma por la quelación del ácido bicinonónico y Cu^{+1} .

Se prepararon estándares con diluciones de BSA a concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tubos con PBS en una relación 1:1.

Se preparó el reactivo para la cuantificación de proteínas mezclando los reactivos A y B a razón de 50:1.

En un plato de 96 pocillos, se agregó 20 μL de las soluciones a diferentes concentraciones de BCA con PBS 1:1 y 180 uL del reactivo mezclado A y B.

Se dejó en agitación por 30 minutos a 37 °C y se leyó en el Lector de platos o Lector de platos o Plate reader a 562 nm, dibujándose una línea de tendencia. Para cuantificar la cantidad de células que tenían nuestra muestra se usó el producto del procedimiento de lisis explicado previamente que se guardó a -80 °C. Se diluyó 1:10 con PBS y de esta dilución se agregó a los pozos 20 uL y se completó con el reactivo A y B hasta 200 uL. Tuvieron el mismo procedimiento que los estándares de albumina.

2.8 Western blot

Una vez obtenida la concentración proteica de las células tratadas, se procedió a colocar 5 µL de cada lisado en tubos con 5 µL de Buffer reductor y 9.5 µL de Buffer M-PER (Mammalian Protein Extration Reagent). Se llevó a una cocción a 95°C por 5 minutos.

Luego de este tiempo, se armó el equipo de electroforesis y se colocó el de poliacrilamida; se llenó el contenedor con buffer de corrida, se colocó 5 µL de cada mezcla obtenida anteriormente en los pocillos de los geles y también 5 µL de un marcador de peso en un pocillo adicional para poder obtener una ubicación adecuada de la mancha obtenida. La electroforesis se llevó a cabo por 45 minutos a 150 voltios.

Mientras la electroforesis se llevaba a cabo, se procedió a preparar las membranas de nitrocelulosa que se dejaron remojar en una de buffer de transferencia.

Una vez terminada la electroforesis se removieron los geles de poliacrilamida y procedió a realizar la transferencia de las manchas a las membranas de la nitrocelulosa. Esto se hizo en el equipo de transferencia por 45 minutos a 14 voltios.

Terminado este proceso, se realizó el bloqueo de las dos membranas con una mezcla de buffer de lavado y leche en polvo por una hora, después se agregó enjuagaron las membranas tres veces con buffer de lavado.

Se disolvieron 2 μ L de Anticuerpo anti-PARP1 en 20 mL de buffer de bloqueo y se disolvieron 2 μ L de anticuerpo anti-BCL2 en 20 mL de buffer de bloqueo.

Cada una de las soluciones con anticuerpo se agregaron a cada una de las membranas y se dejaron incubando durante 12 horas, en constante agitación, a 4°C. Luego de este tiempo, las membranas fueron lavadas 3 veces con buffer de lavado y se agregó una mezcla de 5 μ L de anticuerpo secundario con 10 mL de buffer de bloqueo. Se incubaron las membranas con agitación por una hora, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se enjuagaron las membranas 3 veces, se utilizó un lápiz marcador quimioluminiscente para señalar, en la columna del marcador de peso agregado, en lugar donde aparecerían las manchas de PARP-1 y BCL-2, se agregó 4 mL de reactivo quimioluminiscente y se esperó 5 minutos.

Esto resultó en una señal medible, obtenida de la reacción del reactivo y el anticuerpo secundario.

Estas membranas se llevaron a la lectura en el Scanner C-DiGit para su cuantificación densitométrica.

2.9 Análisis estadístico de resultados

Los resultados obtenidos fueron organizados en Microsoft Excel y posteriormente se pasaron al instrumento de análisis estadístico GraphPad, en este programa se realizó un análisis de varianza de un camino, ANOVA con un valor de P menor a 0.0001. Además se realizó el test de Dunnett en el que quiso determinar la existencia de una diferencia significativa con el grupo control de células tratadas con vehículo, a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

2.10 Análisis de sinergismo en combinación de drogas

Para el análisis de sinergismo existente en la combinación de AEA y 2-AG, los datos obtenidos se pasaron al programa Compusyn, en el cual, se colocaron bloques de resultados de la viabilidad celular con tratamiento, a diferentes concentraciones de AEA y 2-AG por separado; y también bloques de la viabilidad celular obtenida del tratamiento de la combinación de ambos endocannabinoides para la obtención de isobogramas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cultivo de células

La línea celular U87 demostró un buen desarrollo en el procedimiento de cultivo celular en esta investigación. El medio MEM con ayuda del suero bovino fetal y penicilina/streptomicina ayudo a que las células crezcan bien, sin contaminación y con una gran rapidez, este protocolo fue desarrollado por Evonne Leeper Thompson en el año 2009 (54).

La confluencia celular se alcanzaba a los 2 días del pasaje, dependiendo la cantidad inicial de células, por lo general el pasaje comenzaba con 10^6 de células con medio suficiente para que crezcan. En los primeros pasajes para desarrollar la actividad hacia las drogas y medir la viabilidad se usaron frasco de cultivos de 25 cm^3 , 75 cm^3 y 150 cm^3 . Los pasajes se hacían cuando había más del 90% de viabilidad celular, el cual se hacía por medio de la coloración de azul de tripán (56).

La mayoría de trabajos de investigación que se leyeron previamente para trabajar con estas células refería el uso del medio de cultivo EMEM, con el cual se llegaba a una confluencia de más del 90% en 72 horas (67), por esta razón nosotros elegimos el medio MEM, porque nos acorta el tiempo en el que nuestras células llegan a más de 90% de confluencia hasta 24 horas (dependiendo del tamaño del frasco de cultivo y de cuantas células se trabajaron desde el pasaje). Con este medio se nos fue permitido trabajar más experimentos y tener varios pasajes para trabajar, ya sea en los pozos o en los frascos de cultivos. Además el medio nos daba información de cuando estaban las células ya listas, por el cambio de color debido al rojo de fenol, rojo a anaranjado o amarillo en casos particulares. Con esta información se comenzó a perfeccionar exactamente cuántas

células se necesitaban en el siguiente pasaje para que al pasar 24 horas se encuentren listas para trabajar.

Se trabajó con varias dimensiones de frasco de cultivos como se mencionó antes, en el cultivo celular los frasco de cultivos deben estar echados y al estar echados el medio que se encuentre dentro no debe llegar a tener contacto con la tapa del frasco de cultivo, porque estaba tapa tiene pequeños orificios con un filtro que permiten que el CO₂ entre al frasco de cultivo, al mojarse el filtro hay un gran riesgo de que se contamine el medio **(68)**. Para que no ocurra este tipo de contaminación y además para que las células estén con suficiente medio para crecer se usó la quinta parte de volumen de cada frasco de cultivos, por ejemplo el de 25 cm³ usa 5 cm³ de medio conteniendo las células. Por otro lado, en los pozos solo se usó los pozos de 96, en los cuales se colocó siempre 200 µL de medio con células, es el volumen máximo el cual soporta los pozos, usamos este para no tener inconvenientes posteriores al hacer la soluciones de trabajo, sabiendo que son proporciones pequeñas de drogas.

Se preparó dos tipos de medios teniendo en base el medio MEM, el medio completo al que se le agrego suero bovino fetal y 100 unidades/ml de penicilina +100 µg/ml de estreptomina; y el medio incompleto el cual tiene 100 unidades/ml de penicilina +100 µg/ml de estreptomina y no tiene suero bovino fetal **(54)**. Estos dos antibióticos proporcionaron la defensa suficiente para nuestras células, en ningún momento del experimento se nos contamina las células con algún microorganismo, a pesar de que estas células son bien vulnerables y sensibles, sabiendo también que para células secundarias no se necesitan tanta antibióticos o antifúngicos.

El medio incompleto se usó cuando se aplicaba algún tipo de tratamiento a las células y cuando para neutralizar la tripsina en el momento de hacer pasajes celulares. Es importante esto porque se ha reportado que el suero bovino fetal interfiere con varias pruebas de proteínas que se hacen posteriormente a la células como los westernblot **(69)**, teniendo otras bandas que interfieren o falsos resultados en pruebas de ELISA. Otro punto que se

tuvo que se mencionó antes pero poco, es que las células son sensibles, por ser gliomas, el trabajo tiene que ser más minucioso y tener cuidado con el tiempo de exposición de estas a diferentes agentes en los procesos de cultivo celular como cuando se lava con buffer fosfato salino o en la tripsinización, en este último se debe tener cuidado ya que la mayoría de protocolos de cultivo celular mencionan que se deja 10 minutos para que las células se despeguen (70), si dejamos este tiempo a las células U87 se van a morir, por esta razón se tiene que poner mucha atención a las células cuando se coloca en la incubadora, aproximadamente a los 2 minutos ya se habían despegado al 100% las células, si no ocurría esto al mirarlas al microscopio lo que hacía falta era agitarlas uniformemente por 10 a 15 segundos unos 3 ciclos.

En la Figura III.1, Se aprecia el desarrollo de las células U87 aproximadamente al 50% de confluencia Se puede ver la diferencia entre las células que recién ha sido pasada y las que están confluentes por la aparición de formas dendríticas.

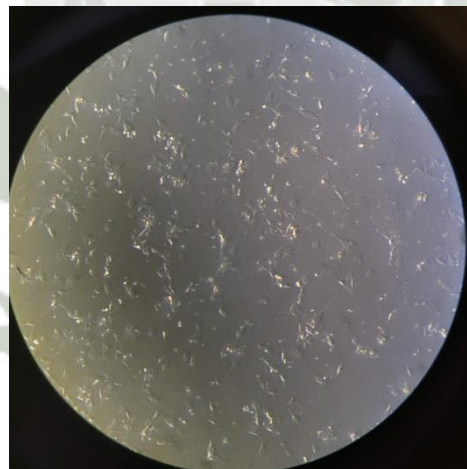


Figura III.1. Células U87 vistas en microscopio invertido. 1. 0 horas de incubación a 100x, 2. 24 horas de incubación aproximadamente 50% de confluencia 3. 48 h de incubación confluyente.

Fuente: Elaboración propia.

2. Elección de cantidad óptima celular

Para saber la cantidad apropiada de células por pozo necesarias para las pruebas posteriores de viabilidad se realizó una curva, empleando el método de MTS (55). Ésta se hizo con cantidades de células por pozo ascendentes: 5000, 10000, 15000, 20000 y 25000. La absorbancia de la coloración producida por el formazán se midió en el lector de platos, por triplicado y en plato de 96 pozos, con 200 μ L de medio MEM libre de suero bovino fetal (incluyendo las células en ese volumen). (Anexo 1,2 y 3). Con estos resultados se elaboró la Tabla III.1 y las Figura III. 2. Se eligió que la concentración adecuada de células por pozo es de 10000.

El porcentaje de viabilidad que se usó desde este experimento para los posteriores que se hicieron fue 90% a más, con esto se busca una buena reproducibilidad y consistencia en los resultados obtenidos.

Se eligió una concentración óptima de células para tener un parámetro bien definido para los experimentos y además un punto importante fue que también hay una saturación del reactivo MTS, lo que nos daría resultados falsos, esto se debe a que cuando hay mucha concentración de células la curva se vuelve plana y constante, entonces si estamos trabajando en esas concentraciones los resultados no tendrían mucha diferencia entre ellos. Con las curvas obtenidas se puede notar que tienden a volverse planas, llegando a la saturación con más de 15000 células, por esta razón es que se escogió la concentración de 10000 células como la concentración óptima y con la que se trabajó los experimentos posteriores.

La absorbancia que óptima para el reactivo MTS debe ser 0.2 hasta 1.8, con esta concentración de células óptima que se obtuvo se puede cumplir con este parámetro, por esta razón es también que se escogió 10000 células, no se acerca al punto de saturación y tampoco está muy abajo generando absorbancias bajas.

Otro parámetro importante relacionado a la viabilidad celular medido con el reactivo MTS, es el tiempo el cual también influye en la absorbancia, según el protocolo del reactivo MTS, las células deben estar en incubación entre 1 hora y 30 minutos hasta 3 horas. Para trabajar dentro de las absorbancias óptimas el ensayo de MTS se dejó incubar 2 horas y este fue un parámetro que se usó en todos los experimentos posteriores.

En el cuadro se mostró el dato de desviación estándar, para comprobar que el trabajo manual y mecánico, sabiendo que se trata de un organismo vivo el porcentaje de desviación estándar es tolerante.

Según estos datos se eligió la concentración de 10000 células por pozo como la más adecuada para los ensayos de viabilidad.

Tabla III.1. Promedio de absorbancia. Desviación estándar y porcentaje de desviación estándar.

Fuente: Elaboración propia.

Condensado del triplicado prueba MTS a diferentes concentraciones de células

Número de células por pozo	Promedio de absorbancias	D.S	% D.S
5000	1.01268	0.07806	7.70835
10000	1.32890	0.03111	2.34107
15000	1.55394	0.05944	3.82517
20000	1.63819	0.07088	4.32657
25000	1.66561	0.05758	3.45685

Fuente: Elaboración propia

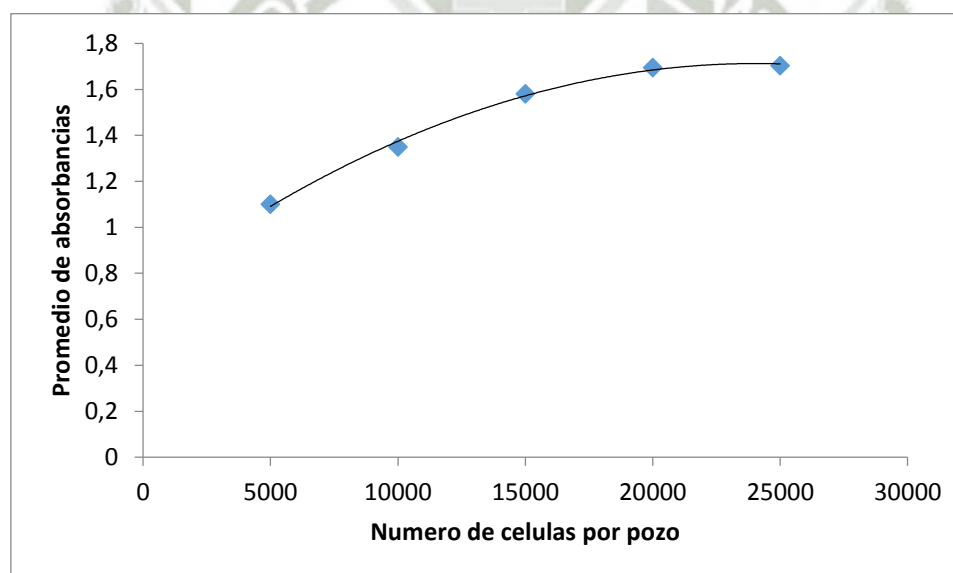


Figura III.2. Curva de dispersión número de células por pozo y promedio del triplicado.

Fuente: Elaboración propia.

3. Tratamiento con Anandamida

Al trabajar con esta droga, se tomó en cuenta que a diferencias de las drogas que más adelante se iba va a utilizar esta se disuelve en etanol 5 mg/mL, según el protocolo de la marca Tocris (57). El etanol ha sido demostrado con efectos tóxicos en cultivos celulares con concentraciones mayores al 10% en células en general (58), al utilizar glioblastomas la sensibilidad de estas células a las drogas es un poco más elevado además estas células son más delicadas (59). Utilizamos una concentración de alcohol final de 0.5% disuelto en el medio.

Las concentraciones que se trabajaron fueron 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M y 30 μ M, existe antecedentes en otras líneas celulares que en concentraciones similares obtienen buenos resultados (60), Se midieron las absorbancias del ensayo de viabilidad de MTS después de 24 horas de incubación.

Las soluciones de trabajo se prepararon de una forma especial, cada concentración que se usó como tratamiento tenía una solución madre 200 veces más, por ejemplo 1 μ M tenía una solución madre de 200 μ M, con esto asegurábamos que las diluciones sean el mismo volumen de soluto y de solvente, para que el % de alcohol no varié. Además para que las soluciones madre estén con la misma cantidad de alcohol se preparaban a partir de la solución madre mayor a esta, por ejemplo la concentración de 30 μ M tiene una madre de concentración 6000 μ M, a partir de esta madre sacamos la madre a una concentración de 600 μ M para la concentración de 3 μ M.

La viabilidad se midió con el ensayo de MTS por cuadruplicado, en cada repetición se sembró 5 veces la misma concentración de células y se le puso tratamiento, para corroborar que el trabajo manual y mecánico se realice de la forma correcta. Los datos que se obtuvieron

del Lector de platos o Plate reader por cada repetición, se observan se observan en el Anexo 4.

Los controles que se utilizaron fueron dos , un vehículo, el cual llevaba células, medio incompleto y MTS sin ninguna droga para nosotros representa el 100 % de viabilidad y nuestra referencia ; y un blanco el cual consistía en medio y MTS sin droga y tampoco células con esto se comprueba que los demás pozos con tratamiento este correctamente trabajados, si alguna absorbancia del tratamiento es semejante a la del blanco esto quiere decir que algún momento del experimento las células se han perdido como por ejemplo al retirar el medio completo para colocar el medio incompleto con tratamiento, si el tiempo de incubación previo al tratamiento (24 horas) es insuficiente y las células no logran adherirse, desarrollarse y multiplicarse al retirar el medio también se retira células. Este caso es un problema muy común.

Según Tocris Bioscience®, el proveedor de la Anandamida, esta tiene los valor de K_i 89 y 371 nM en los receptores CB1 y CB2 respectivamente. Los K_i se refieren la afinidad por unión al receptor, es una relación inversa, mientras más alto sea la concentración del K_i menos afinidad por el receptor. Por esta razón se dice que la Anandamida tiene mayor afinidad por los receptores CB1 a diferencias de los CB2. También se mencionó que para el receptor vanilloide-1 el pK_1 es 5.68. Existen dos beneficios principales al usar las medidas de potencia farmacológica pK en lugar de la constante de equilibrio (K). Dado que la potencia farmacológica a menudo oscila en muchos órdenes de magnitud (valores de K de 10^{-10} M a 10^{-3} M), es más fácil presentar y discutir estas diferencias en una forma pK (es decir, los valores varían generalmente de aproximadamente 10 a 3). Más importante aún, desde un punto de vista estadístico, los parámetros de concentración se distribuyen generalmente de manera logarítmica de modo que las desviaciones estándar son simétricas para los valores de pK pero no para los valores de K (72).

El promedio del vehículo se tomó como el 100% de viabilidad y se comparó con las absorbancias de los tratamientos a diferentes concentraciones con Anandamida (Anexo 5). El promedio de las absorbancias de todos los vehículos fue 101.858.

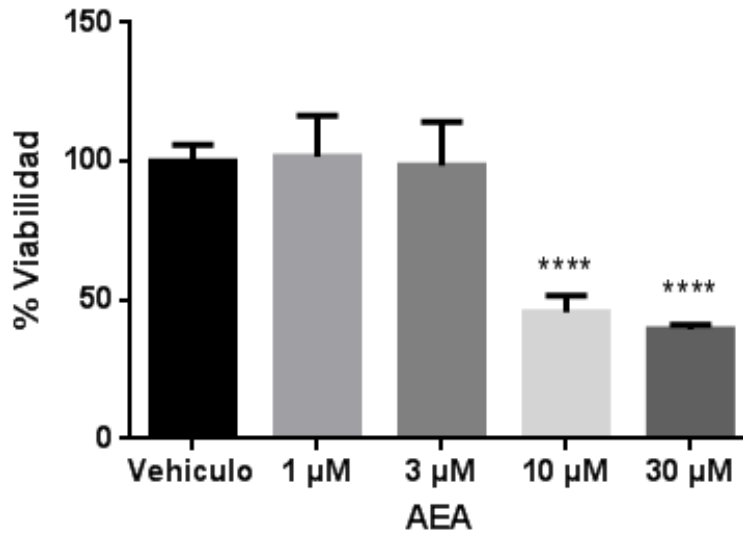
Se analizó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar (Tabla III.2) para poder desarrollar un gráfico donde se demuestre la viabilidad (Figura III.3).

Se realizó un análisis de ANOVA mediante el programa GraphPad, para identificar desde que concentración de Anandamida se logra una diferencia significativa en viabilidad comparándolo con el vehículo (Figura III.4).

Tabla III.2. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas con Anandamida por 24 horas.

Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad		
	Promedio	Desviación estándar
Blanco	100	5.990
1 μ M	101.65	14.823
3 μ M	98.60	15.663
10 μ M	45.70	5.989
30 μ M	39.50	1.624

Fuente: Elaboración propia.



Figura

III.3.

Porcentaje de
viabilidad de

células U87 tratadas con Anandamida a diferentes concentraciones por 24 horas. ****
Diferencia significativa con la barra del vehículo.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	184.9
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.8862

Figura III.4. ANOVA generado por el programa GraphPad del tratamiento de células U87 con Anandamida por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Blanco vs. 1 µM	-1.653	-9.811 to 6.505	No	ns
Blanco vs. 3 µM	1.396	-6.762 to 9.554	No	ns
Blanco vs. 10 µM	54.30	46.14 to 62.46	Yes	****
Blanco vs. 30 µM	60.50	52.34 to 68.66	Yes	****

Figura III.5. Test de Dunnett generado por el programa GraphPad del tratamiento de células U87 con Anandamida por 24 horas, comparando vehículo con las diferentes concentraciones del tratamiento.

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados nos muestran un cambio grande entre las concentraciones 3 μM y 10 μM , A partir del punto de la concentración de 10 μM existe una diferencia significativa según el test de Dunnett (Figura III.5), esto quiere decir, que usando la concentración de 10 μM se logra una inhibición de la proliferación celular, comparando con lo reportado en el tratamiento con Anandamida de cáncer de cérvix ellos también tiene una diferencia significativa a los 10 μM , aunque en ese experimento la concentración de 3 μM ya tiene un poco de diferencia significativa. Esta diferencia puede deberse a que los receptores del sistema cannabinoide no están distribuidos de igual forma por todas las células de nuestro organismo, y tampoco en la misma proporción los receptores CB1 y CB2, también es bueno tener en cuenta que la diferencia entre las funciones células entre gliomas y células del cuello uterino es grande, además hay reportes donde agonizan el sistema cannabinoide a nivel del cerebro para producir protección de las células contra otras enfermedades, por ejemplo epilepsia. Esta es la razón por la cual se quiso saber el comportamiento de este neurotransmisor como tratamiento para el cáncer en gliomas, hasta qué punto es protector o inhiben la proliferación de las células y además si es el mismo mecanismo que usa la Anandamida en otras células de nuestro organismo.

Ya que nuestro objetivo fue inhibir la proliferación, para estudios posteriores de sinergismo para una posible combinación de tratamiento con otras drogas se calculó la Concentración Inhibitoria 50 (IC50). Con los resultados obtenidos previamente con el tratamiento de Anandamida, se usó el programa GraphPad para poder obtener el IC50 experimental para las células U87. (Figura III.6) los datos se convirtieron a logaritmo para obtener el IC 50 (Anexo 6).

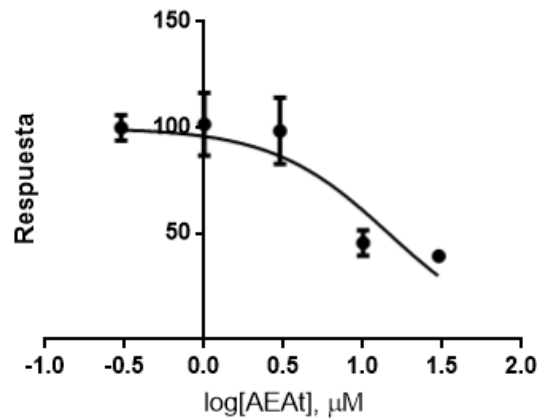


Figura III. 16. Gráfico de dosis vs respuesta. En el eje X la dosis de AEA expresada en logaritmo y en el eje Y la respuesta.

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	1.164
HillSlope	-1.182
IC50	14.58
Std. Error	
LogIC50	0.03525
HillSlope	0.1177
95% Confidence Intervals	
LogIC50	1.094 to 1.234
HillSlope	-1.416 to -0.9480
IC50	12.41 to 17.13
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	98
R square	0.7746
Absolute Sum of Squares	20292
Sy.x	14.39
Number of points	
Analyzed	100

Figura III.6. Estadística generada para hallar el IC50 del tratamiento por 24 con Anandamida en células U87.

El resultado de IC₅₀ fue 14.58, con este resultado, tomamos como concentración para trabajar la Anandamida en conjunción con otras drogas la concentración de 10 μM . En casos especiales se trabajó con la concentración de 3 μM , ya que al evaluar el posible efecto de dos drogas juntas, se puede llegar a una gran inhibición haciendo que todas las células se despeguen del pozo o del frasco de cultivo y al tratar de hacer alguna prueba o experimento con estas células tratadas no se obtenga un resultado verdadero.

Hasta este punto se puede sospechar que la Anandamida tiene un efecto antiproliferativo en las células U87, por la activación del sistema cannabinoide, con más precisión por agonizar el receptor CB1, ya que usamos esta droga endógena por la gran afinidad por excelencia que tiene con este receptor, 4 veces más comparándolo con el receptor CB2.

4. Tratamiento con 2- Araquinodilglicerol

Se trabajó bajo el mismo esquema que la Anandamida, pero esta droga se disuelve en DMSO, de igual manera la concentración final de DMSO es de 0.25%. Las concentraciones que se trabajaron fueron 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM y 100 μM (61). Se midieron las absorbancias del ensayo de viabilidad de MTS después de 24 horas de incubación.

La viabilidad se midió con el ensayo de MTS por cuadruplicado, en cada repetición se sembró 5 veces la misma concentración de células y se le puso tratamiento, para corroborar que el trabajo manual y mecánico se realice de la forma correcta.

Los datos que se obtuvieron del Lector de platos o Plate reader por cada repetición, se observan en el Anexo 5.

El promedio del vehículo se tomó como el 100% de viabilidad y se comparó con las absorbancias de los tratamientos a diferentes concentraciones con 2- Araquinodilglicerol (Anexo 5). El promedio de las absorbancias de todos los vehículos fue 1.18335.

Se trabajó de la misma forma las soluciones de trabajo, que con la Anandamida, cada concentración tenía una solución madre 200 veces la concentración mayor. Pero en este caso la diferencia fue que se usó DMSO. Al preparar estas soluciones, siempre tenemos que tener en cuenta que al final estén en las mismas condiciones, y contengan lo mismo lo único que debe cambiar es la concentración de la droga. Como se explicó antes también se trabajó estas drogas con medio incompleto para los ensayos posteriores no tengas interferencias del suero bovino fetal.

El 2- Araquinodilglicerol también fue obtenido de la empresa Tocris Bioscience®, el cual nos informa que los valores de K_i para los receptores CB1 y Cb2 son 472 and 1400 nM respectivamente. A diferencia de la Anandamida, esta molécula tiene valores más elevados de K_i , lo que significa que no tiene tanta afinidad por los receptores como lo tiene la Anandamida, además muestra un comportamiento parecido a la Anandamida, porque en receptor CB1 tiene casi 4 veces más afinidad por esta molécula que el receptor CB2. Esto quiere decir que el posible efecto, pueda estar mediado por el receptor CB1 más que el receptor CB2 sabiendo que estos tienen funciones muy parecidas. (73)

Se analizó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar (Tabla III.3) para poder desarrollar un gráfico donde se demuestre la viabilidad (Figura III.7).

Se realizó un análisis de ANOVA mediante el programa GraphPad, para identificar desde qué concentración de 2- Araquinodilglicerol se logra una diferencia significativa en viabilidad comparándolo con el vehículo (Figura III.8).

Tabla III.3. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas con 2- Araquinodilglicerol por 24 horas.

Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad		
	Promedio	Desviación estándar
Vehículo	100.00	11.804
1 μ M	97.55	16.821
3 μ M	94.73	16.734
10 μ M	84.81	15.674
30 μ M	69.74	9.643
100 μ M	46.24	4.504

Fuente: Elaboración propia

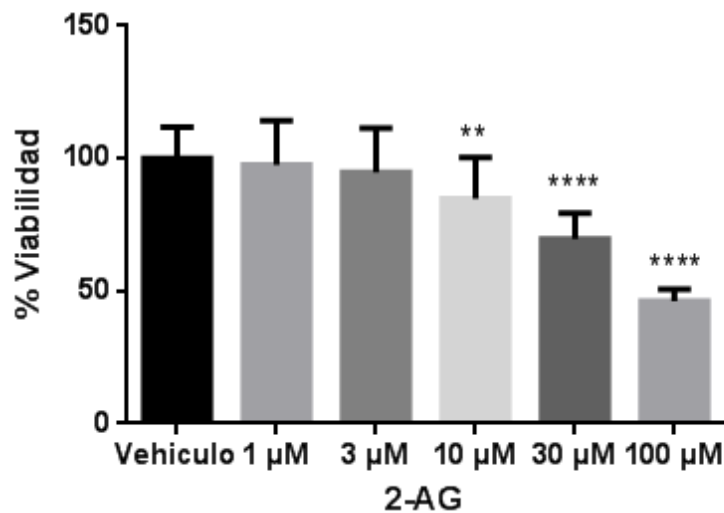


Figura III.7. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquinoilglicerol a diferentes concentraciones por 24 horas. * Diferencia significativa con la barra del vehículo, a más * más diferencia.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	48.96
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.6823

Figura III.8. Tabla de ANOVA generada por el programa GraphPad, tratamiento de células U87 con 2- Araquinoilglicerol por 24 horas.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Blanco vs. 1 μ M	2.451	-8.268 to 13.17	No	ns
Blanco vs. 3 μ M	5.269	-5.449 to 15.99	No	ns
Blanco vs. 10 μ M	15.19	4.476 to 25.91	Yes	**
Blanco vs. 30 μ M	30.26	19.54 to 40.98	Yes	****
Blanco vs. 100 μ M	53.76	43.04 to 64.48	Yes	****

Figura III.9. Test de Dunnett generado por el programa GraphPad, tratamiento de células U87 con 2- Araquinoilglicerol por 24 horas, comparando vehículo con las diferentes concentraciones del tratamiento.

Los resultados muestran una relación concentración e inhibición, a diferencia de la Anandamida la cual tenía un cambio brusco entre los 3 μ M y los 10 μ M. Se tomó en cuenta usar 100 μ M sabiendo que la afinidad por la unión a receptores CB1 y CB2 es un poco más baja a comparación con la Anandamida además nos apoyamos en la referencias bibliográficas (61).

En células hepáticas HSCs después de haber tratado las células con 2-Araquinoilglicerol la concentración en la que ya se tiene una diferencia significativa de muerte células es a los 5 μ M usando concentraciones hasta 100 μ M en cual todas tienen diferencia significativa comparada con el vehículo. Basándonos en nuestros resultados, tenemos un gran parecido con las células gliales, porque nosotros estamos reportando que a partir de 10 μ M tenemos

ya una diferencia significativa en lo que viabilidad celular, sabiendo que no tomamos el punto número 5 μM . (61).

Hasta este punto de los experimentos se puede decir que tenemos una buena respuesta, en nuestra búsqueda de un efecto antiproliferativo usando cannabinoides endógenos, ya que se puede observar claramente que se logra bajar el porcentaje de viabilidad. Además que estamos agonizando los receptores cannabinoides, CB2 más que CB1 por la afinidad que tiene esta droga por los receptores CB2, se puede inducir que gracias a esto se está logrando una anti proliferación.

Al igual que se mencionó anteriormente con el tratamiento de Anandamida, nuestro objetivo fue inhibir la proliferación, para los siguientes experimentos sinergismo una posible combinación de tratamiento con otras drogas se calculó la Concentración Inhibitoria 50 (IC50). Con los resultados obtenidos previamente obtenidos, se usó el programa GraphPad para poder obtener el IC50 experimental para las células U87 tratadas con 2-Araquidilglicerol. Figura III.10 y Figura III.11. Los datos se convirtieron a logaritmo para obtener el IC 50 (Anexo 7).

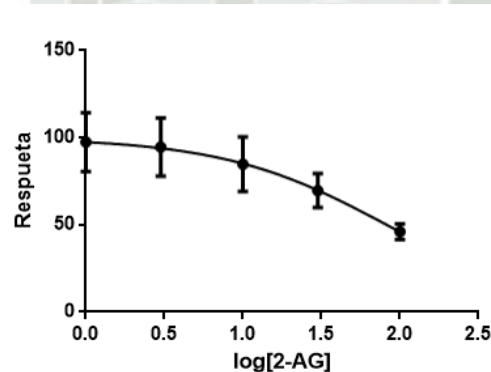


Figura III. 10. Gráfico de dosis vs respuesta. En el eje X la dosis de 2-AG expresada en logaritmo y en el eje Y la respuesta.

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	1.918
HillSlope	-0.8289
IC50	82.78
Std. Error	
LogIC50	0.05313
HillSlope	0.08838
95% Confidence Intervals	
LogIC50	1.812 to 2.024
HillSlope	-1.005 to -0.6532
IC50	64.91 to 105.6
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	98
R square	0.6704
Absolute Sum of Squares	17532
Sy.x	13.38
Number of points	
Analyzed	100

Figura III.11. Estadística generada para hallar el IC50 del tratamiento por 24 con 2-Araquinodilglicerol en células U87.

Fuente: Elaboración propia.

El resultado de IC50 fue 82.78, con este resultado, tomamos como concentración para trabajar el 2-Araquinodilglicerol en conjunción con otras drogas la concentración de 30 μM , porque las concentraciones muy elevadas de droga pueden producir citotoxicidad en las células y nos pueden dar unos resultados falsos, además se tiene que tener en cuenta que las células gliales son sensibles a comparación de otras células de nuestro organismo, por eso no se usó la concentración de 100 μM . En casos especiales se trabajó con la concentración de 10 μM , ya que al evaluar el posible efecto de dos drogas juntas, se puede llegar a una gran inhibición haciendo que todas las células se despeguen del pozo o del frasco de cultivo

y al tratar de hacer alguna prueba o experimento con estas células tratadas no se obtenga un resultado verdadero.

5. Tratamiento con JZL-184

Luego de analizar la viabilidad celular con AEA y 2-AG, se procedió a inhibir a MAGL, la enzima encargada de la degradación de 2-AG, para esto se utilizó el inhibidor JZL-184.

La finalidad de este ensayo, fue la inhibición de la degradación de 2-AG para la evaluación de la existencia de un efecto mayor al que se obtuvo usando 2-AG individualmente

El esquema de trabajo fue similar al de otros ensayos, la incubación de células con medio completo fue de 24 horas, luego de este tiempo, se añadió nuevo medio incompleto con JZL-184 a 0.3 μM , 1 μM , 3 μM y 10 μM .

Las concentraciones óptimas en las que el inhibidor contrarrestaba la hidrólisis de 2-AG, según estudios en células gástricas para evaluación de la inhibición de nocicepción y en células neuronales, fueron de 10 μM y 3 μM , respectivamente (73, 74), es por esta razón, que fueron incluidas en el rango de concentraciones usadas de JZL-184. Además, el objetivo de la utilización de una concentración de 0.3 μM fue garantizar que la muerte de las células U87, se debiera a la inhibición de MAGL y no a una sobredosis de JZL-184, al ser esta línea celular delicada.

El rango de tiempo de incubación del tratamiento con este inhibidor, es de 30 minutos a dos horas (61, 75), el tiempo elegido para dejar actuar a la droga fue de 1 hora, pues es necesario que exista un periodo de incubación con JZL-184, pues si se trataran las células con este inhibidor y 2-AG, al mismo tiempo, la presencia del endocannabinoide, activaría el inicio de la actuación de la enzima degradadora MAGL, no dando tiempo para impedir su inhibición (76).

Después de este tiempo fue necesario desechar y enjuagar el medio incompleto con JZL-184, para evitar la sobre exposición de la célula con el solvente en el que se encuentra el inhibidor y se agregó 10 μ M de 2- Araquinodilglicerol.

Se midieron las absorbancias del ensayo de viabilidad de MTS después de 24 horas de incubación con el endocannabinoide.

La viabilidad se midió con el ensayo de MTS por cuadruplicado, en cada repetición se sembró 5 veces la misma concentración de células y se le puso tratamiento, para corroborar que el trabajo manual y mecánico se realice de la forma correcta. Los datos que se obtuvieron del Lector de platos o Plate reader por cada repetición, se observan en el Anexo 8.

El promedio del vehículo se tomó como el 100% de viabilidad y se comparó con las absorbancias de los tratamientos a diferentes concentraciones con JZL 184 y 2- Araquinodilglicerol (Anexo 8). El promedio de las absorbancias de todos los vehículos fue 1.57655.

Se analizó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar (Tabla III.4) para poder desarrollar un gráfico donde se demuestre la viabilidad celular de la combinación del endocannabinoide y JZL-184, en comparación al tratamiento con 2-AG (Figura III.12) y tratamiento con JZL-184 (Figura III.15), por separado. Además, se realizó un análisis ANOVA y Dunnett, haciendo uso del programa GraphPad, en el que se demuestra una diferencia significativa entre la viabilidad de las células tratadas sólo con 2-AG y las células tratadas con la combinación de JZL-184 y 2-AG (Figura III.13) (Figura III.14); así mismo, se realizaron los mismos análisis estadísticos para la comparación de la viabilidad de las células tratadas sólo con JZL-184 y la combinación de JZL-184 y 2-AG, en el que también existen diferencia significativas (Figura III.16) (Figura III.17).

Tabla III.4. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas con JZL-184 y 2- Araquinodilglicerol por 24 horas.

Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad		
	Promedio	Desviación estándar
Vehículo	100	11.231
2-AG 10 μ M	89.11	9.289
JZL-184 10 μ M	79.53	16.190
JZ-184 0.3 μ M + 2-AG 10 μ M	80.91	8.543
JZ-184 1 μ M + 2-AG 10 μ M	80.99	6.971
JZ-184 3 μ M + 2-AG 10 μ M	73.2	5.261
JZ-184 10 μ M + 2-AG 10 μ M	54.37	5.634

Fuente: Elaboración propia.

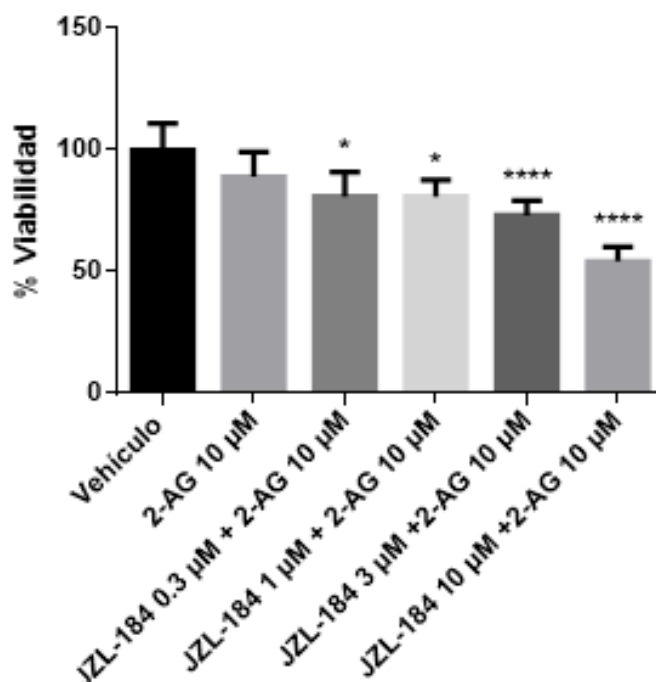


Figura III.12. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquidilglicerol y JZL-184 y a diferentes concentraciones, por 24 horas. * Diferencia significativa con la barra de células tratadas sólo con 2-AG 10 μ M.

A más *, más significancia.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	17813	5	3563	F (5, 84) = 48.02	P < 0.0001
Residual (within columns)	6232	84	74.20		
Total	24045	89			

Figura III.13. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con 2- Araquidilglicerol y la combinación de JZL-184 y 2-AG por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
2-AG 10 μ M vs. Vehículo	-10.89	-18.94 to -2.828	Yes	**
2-AG 10 μ M vs. JZL-184 0.3 μ M + 2-AG 10 μ M	8.200	0.1421 to 16.26	Yes	*
2-AG 10 μ M vs. JZL-184 1 μ M + 2-AG 10 μ M	8.127	0.06918 to 16.19	Yes	*
2-AG 10 μ M vs. JZL-184 3 μ M + 2-AG 10 μ M	15.91	7.853 to 23.97	Yes	****
2-AG 10 μ M vs. JZL-184 10 μ M + 2-AG 10 μ M	34.74	26.68 to 42.80	Yes	****

Figura III.14. Comparación entre células tratadas sólo con 2-AG y células tratadas con la combinación de JZL-184 y 2-AG, mediante el test de Dunnett generado por el programa GraphPad, en donde se muestra que:

1. La reducción la viabilidad de las células tratadas con 2-AG y las células sin tratamiento es significativa.

2. La diferencia en la reducción de la viabilidad de las células tratadas con sólo con 2-AG y las células tratadas con la combinación de 2-AG y JZL-184, a diferentes concentraciones es significativa.

Fuente: Elaboración propia.

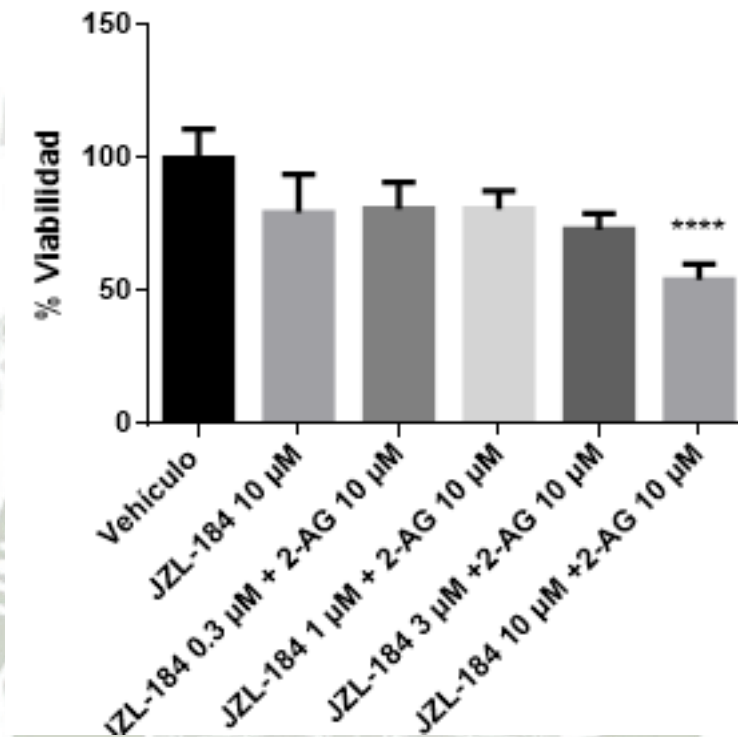


Figura III.15. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquidilglicerol y JZL-184, a diferentes concentraciones, por 24 horas.

* Diferencia significativa con la barra de células tratadas sólo con JZL-184 10 µM.

Fuente: Elaboración propia

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	16273	5	3255	F (5, 84) = 35.43	P < 0.0001
Residual (within columns)	7717	84	91.87		
Total	23990	89			

Figura III.16 Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con JZL-184 y la combinación de JZL-184 y 2-AG por 24 horas.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
JZL-184 10 μ M vs. Vehículo	-20.47	-29.44 to -11.50	Yes	****
JZL-184 10 μ M vs. JZL-184 0.3 μ M + 2-AG 10 μ M	-1.382	-10.35 to 7.585	No	ns
JZL-184 10 μ M vs. JZL-184 1 μ M + 2-AG 10 μ M	-1.455	-10.42 to 7.512	No	ns
JZL-184 10 μ M vs. JZL-184 3 μ M + 2-AG 10 μ M	6.329	-2.637 to 15.30	No	ns
JZL-184 10 μ M vs. JZL-184 10 μ M + 2-AG 10 μ M	25.16	16.19 to 34.13	Yes	****

Figura III.17. Comparación entre células tratadas sólo con JZL-184 y células tratadas con la combinación de JZL-184 y 2-AG, mediante el test de Dunnett generado por el programa GraphPad, en donde se muestra que:

1. La reducción de la viabilidad de las células tratadas con JZL-184 y las células sin tratamiento es significativa.
2. La diferencia en la reducción de la viabilidad de las células tratadas con sólo con JZL-184 y las células tratadas con la combinación de inhibidor –endocannabinoide, es significativa la concentración de 10 μ M para ambas drogas.

6. Tratamiento con OL-135

En este ensayo se buscó inhibir la hidrólisis de anandamida (AEA), utilizando OL-135, un inhibidor selectivo de la FAAH, enzima encargada de la degradación del endocannabinoide mencionado.

Se utilizó el mismo esquema que con JZL-184, después de 24 horas de incubación con medio completo de las células se añade al nuevo medio incompleto OL-135 a 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M y 30 μ M. Este rango de concentraciones se aproxima a los utilizados en estudios anteriores en células de fibroblastos derivados de tejido de riñones, COS7 (77), también en

ensayos realizados para la caracterización de nuevos inhibidores de FAAH y DAGL usando a OL-135 como punto de referencia **(78)** y evaluación de actividad de macamidas **(63)**.

Una vez que se dejó actuar al inhibidor por 1 hora, se agregó 3 μM de Anandamida **(64)** y se midieron las absorbancias del ensayo de viabilidad de MTS después de 24 horas de incubación con el endocannabinoide.

La viabilidad se midió con el ensayo de MTS por cuadruplicado, en cada repetición se sembró 5 veces la misma concentración de células y se le puso tratamiento, para corroborar que el trabajo manual y mecánico se realice de la forma correcta. Los datos que se obtuvieron del Lector de platos o Plate reader por cada repetición, se observan en el Anexo 9.

El promedio del vehículo se tomó como el 100% de viabilidad y se comparó con las absorbancias de los tratamientos a diferentes concentraciones con OL-135 y Anandamida (Anexo 9). El promedio de las absorbancias de todos los vehículos fue 1.304632

Se analizó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar (Tabla III.5) para poder desarrollar un gráfico donde se demuestre la viabilidad celular de la combinación de AEA y OL-135, en comparación al tratamiento con AEA (Figura III.18) y tratamiento con OL- 135 (Figura III.21), por separado. Además, se realizó un análisis ANOVA y Dunnett, haciendo uso del programa GraphPad, en el que se demuestra una diferencia significativa entre la viabilidad de las células tratadas sólo con el endocannabinoide y las células tratadas con la combinación de OL-135 y AEA (Figura III.19) (Figura III.20).

Seguidamente, se realizaron los mismos análisis estadísticos para la comparación de la viabilidad celular con el tratamiento de sólo OL-135 y la combinación de OL-135 y AEA, en el que también existen diferencias significativas (Figura III.22) (Figura III.23).

Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad		
	Promedio	Desviación estándar
Vehículo	100	13.39064
AEA 3 μ M	91.5564	17.21473
OL-135 30 μ M	66.7097	9.782348
OL-135 1 μ M + AEA 3 μ M	100.0605	11.80527
OL-135 3 μ M + AEA 3 μ M	97.07923	10.49652
OL-135 10 μ M + AEA 3 μ M	91.81055	9.85139
OL-135 30 μ M + AEA 3 μ M	65.17266	6.693214

Tabla III.5. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas con OL-135 y Anandamida por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

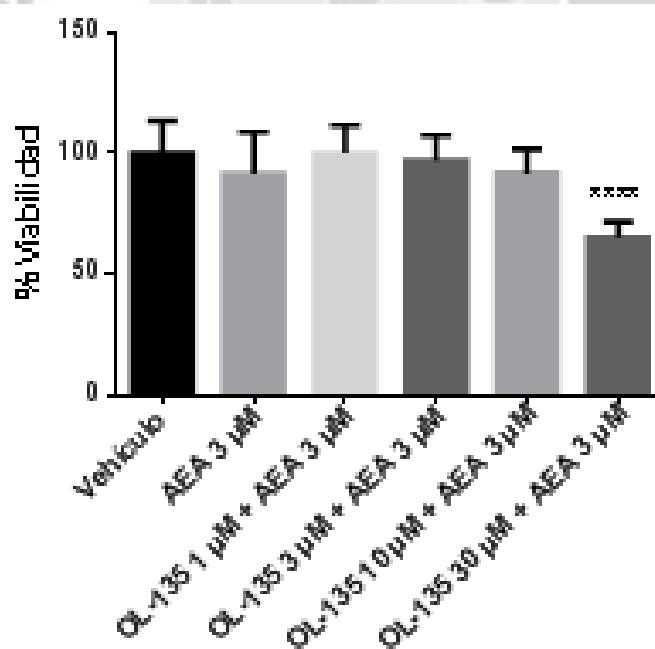


Figura III.18. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y OL-135 diferentes concentraciones, por 24 horas. * Diferencia significativa con la barra de células tratadas sólo con AEA 3 μ M. A más *, más significancia.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	22.83
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.5138

Figura III.19. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con Anandamida y la combinación de OL-135 y AEA por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
AEA 3 μ M vs. Vehículo	-8.444	-18.39 to 1.504	No	ns
AEA 3 μ M vs. OL-135 1 μ M + AEA 3 μ M	-8.504	-18.45 to 1.444	No	ns
AEA 3 μ M vs. OL-135 3 μ M + AEA 3 μ M	-5.523	-15.47 to 4.425	No	ns
AEA 3 μ M vs. OL-135 10 μ M + AEA 3 μ M	-0.2542	-10.20 to 9.694	No	ns
AEA 3 μ M vs. OL-135 30 μ M + AEA 3 μ M	26.38	16.44 to 36.33	Yes	****

Figura III.20. Comparación entre células tratadas sólo con AEA y células tratadas con la combinación de OL-135 y AEA, mediante el test de Dunnett, generado por el programa GraphPad, en donde se muestra que sólo las células tratadas con la combinación de OL-135 30 μ M + AEA 3 μ M muestran una reducción significativa de viabilidad, en comparación a las células tratadas con AEA 3 μ M.

Fuente: Elaboración propia.

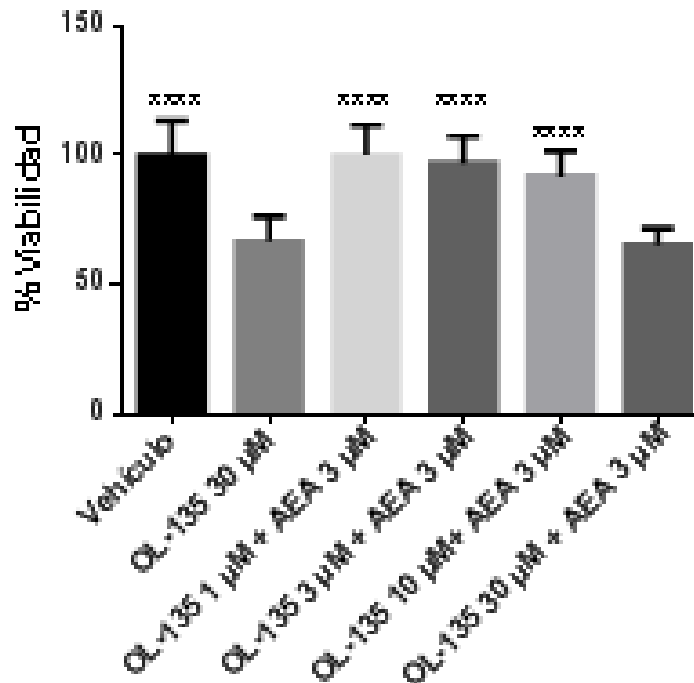


Figura III.21. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con AEA y OL-135, a diferentes concentraciones, por 24 horas. * Diferencia significativa con la barra de células tratadas sólo con OL-135 30 µM. A más *, mayor significancia.

Fuente Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	46.26
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.6817

Figura III.22. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con OL-135 y la combinación de OL-135 y AEA por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
OL-135 30 μ M vs. Vehículo	-33.29	-42.01 to -24.57	Yes	****
OL-135 30 μ M vs. OL-135 1 μ M + AEA 3 μ M	-33.35	-42.07 to -24.63	Yes	****
OL-135 30 μ M vs. OL-135 3 μ M + AEA 3 μ M	-30.37	-39.09 to -21.65	Yes	****
OL-135 30 μ M vs. OL-135 10 μ M + AEA 3 μ M	-25.10	-33.82 to -16.38	Yes	****
OL-135 30 μ M vs. OL-135 30 μ M + AEA 3 μ M	1.537	-7.184 to 10.26	No	ns

Figura III.23. Comparación entre células tratadas sólo con OL-135 y células tratadas con la combinación de inhibidor y AEA, mediante el test de Dunnett generado por el programa GraphPad, en donde se muestra que:

1. La reducción la viabilidad de las células tratadas con OL-135 y las células sin tratamiento es significativa.
2. Al comparar la viabilidad celular con el tratamiento de OL-135, existe una reducción significativa de esta, a diferencia del tratamiento con la combinación OL-135 1 μ M + AEA 3 μ M, OL-135 3 μ M + AEA 3 μ M y OL-135 10 μ M + AEA 3 μ M.

Fuente: Elaboración propia.

7. Tratamiento con Anandamida y 2- Araquinodilglicerol

Se usó el mismo esquema de trabajo anterior, donde se combinaron ambas drogas.

Para este ensayo, se usó una concentración de AEA constante, para todas las combinaciones, que fue de 10 μ M y para el 2- Araquinodilglicerol se usaron diferentes concentraciones: 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M.

La viabilidad se midió con el ensayo de MTS por cuadruplicado, en cada repetición se sembró 5 veces la misma concentración de células y se le colocó tratamiento, para corroborar

que el trabajo manual y mecánico se realice de forma correcta. Los datos que se obtuvieron del Lector de platos o Plate reader por cada repetición se observan en el Anexo 10.

El promedio del vehículo se tomó como el 100% de viabilidad y se comparó con las absorbancias de los tratamientos a diferentes concentraciones con Anandamida y 2-Araquinodilglicerol (Anexo 10). El promedio de las absorbancias de todos los vehículos fue 1.4467

Se analizó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar (Tabla III.6) para poder desarrollar un gráfico donde se demuestre la viabilidad celular de la combinación de AEA y 2-AG, en comparación al tratamiento con sólo con AEA (Figura III.24). Además, se realizó un análisis ANOVA y Dunnett, haciendo uso del programa GraphPad, en el que se demuestra una diferencia significativa entre la viabilidad de las células tratadas sólo con Anandamida (AEA) y las células tratadas con la combinación de 2-AG y AEA (Figura III.25) (Figura III.26).

Tabla III.6. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas Anandamida y 2- Araquinodilglicerol por 24 horas.

Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad		
	Promedio	Desviación estándar
Vehículo	100	5.67441384
AEA 10 μ M	49.9999995	4.91845783
2-AG 30 μ M	83.006153	8.08544048
AEA 10 μ M +2-AG 1 μ M	47.1521395	5.27021846
AEA 10 μ M + 2-AG 3 μ M	39.9391715	5.38619492
AEA 10 μ M + 2-AG 10 μ M	36.3205915	3.82068917
AEA 10 μ M +2 -AG 30 μ M	33.5107475	0.69108324

Fuente: Elaboración propia.

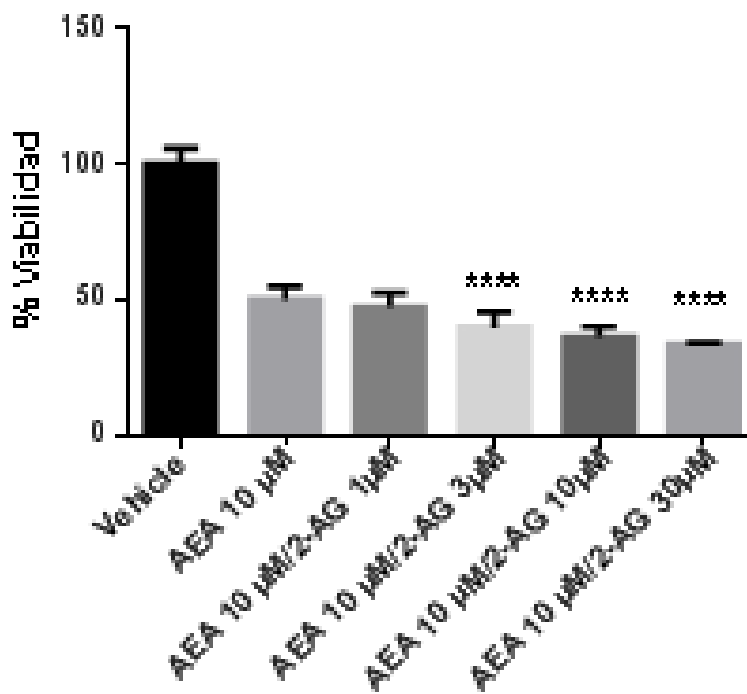


Figura III.24. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y 2-Araquinodilglicerol a diferentes concentraciones por 24 horas. * Diferencia significativa con la barra del vehículo. A más *, mayor significancia.

Fuente: Elaboración propia.

La figura III.22 muestra la significancia en la reducción de viabilidad celular, a partir de la segunda combinación de AEA y 2-AG (AEA 10 μ M/ 2-AG 3 μ M), al ser comparada con el tratamiento de AEA 10 μ M, demostrando así, que el efecto ejercido por el 2-AG, en combinación con la AEA, se da a partir de la concentración 3 μ M.

ANOVA summary	
F	572.7
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9617

Figura III.25. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con AEA y la combinación de 2-AG y AEA por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia

Dunnnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
AEA 10 μ M vs. Vehicle	-50.00	-53.73 to -46.27	Yes	****
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M/2-AG 1 μ M	2.848	-0.8782 to 6.574	No	ns
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M/2-AG 3 μ M	10.06	6.335 to 13.79	Yes	****
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M/2-AG 10 μ M	13.68	9.953 to 17.41	Yes	****
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M/2-AG 30 μ M	16.49	12.76 to 20.22	Yes	****

Figura III.26. Tabla de comparación entre vehículo, 2-Araquinodilglicerol 30 μ M y Anandamida 10 μ M con el tratamiento generado mediante el test de Dunnnett por el

programa GraphPad del tratamiento de células U87 con Anandamida y 2-Araquinodilglicerol por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Se elaboró un gráfico de viabilidad celular para el tratamiento con 2-AG (Figura III.27) usando los datos obtenidos en la Tabla III.6. También se realizaron los mismos análisis estadísticos para la comparación de la viabilidad celular con el tratamiento de sólo 2-arquidonilglicerol (2-AG) y la combinación de 2-AG y AEA, en los que también, existen diferencias significativas (Figura III.28) (Figura III.29).

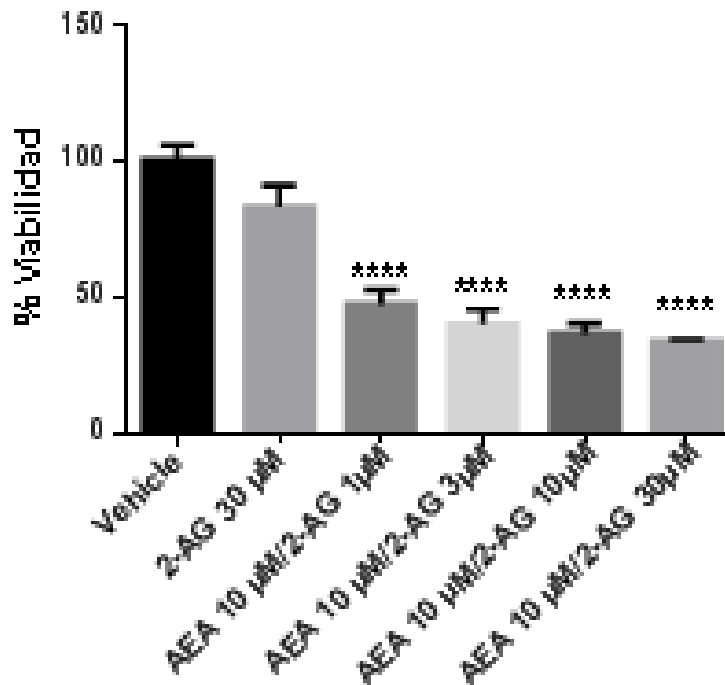


Figura III.27. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y 2-Araquinodilglicerol a diferentes concentraciones por 24 horas. * Diferencia significativa con la barra del vehículo. A más *, mayor significancia.

La figura III.25 muestra la significancia en la reducción de viabilidad celular, a partir de la segunda combinación de AEA y 2-AG (AEA 10 μM / 2-AG 3 μM), al ser comparada con el tratamiento de AEA 10 μM , demostrando así, que el efecto ejercido por el 2-AG, en combinación con la AEA, se da a partir de la concentración 3 μM .

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	551.3
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9603

Figura III.28. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con 2-AG y la combinación de 2-AG y AEA por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
2-AG 30 μM vs. Vehicle	-16.99	-21.28 to -12.71	Yes	****
2-AG 30 μM vs. AEA 10 μM /2-AG 1 μM	35.85	31.57 to 40.14	Yes	****
2-AG 30 μM vs. AEA 10 μM /2-AG 3 μM	43.07	38.78 to 47.35	Yes	****
2-AG 30 μM vs. AEA 10 μM /2-AG 10 μM	46.69	42.40 to 50.97	Yes	****
2-AG 30 μM vs. AEA 10 μM /2-AG 30 μM	49.50	45.21 to 53.78	Yes	****

Figura III.29. Tabla de comparación entre vehículo, 2- Araquinodilglicerol 30 μM y Anandamida 10 μM con el tratamiento, generado mediante el test de Dunnett, por el programa GraphPad, del tratamiento de células U87 con Anandamida y 2- Araquinodilglicerol por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia

8. Ensayo de sinergismo entre AEA y 2-Araquidonilglicerol.

Una vez realizados los ensayos de viabilidad, se procedió a evaluar la existencia de sinergismo entre AEA y 2-AG, para esto se utilizó el programa Compusyn, un programa de simulación computarizada, que trabaja usando el teorema de índice de combinación, que utiliza la siguiente Ecuación III.1:

$$CI = \frac{(D_1)}{(Dx_1)} + \frac{(D_2)}{(Dx_2)}$$

Ecuación III.1. Índice de combinación; donde D_1 y D_2 corresponden a las concentraciones de la droga 1 y 2, usadas en la combinación para obtener el efecto (debe estar dando en porcentaje). Dx_1 y Dx_2 , corresponden a las concentraciones de las drogas individuales para lograr el mismo efecto (79).

Fuente: Elaboración propia.

Para determinar si en la combinación de drogas existe un efecto aditivo, sinérgico o antagónico, el valor de índice de combinación (CI) de comprarse de la siguiente forma (Tabla III. 7).

Tabla III.7. Tabla de comparación de índice de combinación, para determinar el efecto en una combinación de drogas.

Efecto	Valor de índice de combinación (CI)
Aditivo	Igual a 1
Sinergismo	Menor a 1
Antagonismo	Mayor a 1

Fuente: elaboración propia.

Se realizó una simulación para la evaluación de sinergismo, encontrando que los CI de las 4 combinaciones de AEA y 2-AG a diferentes combinaciones, se encontraban por

debajo de la unidad (Tabla III.8) (Figura III.30), demostrando así, el efecto sinérgico de la combinación de endocannabinoides.

Tabla III.8. Índices de combinación hallados mediante el programa Compusyn, como resultado de una simulación computarizada de combinación de drogas.

Fuente: Elaboración propia.

Combinación AEA + 2-AG	Índice de combinación
AEA 10 μ M +2-AG 1 μ M	0.569
AEA 10 μ M + 2-AG 3 μ M	0.514
AEA 10 μ M + 2-AG 10 μ M	0.522
AEA 10 μ M +2 -AG 30 μ M	0.597

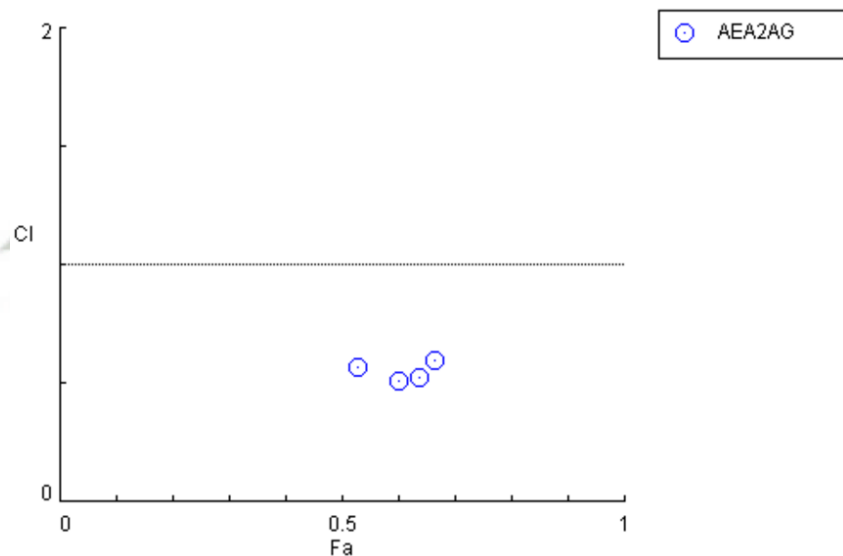


Figura III.30. Plot generado por el programa Compusyn, donde Fa, representa la Fracción afectada de las células (más del 50%), CI, representa el Índice de combinación y \odot representa las combinaciones de AEA y 2-AG a distintas concentraciones.

Fuente: Elaboración propia.

Mediante el isoblograma obtenido (Figura III.31), es posible apreciar la ubicación del efecto sinérgico de ambas drogas en combinación, al comparársele con un isoblograma normalizado, que explica gráficamente el teorema de Índice de combinación (Figura III.32).

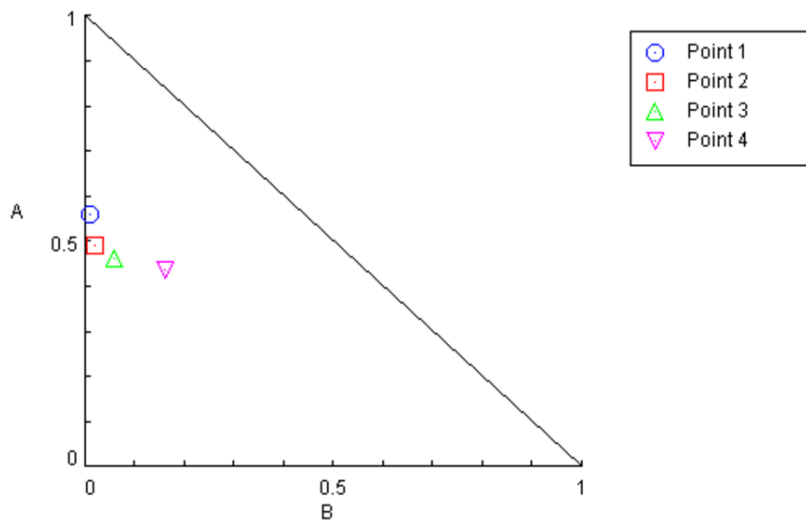
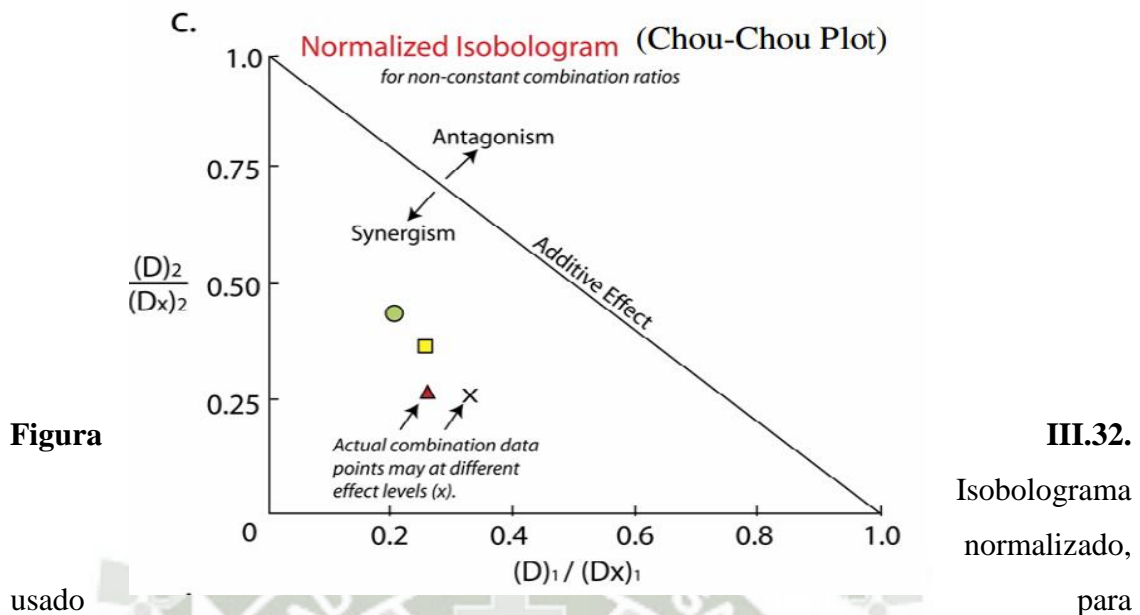


Figura III.31. Isoblograma obtenido, donde A representa la fracción $\frac{(D_2)}{(D_{x_2})}$ y B a la fracción $\frac{(D_1)}{(D_{x_1})}$ del teorema de Índice de combinación. Las 4 combinaciones de AEA y 2-AG a diferentes concentraciones, están representadas por .
Fuente: Elaboración propia.



Fuente: Compusyn Inc. (80)

9. JLZ-195, Anandamida y 2-AG

Se usó el mismo esquema de trabajo anterior, donde se juntaron Anandamida, 2-Araquinodilglicerol y JZL-195 para la inhibición de FAAH y MAGL.

Las concentraciones de Anandamida y 2- Araquinodilglicerol fueron 10 μM y 30 μM respectivamente, para todos los tratamientos de este ensayo. Para JZL-195 se usaron diferentes concentraciones: 0.3 μM , 1 μM , 3 μM y 10 μM .

La viabilidad se midió con el ensayo de MTS por triplicado, en cada repetición se sembró 5 veces la misma concentración de células y se le puso tratamiento, para corroborar que el trabajo manual y mecánico se realice de la forma correcta. Los datos que se obtuvieron del Lector de platos o Plate reader por cada repetición se observan en el Anexo 11.

El promedio del vehículo se tomó como el 100% de viabilidad y se comparó con las absorbancias de los tratamientos a diferentes concentraciones con Anandamida, 2-Araquinodilglicerol y JZL-195 (Anexo 11). El promedio de las absorbancias de todos los vehículos fue 1.17967

Se analizó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar (Tabla III.9) para poder desarrollar un gráfico donde se demuestre la viabilidad celular de la combinación de AEA, 2-AG y JZL-195, en comparación al tratamiento con AEA (Figura III.33), tratamiento con 2-AG (Figura III. 36) y el tratamiento con JZL-195(Figura III.39), por separado.

Además, se realizó un análisis ANOVA y Dunnett, haciendo uso del programa GraphPad, en el que se demuestra una diferencia significativa entre la viabilidad de las células tratadas sólo con AEA y las células tratadas con la combinación de ambos endocannabinoides y el inhibidor (Figura III.34) (Figura III.35).

Seguidamente, se realizaron los mismos análisis estadísticos para la comparación de la viabilidad celular con el tratamiento de sólo 2-AG y la combinación de AEA, 2-AG y JZL-195, en el que también existen diferencias significativas (Figura III.37) (Figura III.38).

Finalmente, se analizaron mediante ANOVA y Dunnett, para comprobar la viabilidad celular con el tratamiento de sólo JZL-195 y la combinación de los AEA y 2-AG más el inhibidor. (Figura III.40) (Figura III.41).

Tabla III.9. Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad celular en células U87 tratadas Anandamida, 2- Araquinodilglicerol y JZL-195 por 24 horas.
Fuente: Elaboración propia.

Promedio y desviación estándar de absorbancias del ensayo MTS de viabilidad		
	Promedio	Desviación estándar
Vehículo	100	6.70674
AEA 10 μM	25.86041	4.20169
2-AG 30 μM	43.96722	8.03728
JZL-195 10 μM	98.28200	7.98610
AEA 10 μM + 2-AG 30 μM + JZL-195 0.3 μM	26.74767	5.05011
AEA 10 μM + 2-AG 30 μM + JZL-195 1 μM	23.90506	2.06800
AEA 10 μM + 2-AG 30 μM + JZL-195 3 μM	23.92766	2.06886
AEA 10 μM + 2-AG 30 μM + JZL-195 10 μM	25.20486	2.97569

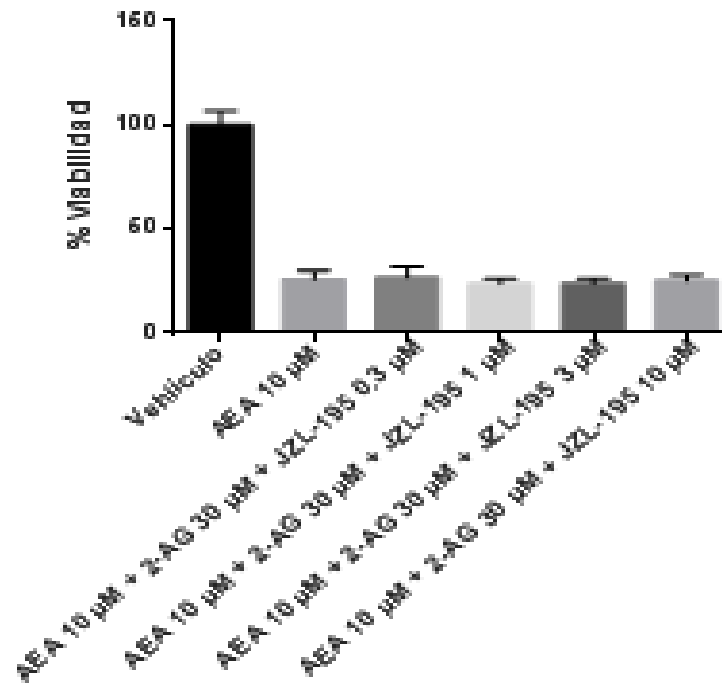


Figura III.33. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con la combinación de endocannabinoides y JZL-195, a diferentes concentraciones, por 24 horas. No hay diferencias significativas.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	797.7
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9794

Figura III.34. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con AEA y la combinación estudiada por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
AEA 10 μ M vs. Vehículo	-74.14	-78.06 to -70.22	Yes	****
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 0.3 μ M	-0.8873	-4.811 to 3.036	No	ns
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 1 μ M	1.955	-1.968 to 5.879	No	ns
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 3 μ M	1.933	-1.991 to 5.856	No	ns
AEA 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 10 μ M	0.6556	-3.268 to 4.579	No	ns

Figura III.35. Comparación entre células tratadas sólo con AEA y células tratadas con la combinación, mediante el test de Dunnett generado por el programa GraphPad, No existe diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia.

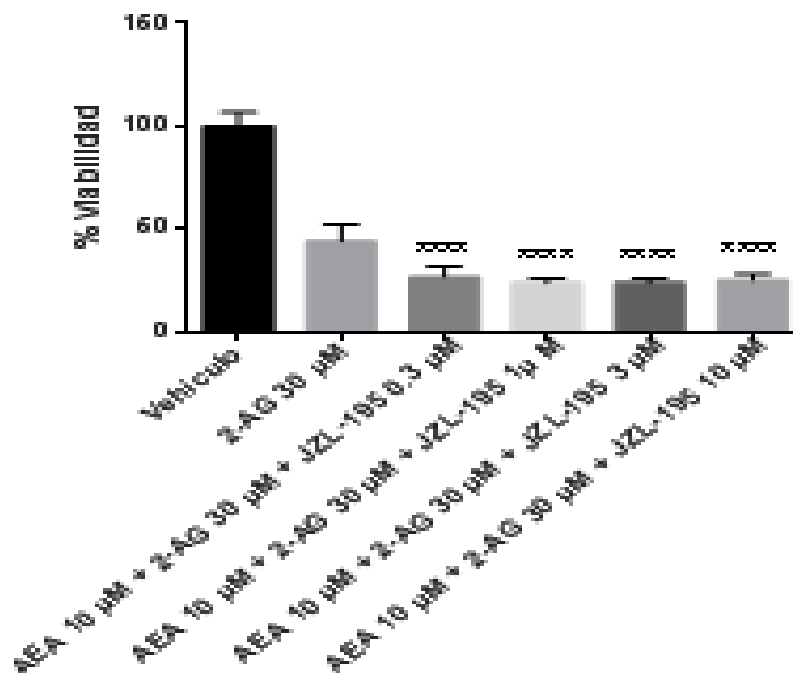


Figura III.36. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con la combinación de endocannabinoides y JZL-195, a diferentes concentraciones, por 24 horas, en comparación a la viabilidad celular con el tratamiento de 2-AG. * Diferencia significativa con la barra del vehículo. A más *, mayor significancia.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	534.2
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9695

Figura III.37. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con 2-AG y la combinación estudiada por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
2-AG 30 μ M vs. Vehiculo	-56.03	-60.75 to -51.32	Yes	****
2-AG 30 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 0.3 μ M	17.22	12.50 to 21.94	Yes	****
2-AG 30 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 1 μ M	20.06	15.35 to 24.78	Yes	****
2-AG 30 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 3 μ M	20.04	15.32 to 24.76	Yes	****
2-AG 30 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 10 μ M	18.76	14.05 to 23.48	Yes	****

Figura III.38. Comparación entre células tratadas sólo con 2-AG y células tratadas con la combinación, mediante el test de Dunnett generado por el programa GraphPad, donde se muestra que existe diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia.

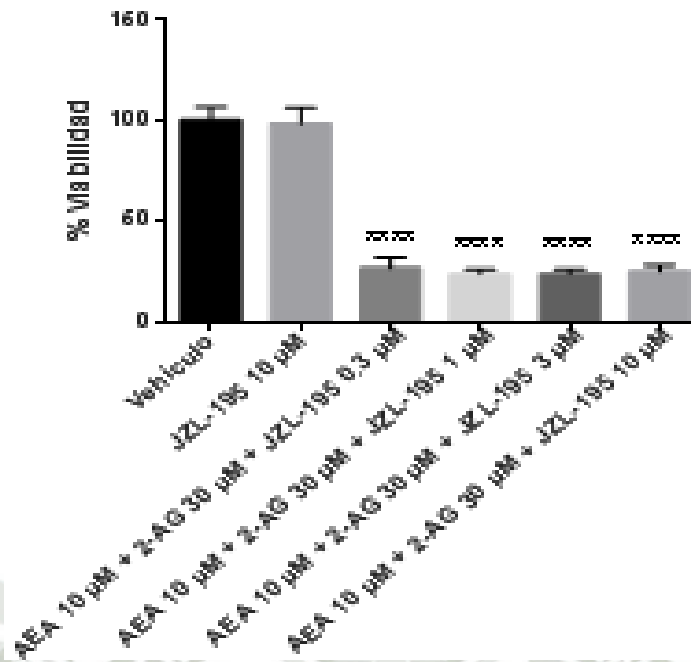


Figura III.39. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con la combinación de endocannabinoides y JZL-195, a diferentes concentraciones, por 24 horas, en comparación a la viabilidad celular con el tratamiento de JZL-195. * Diferencia significativa con la barra del vehículo. A más *, mayor significancia.

Fuente: Elaboración propia.

ANOVA summary	
F	871.9
P value	< 0.0001
P value summary	****
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes
R square	0.9811

Figura III.40. Análisis ANOVA generado por el programa GraphPad, de la comparación entre el tratamiento de células U87 con JZL-195 y la combinación estudiada por 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
JZL-195 10 μ M vs. Vehículo	-1.718	-6.422 to 2.986	No	ns
JZL-195 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 0.3 μ M	71.53	66.83 to 76.24	Yes	****
JZL-195 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 1 μ M	74.38	69.67 to 79.08	Yes	****
JZL-195 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 3 μ M	74.35	69.65 to 79.06	Yes	****
JZL-195 10 μ M vs. AEA 10 μ M + 2-AG 30 μ M + JZL-195 10 μ M	73.08	68.37 to 77.78	Yes	****

Figura III.41. Comparación entre células tratadas sólo con JZL-195 y células tratadas con la combinación, mediante el test de Dunnett generado por el programa GraphPad, donde se muestra que existe diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia.

10. Ensayo de inmunoblotting Western blot

Después de ver resultados positivos al usar las drogas Anandamida y 2-Araquidilglicerol se realice ensayos de inmunolectroforesis, para tratar de descifrar si proteínas importantes en la muerte celular se expresaban más o inhibían, como son BCL-2 y PARP1. Después del proceso se reveló las láminas de nitrocelulosa y se obtuvieron los siguientes resultados Figura III.42. Con esta data se logró hacer un gráfico donde usamos como control la beta actina para PARP1 Tabla III.10 Para BCL-2 Tabla III.11.

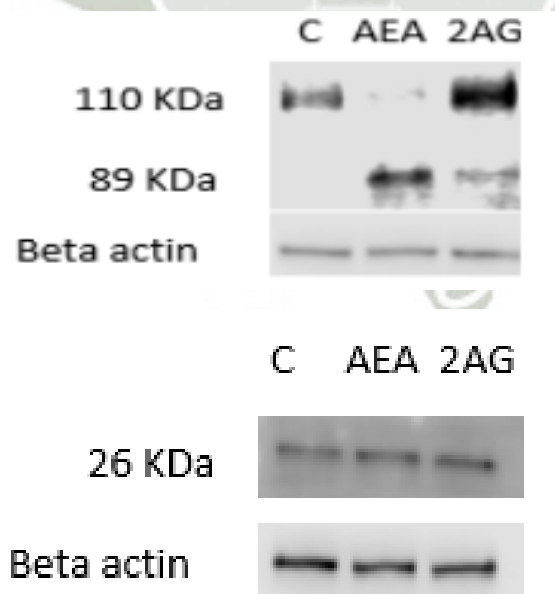


Figura III.42. En la parte superior las bandas después de revelar el ensayo de westernblot para PARP1 en células U87; C es control, AEA es anandamida 10 μM , 2AG es 2-Araquinodilglicerol 30 μM . En la parte inferior las bandas después de revelar el ensayo de westernblot para BCL-2 en células U87.

Tabla III.10. Densitometría de las bandas obtenidas por el ensayo de westernblot para la proteína PARP1, de la Figura III.22.

Densitometría de bandas ensayo Western blot			
PARP-1	Control	AEA 10μM	2AG 30 μM
Full 110 Kda	608	28	2030
Cortado 89 Kda	0	1030	505
Beta actina	14700	14400	14600

Fuente; Elaboración propia.

Tabla III.11. Densitometría de las bandas obtenidas por el ensayo de westernblot para la proteína BLC-2, de la Figura III.22.

Densitometría de bandas ensayo westernblot			
BCL-2	Control	AEA 10 μM	2AG 30 μM
BCL-2 26 KDa	7370	7350	7540
Beta actina	19700	18700	19300

Con los datos de densitometría se hizo un gráfico mostrando el porcentaje para compararlos con el control que es tomado como la beta actina PARP1 Figura III.43. BCL-2 Figura III.44.

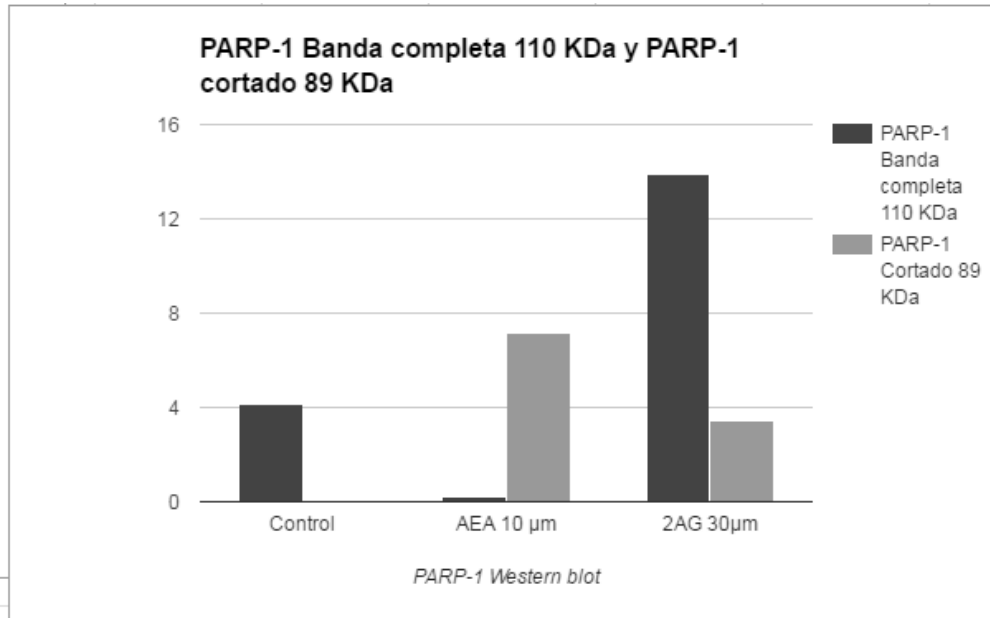


Figura III.43. Porcentaje de las bandas de densitometría del ensayo de westernblot para la proteína PARP1 usando como 100% la densidad de la beta actina.

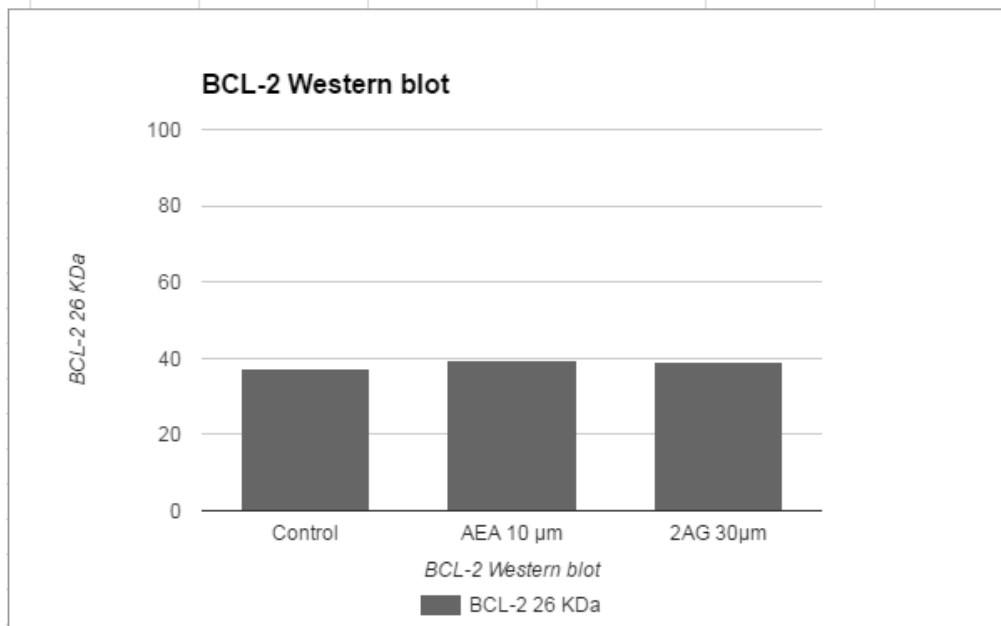


Figura III.44. Porcentaje de las bandas de densitometría del ensayo de westernblot para la proteína BLC-2 usando como 100% la densidad de la beta actina.

Se tuvo en cuenta para hacer los blots, referidos al tratamiento con Anandamida y 2-Araquinodilglicerol, que se hicieron en un plato de pozos de 96, donde se midió la viabilidad. Para tener los mismos parámetros cuando se va a realizar los blots, sabiendo que necesitamos una buena cantidad de células para la lisis de celular se realizó la incubación de las células en un frasco de cultivo de 25 mL, pero la cantidad de esta células tenía que estar en relación a la cantidad de células que crece en la superficie de un pozo de 96 para cumplir en que estén en las mismas condiciones, después de hacer cálculos en la área de contacto del frasco de cultivos y el área de contacto de pozo de 96 se obtuvo que el número de células para sembrar en los frasco de cultivo de 25 mL fue de 8×10^5 . Después de dejarlas crecer por 24 horas, se retiró el medio y se colocó medio incompleto con el tratamiento, ya sea Anandamida o 2- Araquinodilglicerol, es importante que este se trabaje con medio incompleto y antes de colocar este tratamiento se debe lavar bien la superficie donde se encuentras las células creciendo con PBS por lo menos 3 veces para evitar retirar todo el suero bovino fetal, que puede interferir en la aparición de bandas

La lisis celular se realizó de buena forma tal que nos dejó una concentración aproximada de $10^3 \mu\text{g/mL}$, por esta razón la concentración de proteína por pozo para el westernblot fue de $20 \mu\text{g}$ sabiendo que normalmente el rango que aguanta el pozo es de $5 \mu\text{L}$ hasta $50 \mu\text{L}$. En estas pruebas se usó un control de peso de las proteínas para saber si la banda que estamos viendo corresponde al peso de las proteínas que estamos buscando. El peso de las proteínas se encuentras en la hoja de data de la empresa que fabrico los anticuerpos.

Los resultados nos muestran que no hay actividad en la proteína BCL-2, las bandas se muestran igual en el control tanto como los tratamientos. Esto quiere decir que no hay un cambio de membrana de la mitocondria, pero para apoyarnos para sacar una

conclusión más adelante se hizo unas pruebas de caspasas que están relacionadas el equilibrio entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas. Se menciona en investigaciones que la Anandamida activa las caspasas lo que hace que exista una muerte células por apoptosis (60).

En el ensayo para la proteína PARP1, se puede ver claramente que existe una corte en las proteínas completa de PARP1 en los tratamientos de Anandamida y 2-Araquinodilglicerol esto quiere decir que existe actividad de esta proteína. Se puede notar que el tratamiento con Anandamida logra cortar la mayoría el PARP1 y se encuentra como PARP1 cortado que pesa 89 KDa. El tratamiento con 2-Araquinodilglicerol, muestra que solo una parte se corta de la proteína PARP1, esto se puede inferir a la diferencia que se reportó en la viabilidad células donde la Anandamida tenía un gran efecto en la viabilidad (40%) celular con menos concentración que el 2-Araquinodilglicerol. Esta proteína nos indica que existe una muerte celular, pero varios tipos de muerte celular desembocan en esta proteína, y la cortan; por esta razón se necesitó de un ensayo de actividad de caspasas para ayudarnos a saber que camino se usa para matar a las células.

11. Ensayo de luminiscencia de caspasas

Se realizó un ensayo de actividad de caspasas con dos Kits para las caspasas 3/7 y para la caspasa 8, con el fin de buscar actividad apoptótica en nuestras células U87. Cada kit venia para hacer muy pocos ensayos y era muy costoso, por esta razón se hizo dos repeticiones para cada uno. La forma de medir la actividad de las caspasas fue usando luminiscencia, que fue generado por la luciferasa. Este ensayo se lleva a cabo en los platos blancos con pozos de 96, se midió a las 3 horas. Para tener un control de estos se usó un conocido activador de caspasas, la Staurosporina, este reactivo es muy potente se tiene que usar en concentraciones de nano moles, normalmente se usan desde 3 nM hasta 300 nM, (21), nosotros usamos la concentración de 100 nM como control en nuestros ensayos. Se configuro al Lector de platos o Plate reader que se usó antes para medir

absorbancias para medir luminiscencia. Los resultados obtenidos de la actividad de las caspasas 3 y 7 se muestran en la Tabla III.12 y los resultados obtenidos de la actividad de la caspasa 8 se muestran en la Tabla III:13

Tabla III.12 Luminiscencia producida por luciferasa que mide la actividad de las caspasas 3 y 7 medido en Plate Reader. El vehículo se usó como o control.

Actividad caspasas 3 y 7				
Vehículo	Control positivo	Control negativo	AEA 10 μM	2-AG 30 μM
2564	120359	52061	60038	25462
2498	113059	52286	61374	25008

Fuente: Elaboración propia

Tabla III.13 Luminiscencia producida por luciferasa que mide la actividad de las caspasas 8 medido en Plate Reader. El vehículo se usó como o control.

Actividad caspasas 8				
Vehículo	Control positivo	Control negativo	AEA	2-AG
2256	101894	38501	25077	23825
2232	98895	36176	24028	14183

Fuente: Elaboración propia

Este resultado nos indica que no hay actividad de caspasas en nuestros tratamientos. Se sabe que las caspasas aparecen en un momento cumplen su función y después desaparecen, por esta razón se midió a diferentes tiempo entre 3 horas y 8 horas, para salir de duda se hizo el control positivo con Staurosporina, un ya conocido reactivo que produce apoptosis y nos mostró una gran actividad de caspasas.

Este resultado junto a los resultados que obtuvimos en el ensayo de Westernblot para la proteína BCL-2, nos dice que la muerte células que se da en nuestras células no es apoptosis, como muchas investigaciones en otras células que usan Anandamida reportan.



CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

Primera. Anandamida y 2-Araquinodilglicerol tienen un efecto antiproliferativo, a partir desde 10 μM para ambas drogas. Produciendo una significativa disminución de la viabilidad en la línea celular glioblastomas U87 después de 24 horas de tratamiento. La Anandamida presentó efecto antiproliferativo mayor (45 % de viabilidad con una concentración de 10 μM) en comparación con el 2-Araquinodilglicerol (llega a 46.24% con una concentración 10 veces más) en células glioblastomas U87 con un tratamiento de 24 horas.

Segunda. En la combinación Anandamida y 2-Araquinodilglicerol, Anandamida con una concentración fija de 10 μM y el 2-Araquinodilglicerol con concentraciones crecientes 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM , produce un efecto antiproliferativo sinérgico.

Tercera. La combinación de JZL-184 y 2-Araquinodilglicerol, produce una disminución de la viabilidad celular con una concentración de 10 μM de ambas drogas, llegando a un 54.36 % de viabilidad, JZL-184 por separado a 10 μM tiene un % de viabilidad de 79.53 y 2-Araquinodilglicerol a 10 μM tiene un porcentaje de viabilidad de 89.11. Las otras drogas OL-135 y JZL-195 no tienen justificación para combinarlos con AEA o 2-AG, ambos no muestran diferente efecto al combinarlos con los endocannabinoides.

Cuarta. Al mecanismo de acción de AEA y 2-AG en las células U87, no se logró encontrar, ya que no hubo respuesta con la proteína BCL-2 y tampoco actividad de caspasas, pero se sabe que usa el sistema del PARP-1 y se produce destrucción de DNA.



SUGERENCIAS

Antagonizar los receptores CB1, CB2 y Vanniloide, para encontrar por cual o cuales de esos es que actúan los endocannabinoides al producir un efecto antiproliferativo.

Evaluar a diferentes tiempos el efecto de AEA y 2-AG hasta 72 horas.

Hacer ensayos de diferentes proteínas mediante Westernblot, para tener una idea más clara del porque se produce la disminución en la viabilidad de las células. Una de las principales sería la proteína P53.

Estresar a las células U87 y aplicar tratamiento con AEA y 2-AG. Medir si se produce más de estos neurotransmisores cuando se estresa la célula.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio de Salud [homepage en Internet]. Lima: Ministerio de Salud; c2017 [actualizada 22 enero 2017; consultada 22 enero 2017]. Disponible en www.minsa.gob.pe.
2. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas [homepage en Internet]. Lima: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas; c2017 [actualizada 22 enero 2017; consultado 22 enero 2017]. Disponible en: <http://www.inen.sld.pe>.
3. Fundación para la Excelencia y la Calidad de la Oncología. Generalidades en oncología. Madrid: Fundación ECO; 2014.
4. Aibar S, Celano C, Chambi MC, Estrada S, Gandur N, et. al. Manual de Enfermería Oncológica, Buenos Aires: Ministerio de Salud; 2008.
5. American Brain Tumor Association. Glioblastoma and Malignant Astrocytoma. Los Angeles: American Brain Tumor Association; 2012.
6. Schors K, Evan G. Tumor angiogénesis: Cause or consecuencia of cáncer. Cancer Research. 2007; 67(15): 7059- 7061.
7. Massagué J. Evolución y metástasis del cáncer. SEBBM. 2009; 22-25.
8. Rodríguez L, Jurado L, Reyes-Esparza: A. La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. Revista del Instituto de Cancerología. 2000; 46(1): 33-46.
9. Taleisnik S. Neuronas: Desarrollo, lesiones y regeneración. 1ª ed. Buenos Aires: Encuentro, grupo editor, 2010.
10. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. Holland-Frei Cancer Medicine: Glioblastoma Multiforme and Anaplastic Astrocytoma. 6ta ed. Massachusetts: Decker; 2003.
11. Miguélañez BC. Muerte celular. Apoptosis y otras formas alternativas de muerte celular. Eusalud. 2008.
12. Universidad de Cantabria. La muerte celular: Necrosis y apoptosis. Cantabria: Creative Commons 4.0. 2014.
13. Arango PM, et al. La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula. Revista Cubana Oncológica. 1997; 13(2):126-134.

14. Martín BR. Diecinueve formas de morir las células. Valladolid: Universidad de Valladolid; 2014.
15. Weaver NA, Yang SE. Beyond DNA repair: additional functions of PARP-1 in cancer. *Front. Oncol.* 2013.
16. Ha Choi H, Snyder HS. Poly (ADP-ribose) Polymerase-1 in the Nervous System. 2000; 7:225-239.
17. Rouleau M, et al. PARP inhibition: PARP-1 and beyond. *Perspectives.* 2010; 10: 293-300.
18. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells.* 1998; 3:697-707.
19. Wong SYR. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2011; 30:87.
20. Algeciras-Schimmich A, et al. Apoptosis Dependent and Independent Functions of Caspases. *Landes Bioscience;* 2000-2013.
21. Slee EA, et al. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 276 (10):7320-6.
22. Cohen MG. Caspases: the executioners of apoptosis. *J Biol Chem.* 1997; 326: 1-16.
23. Mestre L, Correa F; Docagne F, Clemente D. et al. El sistema cannabinoide en situaciones de neuroinflamación: perspectivas terapéuticas en la esclerosis múltiple. *REV NEUROL.* 2006; 43: 541-8.
24. Dannert AM. Nuevas aportaciones al estudio de los cannabinoides: 1) Efectos vasculares, 2) Caracterización de nuevos compuestos. [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina; 2003.
25. Fonseca BM, Teixeira NA, Almada M, Taylor AH, Konje JC, Corrira-da-Silva G. Modulation of the novel cannabinoid receptor - GPR55 - during rat fetoplacental development. *Elsevier.* 2011; 32: 462-469.
26. Frieder P, Abugauch E, Loiacono R, editores. Actualización en psicofarmacología, Buenos Aires: Alfa Beta S.A; 2012.
27. Arévalo-Martín A, Dolores BM, Berrendero F, Cabranes A, et al. Guía básica sobre los Cannabinoides. Madrid: Ediciones Complutense; 2002.

28. Grotenhermen F. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*. IACM. 2006; 1(1): 10-14.
29. Tamayo AD. La anandamida es capaz de modificar algunos efectos de la Homocisteína en células endoteliales en cultivo (HUVEC), que determinan riesgo cardiovascular [Tesis]. Valdivia: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias; 2003.
30. Murillo-Rodríguez E, Drucker-Colín R. Endocannabinoides y su modulación en el sueño. *Neurocienc*. 2006; 11(3): 185-193.
31. Mackie K. Cannabinoid Receptors: Where they are and what they do. *Journal of Neuroendocrinology*. 2008; 20: 10-14.
32. Rodríguez U, Carrillo E, Soto E. Cannabinoides: Neurobiología y usos médicos. *Elementos: Ciencia y Cultura*. 2005; 12(60): 3-9.
33. Cervantes VR, Gonzáles EC, Cruz MS. Endocannabinoides e inflamación. *El Residente*. 2011; 6(2):127-135.
34. Fundació Institut Català de Farmacologia. Uso terapéutico del cannabis: Farmacología básica. Barcelona: Fundació Institut Català de Farmacologia; 2007.
35. Cravatt FB, Lichtman HA. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. *Elsevier*. 2003; 7:469-475.
36. Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997; 388: 776-774.
37. Rodríguez de Fonseca F. Bioquímica de la adicción a cannabis. Málaga: SEBBM; 2012.
38. Tocris a Biotechne Brand. JZL-184 Inhibitor. Bristol. 2017. Disponible en :www.tocris.com
39. Lysenko LV, et al. Monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 improves behavior and neural properties in Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Plos One*. 2014; 4(12).
40. Sigma- Aldrich. OL-135 Inhibitor. Missouri Sigma- Aldrich. 2017. Disponible en: www.sigmaaldrich.com
41. Burman MA, et al. FAAH inhibitor OL-135 disrupts contextual, but not auditory, fear conditioning in rats. *Behav Brain Res*. 2016; 308:1-5.
42. PubChem open chemistry database. OL-135 inhibitor. Bethesda. PubChem open chemistry database. 2017. Disponible en: www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov

43. Cayman Chemical. JZL-195 Inhibitor. Michigan: Cayman Chemical. 2017. Disponible en: www.caymanchem.com.
44. Condreay JP, Witherspoon SM, Clay WC, Kost TA. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci*.1997; 96: 127–132.
45. Capecchi MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*. 1980; 22: 479–488.
46. Ryan JA. *Subculturing Monolayer Cell Cultures*. Boston: Corning Incorporated Life Sciences. 2011.
47. Richard G, et al. Media and Groeth Requirements. *Basic Methos*. 1978; 14: 11.
48. Arora M. *Cell Culture Media: A Review*. University of Pittsburgh Medical Center. 2013; 3:175.
49. Sigma- Aldrich. *Cell Culture*. Sigma- Aldrich.2017. Disponible en: www.sigmaaldrich.com
50. Riss LT, et al. *Cell Viability Assays*. Assay Guidance Manual. Wisconsin; 2016.
51. Abcam. *MTS Cell Proliferación Assay Kit*. Massachusetts. 2017. Disponible en <http://www.abcam.com>
52. Mahmood T, Yang PC. *Westener Blot: Technique, Theory and Trouble Shooting*. North American Journal of Medical Sciences. 2012, 4(9): 429-434.
53. Blancher C, Jones A. *SDS-PAGE and Western Blotting Techniques*. New Jersey: Humana Press Inc.; 2001.
54. Thompson LE, *Cell Growth Protocol for U-87 cell line*. Hudson Alpha; 2009.
55. Posimo MJ, et al. *Viability Assays for Cells in Culture*. *Journal of Visualized Experiments*. 2014; 83:1-14.
56. Phelan CM. *Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture*. *Current Protocols in Cytometry*.2006; 36.
57. Sancho R, et al. *Anandamide Inhibits Nuclear Factor-kB Activation through a Cannbinoid Receptor-Independent Pathway*. *Molecular Pharmacology*. 2002; 63(2):429-437.

58. Tapani E, et al. Toxicity of Ethanol in low concentrations. *Acta Radiologica*. 1996; 37:923-926.
59. Xie Y, Bergstrom T, et al. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *Elsevier*. 2015; 2:1351-1363.
60. Contassot E, et al. Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Elsevier*. 2004; 182-188.
61. Sören VS, et al. The endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol induces death of hepatic stellate cell via mitochondrial reactive oxygen species. *The faseb Journal*. 2017; 21(11): 2798-2806.
62. Zhang J, et al. Monoacylglycerol Lipase: A novel potential therapeutic target and prognostic indicator for Hepatocellular Carcinoma. *Scientific Reports*. 2016; 1-13.
63. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, et al. Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Elsevier*. 2013; 21: 5188-5197.
64. Varvel SA, et al. Fatty Acide Amide Hydrolase (-/-) Mice Exhibit an Increased sensivity to the disruptive Effects of anandamide or Oleamide in Working Memory wáter maze task. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006; 317(1): 261-267.
65. Hejazi N. 9-Tetrahydrocannabinol and Endogenous Cannabinoid Anandamide Directly Potentiate the Function of Glycine Receptors. *Molecular Pharmacology*. 2006; 69:991-997.
66. Gonsiorek W, et al. Endocannabinoid 2-Arachidonyl Glycerol Is a Full Agonist Through Human Type 2 Cannabinoid Receptor: Antagonism by Anandamide. *.Molecular Pharmacology*. 2000; 57:1045-1050.
67. Ciaglia E, et al. Cannabinoid receptor CB1 regulates STAT3 activity and its expression dictates the responsiveness to SR141716 treatment in human glioma patients' cells. 2015; 6(17): 15464-15481.
68. Ryan J, et al. Understanding and managing cell culture contamination. Massachusetts: Corning Incorporated Life Sciences. 2000.
69. Hong X, et al. Serum proteins are extracted along with monolayer cells in plasticware and interfere with protein analysis. *HHS Author manuscript*. 2016; 3(4): 1-12.

70. Ryan J, et al. Subculturing Monolayer Cell Cultures. Massachusetts: Corning Incorporated Life Sciences. 2000.
71. Reggio HP. Endocannabinoid Binding to the Cannabinoid Receptors: What Is Known and What Remains Unknown. *Med Chem.* 2010; 17(14): 1468–1486.
72. Neubig RR, et al. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacological reviews.* 2003; 55: 597-606.
73. Chen X, et al. Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol protects neurons against β -amyloid insults. *US National Library of Medicine National Institutes of Health.* 2011; 31: 159-168.
74. Kinsey SG, et al. Repeated low-dose administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 retains cannabinoid receptor type 1-mediated antinociceptive and gastroprotective effects. 2013; 345(3): 492-501.
75. Woodhams SG, et al. Spinal administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 produces robust inhibitory effects on nociceptive processing and the development of central sensitization in the rat. *US National Library of Medicine National Institutes of Health.* 2012; 167(8):1609-1619.
76. Kerr DM, et al. The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 attenuates LPS-induced increases in cytokine expression in the rat frontal cortex and plasma: differential mechanisms of action). . *US National Library of Medicine National Institutes of Health.* 2013; 169(4):808-819.
77. Thors L, et al. Biochanin A, a naturally occurring inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *British Journal of Pharmacology.* 2010; 160(3): 549-560.
78. Baggerlaar PM, et al. A highly selective, reversible inhibitor identified by comparative chemoproteomics modulates diacylglycerol lipase activity in neurons. *HHS Author manuscript.* 2015; 137(27):8851-8857.
79. Kofman E. Simulación de Sistemas Continuos. Laboratorio de Sistemas Dinámicos. Rosario: Universidad Nacional de Rosario. 2006.

80. Compusyn [homepage en Internet]. Massachusetts: Compusyn for Drug Combinations and for General Dose-Effect Analysis. 2017 [actualizada 22 enero 2017; consultada 22 enero 2017]. Disponible en www.combosyn.com.



ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1: Concentración celular ensayo MTS

Numero de celulas	Repeticiones					Average	D.S	% D.S
	Absorbancias							
5000	0.905	0.912	0.922	0.926	0.946	0.9222	0.015659	1.69799
10000	1.25	1.328	1.327	1.278	1.334	1.3034	0.037401	2.869459
15000	1.508	1.513	1.494	1.502	1.551	1.5136	0.022075	1.458435
20000	1.605	1.498	1.543	1.696	1.598	1.588	0.074461	4.689005
25000	1.611	1.622	1.698	1.514	1.598	1.6086	0.065649	4.081131

Anexo 2: Concentración celular ensayo MTS

Numero de celu	Repeticiones					Average	D.S	% D.S
	Absorbancia							
5000	1.114	1.092	1.106	1.109	1.088	1.1018		
10000	1.323	1.355	1.363	1.362	1.349	1.3504		
15000	1.555	1.636	1.668	1.611	1.438	1.5816		
20000	1.609	1.727	1.769	1.723	1.652	1.696		
25000	1.669	1.707	1.727	1.721	1.695	1.7038		

Anexo 3: Concentración celular ensayo MTS

Numero de	Absorbancias				
5000	0.9782	1.002	1.0555	1.0175	1.017
10000	1.3021	1.3415	1.345	1.3344	1.3415
15000	1.5315	1.5745	1.581	1.5565	1.5896
20000	1.607	1.6125	1.656	1.6523	1.625
25000	1.69	1.7045	1.6578	1.6678	1.702

Anexo 4: Tratamiento con Anandamida

1. Absorbancias a 490 nm del ensayo de MTS en células U87 tratadas con Anandamida después de 24 horas a diferentes concentraciones 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM . El vehículo es el control el cual no lleva droga. Se muestra los datos de las ensayo por cuadruplicado (5 pruebas por cada repetición).

Absorbancias de ensayo MTS de células tratadas con Anandamida					
Vehículo	Blanco	1 μM	3 μM	10 μM	30 μM
1.271	0.178	1.246	1.225	0.615	0.473
1.165	0.179	1.196	1.122	0.554	0.468
1.207	0.179	1.265	1.175	0.467	0.46
1.237	0.182	1.361	1.16	0.46	0.473
1.15	0.183	1.146	1.258	0.467	0.472
1.236	0.178	1.065	0.912	0.487	0.456
1.118	0.182	1.189	1.029	0.53	0.446
1.113	0.183	0.918	0.955	0.489	0.44
1.062	0.181	0.944	0.921	0.492	0.447
1.038	0.178	0.947	0.97	0.471	0.453
1.269	0.177	1.159	1.121	0.697	0.462
1.303	0.182	1.251	1.235	0.668	0.465
1.207	0.182	1.314	1.302	0.566	0.449
1.194	0.183	1.363	1.297	0.63	0.461
1.281	0.181	1.34	1.551	0.605	0.46
1.15	0.185	1.036	0.953	0.578	0.508
1.159	0.185	1.209	1.094	0.55	0.497
1.179	0.186	1.639	1.553	0.489	0.487
1.158	0.184	1.392	1.283	0.493	0.497
1.22	0.187	1.129	1.27	0.531	0.494

2. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida por 24 horas a diferentes concentraciones.

Porcentaje de las absorbancias de MTS de células tratadas con Anandamida					
Vehículo	Blanco	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M
107.18	0.183	105.07	103.3	51.86	39.89
98.24	0.181	100.86	94.62	46.72	39.47
101.78	0.178	106.67	99.09	39.38	38.79
104.31	0.177	114.77	97.82	38.79	39.89
96.98	0.182	96.64	106.08	39.38	39.8
104.23	0.182	89.81	76.91	41.07	38.45
94.28	0.183	100.27	86.77	44.69	37.61
93.86	0.181	77.41	80.53	41.24	37.1
89.56	0.179	79.61	77.67	41.49	37.69
87.53	0.179	79.86	81.8	39.72	38.2
107.01	0.182	97.74	94.53	58.78	38.96
109.88	0.183	105.49	104.14	56.33	39.21
101.78	0.178	110.81	109.79	47.73	37.86
100.69	0.182	114.94	109.37	53.13	38.88
108.02	0.183	113	130.79	51.02	38.79
96.98	0.181	87.36	80.36	48.74	42.84
97.74	0.187	101.95	92.25	46.38	41.91
99.42	0.179	138.21	130.96	41.24	41.07
97.65	0.179	117.38	108.19	41.57	41.91
102.88	0.184	95.21	107.1	44.78	41.66

Anexo 5: Tratamiento con 2-araquidonilglicerol

1. Absorbancias a 490 nm del ensayo de MTS en células U87 tratadas con 2-Araquinodilglicerol después de 24 horas a diferentes concentraciones 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M y 100 μ M. El vehículo es el control el cual no lleva droga. Se muestra los datos de las ensayo por cuadruplicado (5 pruebas por cada repetición).

Absorbancias de ensayo MTS de células tratadas con 2-Araquinodilglicerol						
Vehículo	Blanco	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
1.396	0.182	1.242	1.098	1.199	0.959	0.548
1.314	0.183	1.442	1.189	1.096	0.799	0.522
1.437	0.181	1.375	1.304	1.033	0.732	0.508
1.323	0.179	1.482	1.261	0.942	0.822	0.509
1.309	0.179	1.342	1.23	0.9	0.858	0.535
1.161	0.182	0.979	0.919	0.927	0.874	0.652
1.09	0.183	1.052	0.963	0.888	0.805	0.629
1.009	0.178	0.998	1.06	1.155	0.922	0.606
0.972	0.182	1.112	1.202	1.085	0.826	0.56
1.046	0.179	1.019	0.955	0.961	0.696	0.64
1.261	0.182	1.207	1.136	1.11	0.918	0.585
1.347	0.183	1.29	1.352	1.451	0.914	0.557
1.253	0.178	1.249	1.346	1.221	1.024	0.552
1.227	0.182	1.451	1.628	1.201	0.99	0.538
1.168	0.182	1.216	1.166	0.936	0.915	0.511
1.084	0.183	0.926	0.88	0.859	0.737	0.558
1.107	0.181	0.892	0.943	0.767	0.705	0.473
1.045	0.185	0.908	0.9	0.751	0.724	0.49
1.054	0.178	0.941	0.886	0.722	0.636	0.466
1.064	0.182	0.964	1.002	0.867	0.65	0.504

2. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con 2- Araquinodilglicerol por 24 horas a diferentes concentraciones.

Porcentaje de las absorbancias de MTS de células tratadas con 2-Araquinodilglicerol					
Vehículo	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M
117.9702	104.9563	92.78743	101.3225	81.04111	46.30921
111.0407	121.8574	100.4775	92.61841	67.52018	44.11205
121.4349	116.1955	110.1956	87.29455	61.85828	42.92897
111.8012	125.2377	106.5619	79.60451	69.46381	43.01348
110.6182	113.4069	103.9422	76.05527	72.50602	45.21063
98.11129	82.73123	77.66088	78.33692	73.85811	55.09782
92.11138	88.90016	81.37914	75.0412	68.02721	53.15418
85.2664	84.33684	89.5762	97.60426	77.9144	51.21055
82.13969	93.97051	101.576	91.68885	69.80183	47.32328
88.39312	86.11146	80.70309	81.21012	58.81607	54.08375
106.5619	101.9986	95.99865	93.8015	77.57637	49.43592
113.8294	109.0125	114.2519	122.618	77.23835	47.06976
105.8858	105.5478	113.7449	103.1816	86.53399	46.64723
103.6887	122.618	137.5755	101.4915	83.66079	45.46415
98.70284	102.7591	98.53382	79.09748	77.32285	43.18249
91.60434	78.25242	74.36515	72.59053	62.28081	47.15427
93.54798	75.37922	79.68902	64.81599	59.57663	39.97127
88.30862	76.73131	76.05527	63.46389	61.18224	41.40787
89.06917	79.52001	74.87218	61.01323	53.74572	39.37973
89.91423	81.46364	84.67486	73.26657	54.9288	42.59095

Anexo 6: IC 50 Anandamida

IC 50 AEA	
	log[AEAt], mM
Vehículo	0
1 μ M	-0.52288
3 μ M	0.477121
10 μ M	1
30 μ M	1.477121

Anexo 7: IC 50 2- Araquinodilglicerol

IC 50 2-AG	
	log[Agonist], M
	0
	0.477121
	1
	1.477121
	2

Anexo 8: Tratamiento con Inhibidor JZL-184

1. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con JZL-184 y 2- Araquinodilglicerol por 24 horas a diferentes concentraciones.

Porcentaje de las absorbancias de MTS de células tratadas con JZL 184 y 2-Araquinodilglicerol						
Vehículo	2-AG 10 µM	JZL-184 10 µM	JZ-184 0.3 µM + 2-AG 10 µM	JZ-184 1 µM + 2- AG 10 µM	JZ-184 3 µM + 2- AG 10 µM	JZ-184 10 µM + 2-AG 10 µM
88.548	77.828	79.921	72.944	75.354	65.586	55.882
99.204	79.097	70.470	85.123	84.298	69.899	55.755
106.816	90.641	75.545	84.996	82.332	73.261	43.386
104.849	95.144	70.914	75.798	76.877	75.101	50.617
104.849	91.466	41.737	76.179	80.365	80.873	61.717
85.820	86.962	89.753	66.284	68.885	64.127	51.695
89.880	88.484	91.022	73.008	73.261	64.825	53.091
92.544	74.086	94.954	86.264	81.761	70.724	54.803
101.170	82.839	95.081	84.869	79.287	77.257	46.430
100.663	79.160	98.570	80.809	82.395	81.000	59.814
78.970	78.462	73.452	68.314	71.422	65.523	43.069
95.842	82.903	73.134	76.369	77.321	71.231	52.964
117.789	104.595	69.646	98.379	87.216	80.429	56.770
117.408	107.323	75.735	97.872	96.350	68.441	56.579
93.812	98.253	75.672	68.821	79.985	73.769	61.146
95.081	87.279	103.327	77.194	64.698	67.553	57.214
113.666	95.398	104.976	86.645	76.242	71.358	54.486
123.244	101.551	96.920	85.693	87.723	77.828	52.203
97.809	80.238	103.327	81.951	73.452	73.388	52.837
92.036	85.567	107.577	83.410	82.141	69.011	66.157

Absorbancias de ensayo MTS de células tratadas con JZL-184 y 2-Araquinodilglicerol						
Vehículo	2-AG 10 μM	JZL-184 10 μM	JZ-184 0.3 μM + 2-AG 10 μM	JZ-184 1 μM + 2- AG 10 μM	JZ-184 3 μM + 2- AG 10 μM	JZ-184 10 μM + 2-AG 10 μM
1.396	1.227	1.26	1.15	1.188	1.034	0.881
1.564	1.247	1.111	1.342	1.329	1.102	0.879
1.684	1.429	1.191	1.34	1.298	1.155	0.684
1.653	1.5	1.118	1.195	1.212	1.184	0.798
1.653	1.442	0.658	1.201	1.267	1.275	0.973
1.353	1.371	1.415	1.045	1.086	1.011	0.815
1.417	1.395	1.435	1.151	1.155	1.022	0.837
1.459	1.168	1.497	1.36	1.289	1.115	0.864
1.595	1.306	1.499	1.338	1.25	1.218	0.732
1.587	1.248	1.554	1.274	1.299	1.277	0.943
1.245	1.237	1.158	1.077	1.126	1.033	0.679
1.511	1.307	1.153	1.204	1.219	1.123	0.835
1.857	1.649	1.098	1.551	1.375	1.268	0.895
1.851	1.692	1.194	1.543	1.519	1.079	0.892
1.479	1.549	1.193	1.085	1.261	1.163	0.964
1.499	1.376	1.629	1.217	1.02	1.065	0.902
1.792	1.504	1.655	1.366	1.202	1.125	0.859
1.943	1.601	1.528	1.351	1.383	1.227	0.823
1.542	1.265	1.629	1.292	1.158	1.157	0.833
1.451	1.349	1.696	1.315	1.295	1.088	1.043

2. Absorbancias a 490 nm del ensayo de MTS en células U87 tratadas con JZL-184 y 2-Araquinodilglicerol después de 24 horas a diferentes concentraciones de JZL 184 0.3

μM , 1 μM , 3 μM y 10 μM con una concentración fija de 10 μM de 2-Araquinodilglicerol. El vehículo es el control el cual no lleva droga. Se muestra los datos de las ensayo por cuadruplicado (5 pruebas por cada repetición).

Anexo 9: Tratamiento con Inhibidor OL-135

1. Absorbancias a 490 nm del ensayo de MTS en células U87 tratadas con OL-135 y Anandamida después de 24 horas a diferentes concentraciones de OL-135 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM con una concentración fija de 3 μM de Anandamida. El vehículo es el control el cual no lleva droga. Se muestra los datos de las ensayo por cuadruplicado (5 pruebas por cada repetición).



2.

Absorbancias de ensayo MTS de células tratadas con OL-135 y Anandamida						
Vehículo	AEA 3 μM	OL-135 30 μM	OL-135 1 μM + AEA 3 μM	OL-135 3 μM + AEA 3 μM	OL-135 10 μM + AEA 3 μM	OL-135 30 μM + AEA 3 μM
1.19	1.098	0.771	1.098	1.093	1.018	0.762
1.168	0.942	0.706	1.162	1.288	1.145	0.722
1.003	0.795	0.727	1.224	1.278	1.106	0.778
1.302	0.912	0.711	1.079	1.338	1.057	0.778
1.212	0.818	0.845	1.392	1.269	1.198	0.777
1.304	1.112	0.8	1.471	1.057	1.135	0.754
1.274	1.214	0.732	1.316	1.239	1.052	0.753
1.246	1.218	0.804	1.296	1.267	1.259	0.779
1.343	1.32	0.811	1.401	1.146	1.354	0.792
1.316	1.38	0.958	1.297	1.249	1.284	0.911
1.429	1.485	0.98	1.138	1.071	1.111	0.957
1.078	1.311	0.908	1.29	1.258	1.262	0.936
1.363	1.092	0.857	1.566	1.411	1.274	0.922
1.064	1.189	0.951	1.378	1.441	1.425	0.918
1.286	1.073	0.974	1.311	1.286	1.285	0.843
1.434	1.304	0.837	1.083	1.085	1.011	0.991
1.668	1.387	1.094	1.235	1.287	1.108	0.92
1.626	1.458	1.165	1.504	1.432	1.251	0.925
1.482	1.587	0.905	1.562	1.569	1.423	0.937

Anexo 10: Tratamiento con Combinación de Anandamida y 2-araquidonilglicerol

1. Absorbancias a 490 nm del ensayo de MTS en células U87 tratadas con Anandamida y 2- Araquidonilglicerol después de 24 horas a diferentes concentraciones de 2- Araquidonilglicerol 1 μM , 3 μM , 10 μM y 30 μM con una concentración fija de 10 μM de Anandamida. El vehículo es el control el cual no lleva droga. Se muestra los datos de las ensayo por cuadruplicado (5 pruebas por cada repetición).



Absorbancias de ensayo MTS de células tratadas con Anandamida y 2-Araquinodilglicerol						
Vehículo	AEA 10 μM	2-AG 30 μM	AEA 10 μM +2- AG 1 μM	AEA 10 μM + 2- AG 3 μM	AEA 10 μM + 2- AG 10 μM	AEA 10 μM +2 - AG 30 μM
1.423	0.658	1.202	0.596	0.529	0.487	0.481
1.408	0.845	1.314	0.71	0.51	0.485	0.485
1.473	0.743	1.302	0.818	0.658	0.543	0.48
1.43	0.774	1.079	0.639	0.64	0.514	0.478
1.259	0.647	1.1	0.763	0.649	0.564	0.478
1.423	0.75	1.049	0.673	0.643	0.549	0.482
1.347	0.707	1.225	0.614	0.481	0.483	0.482
1.419	0.621	1.151	0.616	0.466	0.472	0.48
1.458	0.585	1.094	0.587	0.483	0.483	0.474
1.51	0.705	1.169	0.585	0.538	0.542	0.47
1.445	0.751	1.233	0.741	0.645	0.631	0.483
1.333	0.714	1.203	0.664	0.55	0.483	0.482
1.406	0.638	1.088	0.696	0.548	0.471	0.483
1.408	0.646	1.05	0.567	0.508	0.487	0.476
1.459	0.748	1.155	0.655	0.583	0.517	0.485
1.484	0.77	1.182	0.763	0.718	0.687	0.504
1.587	0.771	1.255	0.673	0.575	0.501	0.505
1.595	0.801	1.358	0.706	0.497	0.509	0.491
1.535	0.824	1.514	0.786	0.706	0.546	0.491
1.532	0.769	1.294	0.791	0.629	0.555	0.506

2. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida y 2- Araquinoilglicerol por 24 horas a diferentes concentraciones.

Porcentaje de las absorbancias de MTS de células tratadas con Anandamida y 2- Araquinoilglicerol						
Vehículo	AEA 10 μM	2-AG 30 μM	AEA 10 μM +2- AG 1μM	AEA 10 μM + 2- AG 3μM	AEA 10 μM + 2- AG 10μM	AEA 10 μM +2 - AG 30μM
98.36179	45.48282	83.08564	41.19721	36.56598	33.66282	33.24808
97.32494	58.40879	90.8274	49.07721	35.25264	33.52457	33.52457
101.8179	51.35826	89.99792	56.54248	45.48282	37.5337	33.17896
98.84565	53.50107	74.58353	44.16949	44.23861	35.52914	33.04071
87.02564	44.72247	76.03512	52.74072	44.86072	38.98528	33.04071
98.36179	51.84212	72.50985	46.51966	44.44598	37.94843	33.3172
93.10845	48.86984	84.67547	42.44142	33.24808	33.38633	33.3172
98.0853	42.92528	79.56038	42.57966	32.21124	32.62598	33.17896
100.7811	40.43686	75.62038	40.5751	33.38633	33.38633	32.76422
104.3755	48.7316	80.80459	40.43686	37.18808	37.46457	32.48773
99.88249	51.91125	85.22845	51.22002	44.58422	43.6165	33.38633
92.14073	49.3537	83.15476	45.89756	38.01756	33.38633	33.3172
97.1867	44.10036	75.20564	48.10949	37.87931	32.55685	33.38633
97.32494	44.65335	72.57897	39.19265	35.1144	33.66282	32.90247
100.8502	51.70388	79.83687	45.27546	40.29861	35.7365	33.52457
102.5783	53.22458	81.70319	52.74072	49.63019	47.48738	34.83791
109.6979	53.2937	86.74915	46.51966	39.74563	34.63054	34.90703
110.2509	55.36739	93.8688	48.80072	34.35405	35.18352	33.93931
106.1035	56.95721	104.652	54.33054	48.80072	37.74107	33.93931
105.8962	53.15546	89.44495	54.67616	43.47826	38.36317	34.97615

Anexo 11: Tratamiento con inhibidor JZL-195

1. Absorbancias a 490 nm del ensayo de MTS en células U87 tratadas con Anandamida, 2-Araquinodilglicerol y JZL-195 después de 24 horas a diferentes concentraciones JZL-195 0.3 μM , 1 μM , 3 μM y 10 μM con una concentración fija de 10 μM de Anandamida y 30 μM de 2- Araquinodilglicerol . El vehículo es el control el cual no lleva droga. Se muestra los datos de las ensayo por triplicado (5 pruebas por cada repetición).



Absorbancias de ensayo MTS de células tratadas con Anandamida, 2-Araquinodilglicerol y JZL-195							
Vehículo	AEA 10 μM	2-AG 30 μM	JZL-195 10 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 0.3 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 1 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 3 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 10 μM
1.178	0.362	0.48	1.233	0.315	0.271	0.27	0.279
1.102	0.283	0.505	1.128	0.274	0.273	0.273	0.278
1.201	0.272	0.443	1.147	0.272	0.272	0.275	0.278
1.207	0.265	0.626	1.042	0.279	0.278	0.275	0.28
1.248	0.287	0.665	1.166	0.29	0.278	0.279	0.282
1.238	0.277	0.474	1.067	0.334	0.272	0.272	0.298
1.181	0.263	0.462	1.064	0.271	0.27	0.273	0.279
1.248	0.267	0.573	1.063	0.268	0.267	0.267	0.273
1.247	0.266	0.565	1.191	0.273	0.269	0.269	0.275
1.305	0.292	0.544	1.281	0.276	0.278	0.276	0.279
1.031	0.432	0.413	1.045	0.399	0.36	0.363	0.38
1.066	0.361	0.335	1.136	0.43	0.315	0.283	0.34
1.086	0.278	0.446	1.285	0.355	0.275	0.277	0.275
1.136	0.328	0.593	1.329	0.27	0.271	0.273	0.298
1.221	0.343	0.656	1.214	0.427	0.281	0.309	0.366

2. Porcentaje de viabilidad de células U87 tratadas con Anandamida, 2-Araquinodilglicerol y JZL-195 por 24 horas a diferentes concentraciones.

Porcentaje de las absorbancias de MTS de células tratadas con Anandamida, 2-Araquinodilglicerol y JZL-195							
Vehículo	AEA 10 μM	2-AG 30 μM	JZL-195 10 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 0.3 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 1 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 3 μM	AEA 10 μM + 2- AG 30 μM + JZL-195 10 μM
99.85871 72	30.68663 46	40.68946 03	104.5210 51	26.70245 83	22.97259 11	22.88782 14	23.65074 88
93.41621 93	23.98982 76	42.80870 3	95.62023 17	23.22690 03	23.14213 05	23.14213 05	23.56597 91
101.8084 2	23.05736 08	37.55298 11	97.23085 62	23.05736 08	23.05736 08	23.31167	23.56597 91
102.3170 39	22.46397 29	53.06583 78	88.33003 67	23.65074 88	23.56597 91	23.31167	23.73551 85
105.7925 97	24.32890 65	56.37185 65	98.84148 06	24.58321 56	23.56597 91	23.65074 88	23.90505 79
104.9449	23.48120 94	40.18084 2	90.44927 95	28.31308 28	23.05736 08	23.05736 08	25.26137 33
100.1130 26	22.29443 35	39.16360 55	90.19497 03	22.97259 11	22.88782 14	23.14213 05	23.65074 88
105.7925 97	22.63351 23	48.57304 32	90.11020 06	22.71828 2	22.63351 23	22.63351 23	23.14213 05
105.7078 27	22.54874 26	47.89488 56	100.9607 23	23.14213 05	22.80305 17	22.80305 17	23.31167
110.6244 7	24.75275 5	46.11472 17	108.5899 97	23.39643 97	23.56597 91	23.39643 97	23.65074 88