



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LOS AGONISTAS CANNABINOIDES EN UN
MODELO TUMORAL GÁSTRICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VÍCTOR MANUEL GARCÍA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. ALETTE ORTEGA GÓMEZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Con amor para mi madre María Antonia Hernández Solís, una mujer fuerte, sabia y llena de alegría . Por apoyarme y darme el amor más puro del mundo, por sus enseñanzas y comprensión en cada etapa de mi vida, sin ella no sería esto posible. Te amo Mamá.

A mi hermana Karina García por su compañía, su apoyo y sus lecciones en etapas tempranas de mi vida, te quiero mucho hermanita.

Muchas gracias Dra. Alette Ortega Gómez por sus enseñanzas a lo largo de tres años. Dr. Abel Santamaría por ser una inspiración profesional, académica y personal.

Agradezco al Instituto Nacional de Cancerología, a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por formar parte de ellas.

“I believe that kind of stimulating environment, with the necessary “critical mass” of young and talented investigators, with the opportunity for the free exchange of ideas, is an important ingredient in the making of scientific progress” .

EARL W. SUTHERLAND

Nobel Lecture, December 11, 1971

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto Nacional de Cancerología

Papel de los agonistas cannabinoides en un modelo tumoral gástrico.

Página.

LISTA DE ABREVIATURAS	6
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Incidencia y Mortalidad del Cáncer Gástrico.....	13
1.2 Fisiopatología y Biomarcadores en Cáncer Gástrico.....	13
1.3 Cannabinoides.....	14
1.3.1 Clasificación de los cannabinoides.....	14
1.3.2 Sistema Endocannabinoide.....	17
1.3.3 Metabolismo de Endocannabinoides.....	19
1.3.4 Vías de Transducción en el Sistema Endocannabinoide.....	21
2. ANTECEDENTES.....	24
2.1 Cannabinoides y Cáncer.....	24
2.2 Mecanismos antitumorales de los cannabinoides.....	25
2.3 Cannabinoides en cáncer gástrico.....	28
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. HIPÓTESIS.....	30
5. OBJETIVOS.....	31

5.1	Objetivos General.....	31
5.2	Objetivos Particulares.....	31
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1	Cultivo Celular.....	32
6.2	Reactivos.....	32
6.3	Tratamiento con los Agonistas Cannabinoides.....	33
6.4	Evaluación Morfológica.....	33
6.5	Ensayo de Viabilidad por MTT.....	33
6.6	Evaluación de la Fragmentación del DNA por Laddering.....	34
6.7	Análisis de Muerte Celular por Citometría de Flujo.....	35
6.8	Análisis Estadístico.....	37
7.	RESULTADOS.....	36
7.1	Cambios Morfológicos en la línea celular AGS durante el tratamiento con los agonistas cannabinoides.....	36
7.2	Evaluación de la Viabilidad celular por MTT.....	40
7.3	Efectos en la fragmentación del DNA en la línea celular AGS gástrico, inducido por los agonistas Cannabinoides mediante el ensayo de Ladder.....	42
7.4	Evaluación de los mecanismos de muerte mediante Citometría de Flujo.....	44
8.	DISCUSIÓN.....	46
9.	CONCLUSIÓN.....	50
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Acido araquidónico
ACEA	2-araquidonoilcloroetanolamida
ABHD4	α,β -hidrolasa-4
AGS	Línea celular adenocarcinoma gástrico humano
AEA	Anandamida
AKT	Proteína cinasa B
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AMPK	Cinasa activada por monofosfato de adenosina
CBD	Cannabidiol
CB13	Cannabinoide CB13
CB-R	Receptor a cannabinoides
c-Fos	Proto-oncogen factor de transcripción c-Fos
cdk	Ciclina dependiente de cinasa
c-Jun	Gen c-Jun
COX-1/2	Ciclooxigenasa 1/2
DAG	Diacilglicerol
DAGL	Diacilglicerol lipasa
EGFR	Receptor a factor de crecimiento epidermal
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular
E2F	Factor de transcripción E2F
FAAH	Ácido graso aminohidrolasa
GDE-1	Glicerofosfodiesterasa-1
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GRP-78	Proteína reguladora de glucosa de 78 kDa
H_2O_2	Peroóxido de hidrógeno
IL-8	Interleucina 8
JNK	Cinasa c-Jun N-terminal
Krox-24	Factor de transcripción Krox 24
Meth- AEA	Meth-Anandamida

MAGL	Monoacilglicerol-lipasa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MMP	Metaloproteínas de matriz
mTOR	Mecanismo blanco de rampamicina
Nupr-1	Proteína reguladora transcripcional nuclear 1
NAPE-PLD	N-aciletanolaminas
NAT	N-aciltransferasas
NAE's	Fosfolipasa D específica a N-acilfosfatidiletanolamina
NArPE	N-araquidonoilfosfatidiletanolamina
PC	Fosfatidil colina
PE	Fosfatidil etanolamina
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PPAR	Receptor de los activadores de proliferación de peroxisomas
pRb	Proteína retinoblastoma
p38	Polipeptido de 82 aminoácidos
p8	Cinasa de estrés p38
p53	Gen de la proteína supresora de tumor
R.E	Retículo endoplásmico
RTK	Receptor tirosina cinasa
THC	Δ 9-tetrahidrocanabinol
SPT	Palmitoilserintransferasa
STS	Estaurosporina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TRIB-3	Pseudocinasa tribbles-3
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionada a TNF
TRVP1	Receptor de potencial transitorio V1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α

VGFR	Receptor a factor de crecimiento vascular
2-AG	2- acilglicerol
7-AAD	7 Aminoactinomicina D

LISTA DE FIGURAS Y TALBLAS

Tabla 1.	Representación y clasificación de ciertos cannabinoides con sus funciones farmacológicas más importantes.....	16
Figura 1.	Sistema endocannabinoide.....	18
Figura 2.	Componentes moleculares que conforman al sistema endocannabinoide.....	20
..
Figura 3.	Vías de señalización que inhiben los cannabinoides en células tumorales para conducir a muerte celular.....	27
Figura 4.	Microfotografías de contraste representativas que muestran los cambios morfológicos de la Anandamida (AEA) a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 and 5 μ M) en la morfología de la línea celular gástrica AGS expuesta a diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).....	37
Figura 5.	Microfotografías de contraste representativas que muestran los cambios morfológicos de la (R)-(+)-Methanandamide (Meth-AEA) a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 and 5 μ M)en la morfología de la línea celular gástrica AGS expuesta a diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).....	38
Figura 6.	Microfotografías de contraste representativas que muestran los cambios morfológicos de la (R)-(+)-Methanandamide (Meth-AEA) a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 y 5 μ M) en la morfología de la línea celular gástrica AGS expuesta a diferentes periodos de tiempo (24, 48 y 72 h).....	39

Figura 7. Efecto de los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 sobre la viabilidad celular en la línea gástrica humana AGS mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT).....	41
Figura 8. Ensayo de fragmentación del DNA y evaluación de los mecanismos de muerte en la línea tumoral AGS human.....	43
Figura 9. Análisis por Citometría de Flujo (Flow Jo Software).....	45

RESUMEN

El estudio de los cannabinoides es ampliamente conocido en diversas líneas celulares, dichos agentes junto con sus receptores localizados en la membrana celular, conforman el sistema endocannabinoide y se ha visto que dicho sistema modula diversos procesos celulares. En este estudio se compararon los efectos de tres diferentes agonistas cannabinoides, Anandamida (AEA), Meth-anandamida, (Meth-AEA) y CP-55,940 (CP) en la línea tumoral gástrica humana (AGS) a diferentes concentraciones y distintos periodos de tiempo con el fin de evaluar cambios en la morfología, pérdida de la viabilidad y eventos de muerte. Los tres agentes probados, mostraron efectos dependientes de la concentración en la inducción de los cambios morfológicos, en la disminución de la viabilidad y en los eventos de muerte en la línea celular AGS. El análisis de los diferentes ensayos realizados, sugiere que AEA Y CP-55,940 son efectivos para inducir apoptosis, mientras que Meth-AEA es efectivo para inducir muerte tardía. A través de los resultados comparativos mostrados en este estudio, se confirma el potencial terapéutico que los agonistas cannabinoides ejercen en un modelo celular gástrico.

Palabras clave

Cáncer gástrico; Receptores a cannabinoides, Cannabinoides; Apoptosis; Actividad antiproliferativa; Agonistas cannabinoides.

ABSTRACT

The study of cannabinoids is widely known in various cell lines, such agents and their receptors are located on the cell membrane and they comprise the endocannabinoid system. This system modulates diverse cellular responses. In this study we tested and compared the effects of three different cannabinoid receptor agonists anandamide (AEA), (R)-(+)-methanandamide (Meth-AEA) and CP 55,940 (CP)- on gastric cancer cell morphology, viability and death events. The three agents tested exhibited similar concentration-dependent effects in the induction of changes in cell morphology and cell loss, as well as in the decrease of cell viability and DNA laddering in the human gastric adenocarcinoma cell line (AGS). Differences among the cannabinoids tested were mostly observed in the density of cells found in early and late apoptosis and necrosis, favoring AEA and CP as the more effective inducers of apoptotic mechanisms, and Meth-AEA as a more effective inducer of necrosis through transient and rapid apoptosis. Through a comparative approach, our results support and confirm the therapeutic potential that cannabinoid receptor agonists exert in gastric cancer cells.

Keywords.

Gastric cancer; Cannabinoids receptor, Cannabinoids; Apoptosis; antiproliferative activity; cannabinoid agonists.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Incidencia y Mortalidad del Cáncer Gástrico

El cáncer en el mundo, según datos del GLOBOCAN 2012 estima 14.1 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes (Torre *et al*, 2015). El cáncer gástrico se encuentra entre el 4° y 5° sitio en incidencia y mortalidad a nivel mundial. En México el cáncer gástrico es una de las neoplasias con mayor incidencia según datos de la Secretaría de Salud, ocupando el 4° sitio en incidencia y el 3° en mortalidad (Ruiz *et al*, 2015).

1.2 Fisiopatología y Biomarcadores en Cáncer Gástrico.

Los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer gástrico incluyen, la infección con *Helicobacter pylori* (Samperi & Mora, 2014), consumo de alcohol, tabaco, alimentos preservados, así como factores de género, raza y obesidad (Yoong *et al*, 2011). El factor de riesgo hereditario juega un papel importante, sin embargo, presenta una menor incidencia en el desarrollo de cáncer gástrico. Entre los factores hereditarios encontramos una inestabilidad microsatelital que resulta en errores en la replicación del DNA (Jin *et al*, 2015) y la identificación de mutaciones en genes clave (KRAS y CDH1) para el desarrollo y predisposición de cáncer gástrico (Martel *et al*, 2013). Estudios a nivel mundial sugieren algunos biomarcadores en cáncer gástrico, como son, el antígeno carcinoembrionario, mutaciones en genes supresores de tumores (p53), sobre expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP's), sobre actividad de moléculas inflamatorias (TNF- α , IL-8) y mutaciones en receptores a factores de crecimiento (EGFR) (Pérez *et al*, 2005; Sampieri *et al*, 2010; Rodrigues *et al*, 2010; Reyes *et al*, 2013; Hudler, 2012). Las terapias clínicas de primera elección para cáncer gástrico, están basadas en la cirugía, quimioterapia y radioterapia con el fin de remover el área afectada (Instituto Nacional de Cancerología; American Cancer Society). Actualmente se han desarrollado terapias dirigidas en cáncer gástrico, clasificadas en tres grupos dependiendo de su acción, en primer lugar los que actúan inhibiendo receptores a factores de crecimiento epidermales (EGFR), en segundo, los que inhiben receptores a factores de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y finalmente, los que aún

están siendo probados en estudios pre-clínicos y de fase I y II (Yoong *et al*, 2011), los cuales están dirigidos a suprimir mensajeros químicos intracelulares con actividad proliferativa (Ras, MAPK, PI3K).

1.3 Cannabinoides.

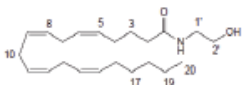
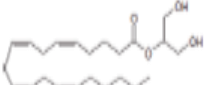
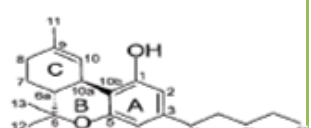
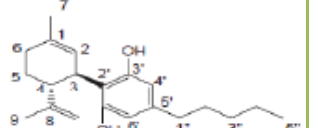
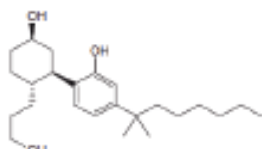
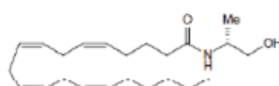
Los cannabinoides son un grupo de moléculas que derivan de compuestos terpenofenólicos, presentan una estructura química de 20 a 21 carbonos (Tabla 1), solubles en diversos disolventes orgánicos (Vinod, 2011), ellos son producidos en los pedúnculos foliados, tricomas y hojas de la planta *C. sativa* (Adams & Martin., 1996; Chakravarti *et al*, 2014; Galve *et al*, 2013; Vinod., 2011; Brown *et al*, 2013; Nikan *et al*, 2016). Se conocen aproximadamente 60 a 90 tipos de compuestos cannabinoides aislados de la planta (Velasco *et al*, 2012), los cuales activan distintas respuestas fisiológicas en la célula mediante sus receptores en la membrana plasmática (Brown *et al*, 2013; Chakravarti *et al*, 2014; Galve *et al*, 2013). El Δ^9 -tetrahidrocanabinol y sus derivados fueron los primeros agonistas cannabinoides en ser estudiados por sus efectos psicotrópicos en el sistema nervioso (Adams and Martin, 1996; Di Marzo & De Petrocellis, 2012; McAllister *et al*, 2002; Bifulco & Di Marzo, 2002).

1.3.1 Clasificación de los Cannabinoides

Los cannabinoides se clasifican en tres grupos (Tabla 1): los fitocannabinoides, que derivan de la planta *C. sativa*, los endocannabinoides, producidos de manera endógena por las células y finalmente los cannabinoides sintéticos, desarrollados en el laboratorio (Brown *et al*, 2013; Chakravarti *et al*, 2014; Nikan *et al*, 2016; Pertwee, 2010; Sarfaraz *et al*, 2008; Vinod, 2011). Los fitocannabinoides se caracterizan por inducir efectos psicoactivos y analgésicos, principalmente, mientras que los endocannabinoides ejercen efectos fisiológicos tales como, diferenciación, proliferación de células troncales, eventos reproductivos y neuroprotectores (Batista *et al*, 2012; Galve *et al*, 2013; Vinod., 2011).

Chakravarti y colaboradores, proponen una sub-clasificación dentro de los cannabinoides sintéticos basada en la estructura molecular de los agonistas (terpeno-fenólicos, dibenzopiranos o ecosanoides) y en la selectividad que estos presentan sobre los receptores cannabinoides (CB-R). La clasificación incluye: los cannabinoides clásicos, estos son desarrollados a partir de la extracción de la planta *C.sativa* y presentan una baja selectividad para ambos receptores; los cannabinoides no clásicos, que se caracterizan por presentar una estructura con anillos dibenzopiranos bicíclicos y tricíclicos análogos a la estructura del Δ^9 -THC, ellos presentan potente selectividad para ambos receptores; los aminoalquilindoles, compuestos puramente sintéticos que exhiben una mayor selectividad por el receptor CB₂ y los ecosanoides, ligandos sintetizados a partir de los endocannabinoides que presentan mayor selectividad por el receptor CB₁ (Chakravarti *et al*, 2014; Bosier *et al*, 2010; Pertwee, 2010).

Tabla 1. Representación y clasificación de ciertos cannabinoides con sus funciones farmacológicas más importantes (Cuadro modificado de B. Chakravarti., 2014)

Cannabinioide	Estructura	Funciones
Endocannabinoides		
Anandamida (AEA) CB1		Analgésico, antiemético, estimulante del apetito, inhibidor del crecimiento tumoral.
2-araquidonoilglicerol (2-AG) CB1/2		Analgésico, antiemético, estimulante del apetito, inhibidor del crecimiento tumoral.
Fitocannabinoides		
Δ^9 Tetrahidrocannabinol (Δ^9THC) CB1/2		Analgésico, antiemético, estimulante del apetito, inhibidor del crecimiento tumoral.
Cannabidiol (CB1/2)		Agente antitumoral, antiinflamatorio.
Sintéticos		
CP-55,940 (CP) CB1/2		Analgésico, antiemético, estimulante del apetito, inhibidor del crecimiento tumoral.
R-Met-anandamida (CB1)		Analgésico, antiemético, estimulante del apetito, inhibidor del crecimiento tumoral.

1.3.2 Sistema Endocannabinoide.

El sistema endocannabinoide está compuesto por dos receptores, denominados receptores cannabinoides (CB-R), de los cuales se han identificado dos tipos (CB₁ y CB₂), ligandos endógenos (Anandamida y el 2-acilglicerol) y enzimas de regulación, síntesis y degradación (Bosier *et al*, 2010; De petrocellis and Di Marzo, 2009; Pertwee, 2010; Van Dross *et al*, 2013; Velasco *et al*, 2016; Wang & Ueda, 2009). Los receptores cannabinoides son proteínas transmembranales acopladas a proteínas G_i (GPCR's) (Di Marzo & De Petrocellis, 2012) y se encuentran ampliamente distribuidos en todo el cuerpo (Bosier *et al*, 2010; Nikan *et al*, 2016) (Figura 1). El receptor CB₁ se expresa en mayor proporción en sistema nervioso central, preferentemente en el cerebro, hipocampo, ganglios basales y cerebelo (Grimaldi & Caspasso, 2011; Díaz and Ruiz, 2005; Sarfaraz *et al*, 2008). En tejidos periféricos, CB₁ se ha encontrado en el tracto gastrointestinal, urinario, pulmón, corazón, adipocitos y aparatos reproductores (testículo y ovario), mientras que el receptor CB₂ se asocia mayormente a tejidos del sistema inmune (Grimaldi & Caspasso, 2011; Bosier *et al*, 2010; Pertwee, 2010) y se expresa principalmente en órganos como son el bazo, el timo, en células sanguíneas y en microglía, además de localizarse en otros tipos de tejidos periféricos (Alexander *et al*, 2009; Wang & Ueda, 2009).

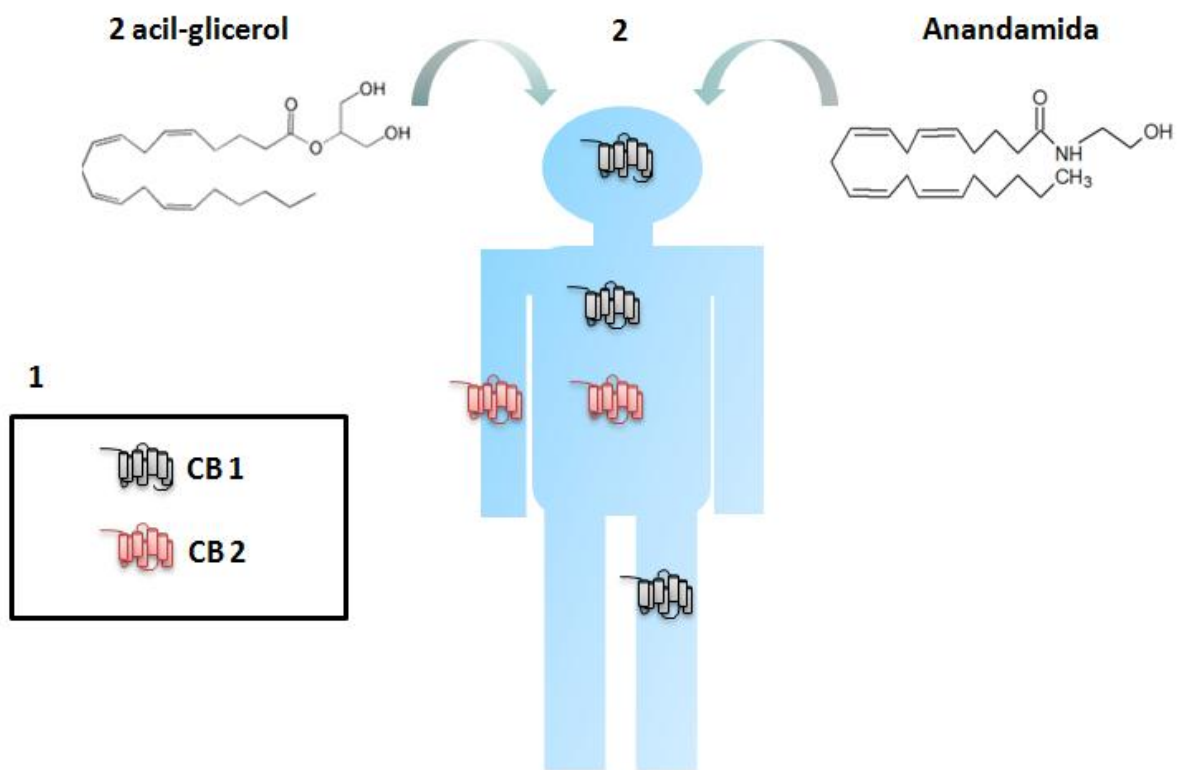


Figura 1. Sistema endocannabinoide. 1) Receptores CB_1 y CB_2 son activados por ligandos. 2) Los principales ligandos “endocannabinoide” Anandamida (AEA) y 2-Aciliglicerol (2-AG).

1.3.3 Metabolismo de Endocannabinoides.

Los endocannabinoides son moléculas lipídicas que contienen largas cadenas de ácidos grasos poliinsaturados, amidas, ésteres y éteres que derivan del ácido araquidónico (A.A) conjugado con etanolamida para anandamida (AEA) o glicerol para 2-acilglicerol (2-AG) (Bifulco *et al*, 2006). Ellos son sintetizados a demanda de la célula, en respuesta a estímulos fisiológicos o patológicos, a partir de precursores fosfolipídicos en la membrana plasmática, NArPE para anandamida (Di Marzo *et al*, 1994) y DAG's más araquidonoato para 2-acilglicerol (De Petrocellis & Di Marzo, 2009; Grimaldi & Capasso, 2011; Pisanti *et al*, 2013; Zogopoulos, 2015). Dicha síntesis se lleva a cabo por la acción de enzimas sensibles a Ca^{2+} , lo cual implica un aumento en los niveles de calcio intracelular (Di Marzo & De Petrocellis, 2009; Wang & Ueda, 2009; Galve *et al*, 2013).

En la figura 2 se representa el metabolismo de los dos principales agonistas endocannabinoides (AEA y 2-AG). Anandamida (AEA) se produce básicamente por una reacción de araquidoilación, catalizada por una aciltransferasa (NAT) en donde el ácido araquidónico es transferido desde la posición *sn*-1 de un glicerofosfolipido, el fosfatidilcolina (PC), hacia el grupo amino del fosfatidil etanolamina (PE), formando al precursor (NArPE) . Dicha síntesis es una vía que involucra la transacilación y la actividad fosfodiesterasa (Maccarrone, 2002). NArPE es hidrolisada a anandamida mediante una fosfolipasa D selectiva a *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD). Sin embargo existen otras rutas alternativas de hidrolisis; estas son mediante la acción de una α,β -hidrolasa-4 (ABHD4), seguido de la acción de una glicerofosfodiesterasa-1 (GDE-1) que catalizan la conversión de NArPE en liso- NArPE y luego a glicero-anandamida, dando origen a anandamida. Otra de las rutas involucra la formación de NArPE mediante una fosfolipasa A (PLA) seguido de una transformación directa en AEA por una liso-fosfolipasa D (PLD) y por último, una ruta mediada por una fosfolipasa C (PLC) seguido de una activación de varias fosfatasas que convierten a NArPE en fosfo anandamida y posteriormente a anandamida (Batista *et al*, 2012; Brown *et al*, 2013; De Petrocellis and Di Marzo., 2009; Di Marzo and De Petrocellis; 2012; Fezza *et al*, 2014; Galve *et al*, 2013; Grimaldi & Caspasso, 2011; Hermanson & Marnett., 2011; Wang & Ueda, 2009). La síntesis de 2-AG inicia mediante un precursor lipídico *sn*-1-

acil-2-araquidonoilglicerol, el cual es convertido de manera directa a través de la acción de lipasas selectivas a DAG (DAGLs) α y β (Batista et al, 2012; Wang and Ueda, 2009).

La degradación de los endocannabinoides ocurre por hidrólisis enzimática de sus enlaces amida y éster, las principales enzimas que catalizan esta reacción son la amino hidrolasa de ácido graso (FAAH) para anandamida, y la monoacilglicerol- lipasa (MAGL) para 2-acilglicerol (De Petrocellis & Di Marzo, 2009; Maccarrone & Finazzi, 2003).

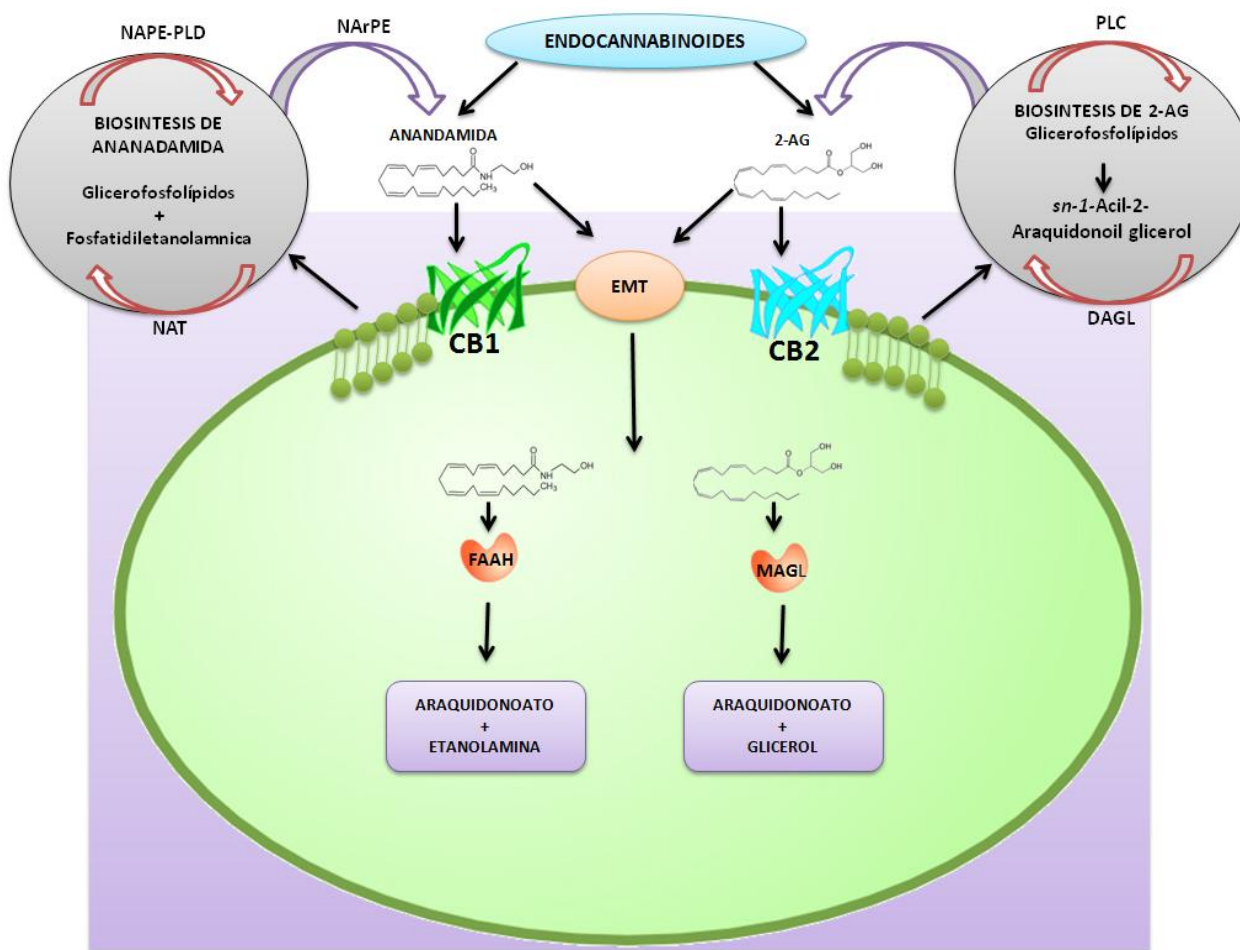


Figura 2. Componentes moleculares que conforman al sistema endocannabinoide. Receptores CB_1 y CB_2 son activados por ligandos endocannabinoides (AEA y 2-AG). Los endocannabinoides son producidos a demanda de la célula, ellos requieren de proteínas transportadoras (EMT) para atravesar la célula. La biosíntesis se lleva a cabo mediante las enzimas *N*-aciltransferasa (NAT), *N*-acilfosfatidiletanolamina (NAPE-PLD), diacilglicerol-lipasa (DAGL) y fosfolipasa C (PLC). La degradación se lleva a cabo mediante las enzimas ácido graso aminohidrolasa (FAAH) y monoacil glicerol lipasa (MAGL). (Esquema modificado de Malfitano *et al*, 2011).

1.3.3 Vías de Señalización de Endocannabinoides

El sistema endocannabinoide activa diversas vías de señalización en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. Dicha señalización fue descrita de manera inicial en el sistema nervioso, donde se observaron procesos de neuromodulación y neuroprotección (mediando la señalización de neurotransmisores excitadores o inhibitorios) (Mc Allister & Glass., 2002; Díaz & Ruiz., 2005). Estos procesos a nivel neuronal se ejercen constitutivamente mediante la estimulación de receptores cannabinoide que inactivan canales de calcio y aumentan la actividad de canales de potasio (De Petrocellis & Di Marzo., 2009; Dalton *et al*, 2014; Batista *et al*, 2012; Mc Allister & Glass., 2002). Lo anterior es un mecanismo de señalización regulado por moléculas como la adenilato ciclasa, fosfoinositol 3 cinasa y fosfolipasas.

Los receptores cannabinoide CB_1 y CB_2 son de tipo metabotrópico, acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (inhibitorias) (Bosier *et al*, 2010, Díaz & Ruiz., 2005). Dichos receptores activan mecanismos que regulan procesos biológicos en la célula, los cuales comprenden la diferenciación, proliferación, supervivencia, apoptosis y metabolismo energético celular, en muchos tipos celulares (e.g. células troncales, embrionarias, mesenquimales y somáticas), esto culmina con respuestas fisiológicas como son, procesos reproductivos, desarrollo embriionario, procesos inflamatorios y conductuales, principalmente (Batista *et al*, 2012; Bifulco *et al*, 2008; Bosier *et al*, 2010; Velasco *et al*, 2012; Mc Allister & Glass., 2002; Galve *et al*, 2013).

Algunas de sus funciones señalizadoras más importantes se describen a continuación. La inhibición en el aumento de AMPc inactiva a la cinasa A (PKA) asociada con la regulación en la expresión diferencial de genes implicados en diversas funciones energéticas y metabólicas de la célula. La vía MAPK-PI3K es un mecanismo de señalización por el cual se ha descrito que el sistema endocannabinoide modula eventos de diferenciación, supervivencia y proliferación, mediante la activación de cinasas de estrés (ERK, p38, JNK) o por la estimulación de ciertos efectores clásicos de la vía GPCR's, tales como la cinasa C (PKC) o mediante la cinasa A (PKA) (Diaz and Ruiz, 2005), induciendo una transactivación

de los receptores a factores de crecimiento (RTK's). Un ejemplo clásico de transactivación entre GPCR's y RTK's es la del receptor a factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Díaz & Ruiz, 2005; Dalton *et al*, 2014), mecanismo regulado no solo por segundos mensajeros, sino también por la liberación de proteínas precursoras membranales que activan RTK's o por la disociación de las subunidades de la proteína G heterotrimérica (Dalton *et al*, 2014; Díaz & Ruiz., 2005). A nivel núcleo, el sistema endocannabinoide activa algunos, factores de transcripción y/o moléculas de regulación, que ayudan a modular procesos celulares antes mencionados como son plasticidad neuronal (Krox-24), diferenciación celular y proliferación (c-Fos, c-Jun) (Díaz & Ruiz., 2005), inmunomodulación y respuesta inflamatoria (PPAR's) (Batista *et al*, 2012; De Petrocellis and Di Marzo, 2009; Dalton *et al*, 2014).

De manera opuesta, en procesos antiproliferativos, el sistema endocannabinoide conduce a una baja en la actividad de la vía PI3K/AKT (Calvaruso *et al*, 2012; Hermanson & Marnett, 2011) mediante la co-activación entre balsas lipídicas y la producción de ceramida (Bosier *et al*, 2010; Galve *et al*, 2013; Hermanson & Marnett., 2011; Van Dross *et al*, 2013), La síntesis y acumulación de ceramida también provoca estrés en el retículo endoplásmico (RE) y estimula la actividad de la cinasa dependiente de AMP (AMPK) induciendo autofagia.

En un contexto patológico se ha visto que el sistema endocannabinoide regula la ansiedad, el dolor y la inflamación, mediante receptores vallinoides (TRVP1) y/o canales iónicos regulados por voltaje (Abrams & Guzman, 2015; Bosier *et al*, 2010; Mc Allister & Glass, 2002). Por otra parte, la interacción entre ciclo-oxigenasas y endocannabinoides regulan respuestas inflamatorias, a través de la enzima COX-2 la cual metaboliza al ácido araquidónico formando prostaglandinas y tromboxanos (Díaz & Ruiz., 2005).

En general, los receptores cannabinoides comparten funciones diversas, activando moléculas señalizadoras río abajo, sin embargo, se ha discutido el papel de cada receptor de manera específica. Por un lado, el receptor CB₁ generalmente está asociado a mecanismos neuromoduladores, incrementando la concentración de Ca²⁺ intracelular a través de la activación independiente de proteínas G. La acumulación de ceramida es un mecanismo de señalización promovido por el receptor CB₁, mediante la ruptura de esfingomielina en la membrana celular, por la enzima, palmitoilserintransferasa (SPT), activando la producción de *novo* de este lípido, el cual, inhibe receptores a factores de crecimiento (Dalton *et al*, 2014; Bifulco *et al*, 2008; Bosier *et al*, 2010). El receptor CB₂, por su parte, está localizado predominantemente en sistema inmune y su activación involucra la modulación y liberación de citocinas, la migración de células inmunológicas, inflamación y regulación de la respuesta humoral y la vigilancia inmune (Dalton *et al.*, 2014 Grimaldi & Capasso., 2011).

El sistema endocannabinoide juega un papel central en diversas vías de señalización, que son reguladas por segundos mensajeros. En este apartado se mencionaron algunas vías implicadas en respuestas a estímulos fisiológicos y patológicos, con lo cual, la actividad de los receptores activados por agonistas cannabinoides es de suma importancia en la homeostasis de la célula, de los tejidos y finalmente del organismo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cannabinoides y Cáncer

El cáncer es una patología que se caracteriza por presentar un desbalance en el metabolismo celular y una división descontrolada que permite formar masas celulares denominadas tumores. (Hanahan & Weinberg, 2011; Sarfaraz *et al*, 2014). Las célula tumoral requiere de procesos anabólicos que le permita aumentar la síntesis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos durante la progresión tumoral (Pisanti, 2013).

El uso de cannabinoides (naturales, sintéticos y endógenos) en modelos con líneas celulares, ha sido exitoso para regular procesos tumorales (crecimiento celular, supervivencia, proliferación y arresto del ciclo celular) (Bifulco *et al*, 2008). Dichas propiedades fueron descritas hace más de 35 años por Munson y colaboradores, quienes demostraron utilizando distintos cannabinoides en células de adenocarcinoma de pulmón en ratón, una disminución de tamaño en el tumor (Munson *et al*, 1975; Grimaldi & Capasso, 2011; Sarfaraz *et al*, 2008). De Petrocellis y colaboradores en 1998, evaluaron los efectos antiproliferativos de anandamida a diferentes concentraciones en células epiteliales de mama (De Petrocellis *et al*, 1998; Bifulco *et al*, 2006). La acción inhibitoria de los cannabinoides ha sido descrita mediante estudios realizados en modelos *in-vitro*, tanto en animales como en líneas celulares transformadas (cerebro, mama, próstata, colorectal, piel, tiroide, útero, cérvix, páncreas, leucemia y linfoma, entre otros) (Chakravarti *et al*, 2014; Hermanson & Marnett, 2011; Guindon & Hohmann *et al*, 2011; Sarfaraz *et al*, 2014; Pisanti., 2013; Velasco *et al*, 2016; Zogopoulos, 2015).

En cáncer, se ha observado mediante distintos estudios, que bajo condiciones anormales, el nivel de endocannabinoides y de sus receptores puede variar (Hermanson & Marnett, 2011; Maltifano *et al.*, 2011). Un aumento transitorio parece indicar una reacción adaptativa para mantener la homeostasis cuando el sistema se ve agudamente perturbado por eventos tumorales (Hermanson & Marnett, 2011).

En varios tipos de tumores, los niveles de endocannabinoides aumenta, esto se ha observado al ser comparado con sus contrapartes normales, en glioblastoma, cáncer colon-rectal y cáncer de próstata (Petersen G *et al*, 2005; Ligresti *et al* 2003; Herrero O *et al*, 2009). La expresión de los receptores en muchos tipos cáncer de también se ha visto aumentada al ser contrastado con tejidos normales (Hermanson & Marnett, 2011).

2.2 Mecanismos antitumorales de los cannabinoides

Los cannabinoides inhiben progresión tumoral mediante mecanismos que involucran una variedad de mensajeros químicos. Cianchi y colaboradores, evaluaron los efectos de dos agonistas sintéticos; 2-araquidonoilcloroetanolamida (ACEA) y CB13 en células de cáncer colorectal, a través de la regulación del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), mediado por la síntesis de ceramida *de novo*, observando que ambos cannabinoides indujeron la actividad de la caspasa 3 con respecto al control (Cianchi *et al*, 2014).

La estimulación de los receptores cannabinoides en líneas celulares tumorales induce la síntesis *de novo* de ceramida, la cual provoca estrés en el retículo endoplásmico, aumentando la actividad de la proteína transcripcional nuclear 1 (Nupr-1 o también llamada p8), así como su efector, la pseudo cinasa TRIB3, conduciendo hacia la autofagia, mecanismo que es regulado por el eje AKT/mTOR (Salazar *et al*, 2013; Salazar *et al*, 2009; Carracedo *et al*, 2006).Se ha demostrado que un tratamiento sostenido con agonistas cannabinoides induce apoptosis en células tumorales, nuevamente mediante la producción de ceramida, la cual inhibe moléculas como ERK y PI3K/AKT (Figura 3) (Greenhough *et al*, 2007; Ellert-Miklaszewska *et al*, 2005; Folgli *et al*, 2008; Sarfaraz *et al*, 2006; Galve-Roperth *et al*, 2000). También se ha observado arresto del ciclo celular en la transición G1/S a través de la inhibición de la proteína AKT y mediante la inducción de una baja actividad de ciclinas (D, E) y ciclinas dependientes de cinasas (cdk-2,4 y 6) disminuyendo la actividad de la proteína retinoblastoma (pRb) que en estado hipofosforilado regula negativamente la proliferación, alterando la función del factor de transcripción E2F, esencial para la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Caffarel *et al*, 2006; Galanti *et al*, 2008; Laezza *et al*, 2006; Hermanson & Marnett, 2011). A través del metabolismo del ácido

araquidónico, los cannabinoides regulan mecanismos proliferativos en células tumorales, esto se observó en un estudio donde se empleó, AEA y Meth- AEA, observando que dichos agonistas indujeron muerte apoptótica en células tumorales de colon que expresaron a la alta COX-2 (Grimaldi & Caspasso *et al*, 2011; Flogi *et al*, 2008; Hermanson & Marnet *et al*, 2011).

Se ha sugerido que la acción antiproliferativa de los endocannabinoides esta acompañada también de la activación de miembros pro-apotóticos como BCL-2 (Cridege & Rosengren, 2013; Grimaldi & Capasso, 2011; Guindon *et al*, 2011; Hermanson & Marnett, 2011; Matifano *et al*, 2011; Pisanti, 2013), citocromo c, H₂O₂ intracelular y de calcio, los cuales conducen a mecanismos de muerte intrínsecos (Guindon *et al*, 2011). La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), activa caspasas tanto iniciadoras como ejecutoras siendo este otro proceso por el cual los cannabinoides inducen muerte en células tumorales (Clavarusso *et al*, 2012) . Altos niveles de ROS provocan autofagia al incrementar la actividad de mediadores específicos de estrés en retículo endoplasmático. (p8, CHOP, TRIB-3 y GRP-78) (Carracedo *et al*, 2006; Velasco *et al*, 2012; Velasco *et al*, 2016).

Generalmente se ha asociado la actividad antitumoral en ambos receptores cannabinoides, en el caso del receptor CB₁, los mecanismos que conducen hacia eventos de muerte se sustentan a través de la inhibición de las vías RAS-MAPK, PI3K/AKTy la producción de ceramida (Aviello *et al*, 2012; Pisanti *et al*, 2013), mientras que el receptor CB₂ muestra sus efectos activando moléculas del sistema inmune (interleucinas y el receptor TNF- α) que actúan finalmente sobre caspasas iniciadoras (8, 9) y ejecutoras (3) (Bifulco & Di Marzo., 2002).

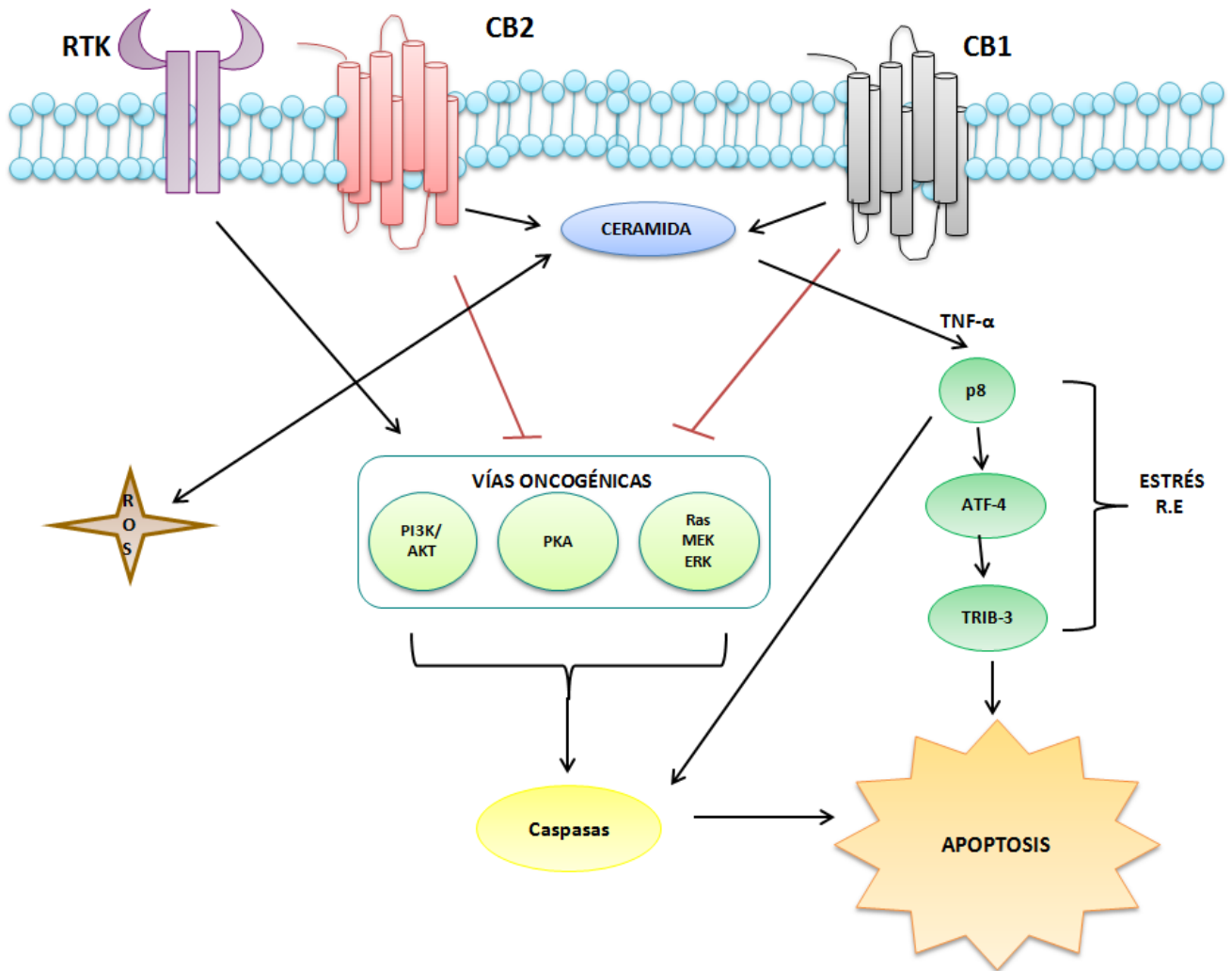


Figura 3. Vías de señalización que inhiben los cannabinoides en células tumorales para conducir a muerte celular. Receptores a cannabinoides CB1/2 regulan procesos tumorales mediante la inhibición de vías oncogénicas que son activadas por receptores con actividad tirosina-cinasa (RTK) o a través de la activación de moléculas pro-apoptóticas; ceramida, cinasas de estrés (p8, ATF-4 y TRIB-3) y caspasas). Esquema modificado de Díaz-Alonso et al., 2012; Sarfaraz et al., 2008.

2.3 Cannabinoides en cáncer gástrico

Los receptores cannabinoides se expresan en el sistema gastrointestinal, en neuronas sensoriales del sistema entérico, terminales colinérgicas, en mucosas de estómago y de colon, siendo predominante el receptor tipo CB₁. (Coutts & Izzo, 2004; Massa *et al*, 2005; Schicho & Storr, 2011). Las funciones fisiológicas del receptor CB₁ en el tracto gastrointestinal involucran la regulación de la secreción gástrica, sensación de vacío gástrico y motilidad intestinal (contracción del musculo liso y la peristalsis). En condiciones patológicas CB₁ regula dolor, diarrea y gastroenteritis (Massa *et al*, 2005). El receptor CB₁ está relacionado con las en diferentes regiones del tracto digestivo mediante la reducción de acetilcolina, además el receptor posee actividad antiulcerativa debido a su efecto como regulador de secreción gástrica (Burdyga *et al*, 2004). Trabajos realizados demostraron que CB₁ disminuyó la secreción gástrica (Adami *et al*, 2002) e indujo efectos antieméticos mediante la activación en áreas del cerebro involucradas con la emésis, incluyendo nervios vagos y núcleos motores de los nervios vagos (Tramer *et al*, 2001; Van Sickle *et al*, 2001). El receptor CB₂ se asocia a condiciones patológicas durante procesos inflamatorios en pacientes con intestino irritado en donde se observó un aumento en la expresión de sus receptores (Schicho & Storr, 2011). El efecto antitumoral de los cannabinoides en células del tracto gástrico ha sido demostrado recientemente, sin embargo no se conocen los mecanismos asociados a estos efectos. Xian *et al*, 2010 emplearon un cannabinoide sintético WIN 55,212-2 a diferentes concentraciones (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μ M) en líneas celulares gástricas AGS y MNK de humano, en donde observaron una disminución en la expresión de AKT fosforilada, una disminución de la viabilidad celular a partir de 5 μ M y una baja regulación de metaloproteasas y factores de crecimiento involucrados en procesos metastásicos. También, observaron que dichas líneas celulares expresaron ambos receptores CB's, proponiendo posibles mecanismos de acción antitumoral de los cannabinoides.

Otro estudio realizado por el mismo grupo de trabajo en el año 2011, demostraron en las mismas líneas celulares, que el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 indujo arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 a una concentración de 5 μ M, además demostraron que dicho cannabinoide estimuló la actividad de ERK y disminución de la actividad de AKT fosforilada lo que condujo al arresto del ciclo celular. Por otra parte, demostraron que el tratamiento con el agonista indujo una expresión a la baja de ciertas cinasas dependientes de ciclinas que promueven la transición del ciclo celular y por el contrario se observó un aumento en la expresión de proteínas que detienen el proceso del ciclo celular (Park *et al* 2011). Sin embargo, la información en modelos gástricos es limitada por lo que es necesario ampliar el estudio de los cannabinoides en el sistema gastrointestinal, probando diferentes agonistas con el fin de aportar nuevos conocimientos que refuercen lo que hasta ahora se sabe. En este trabajo se utilizó como modelo la línea celular de adenocarcinoma gástrico humana AGS debido a que se ha empleado poco en estudios con cannabinoide. Esta línea proviene de células epiteliales gástricas normales y fue extraída de un tumor primario de un paciente de origen caucásico, ha sido genotipificada, por lo cual se sabe que presenta mutaciones en proteínas claves para el desarrollo y mantenimiento tumoral como son KRAS y PI3K (Kirian, 2008). AGS es una línea transformada ya establecida por ATCC y se caracteriza por presentar una alta confluencia y adhesividad en cultivo celular (Kirian, 2008; Park *et al*, 1994).

3. JUSTIFICACIÓN

Hasta ahora se han comenzado a enfatizar los efectos antitumorales (disminución de la proliferación y activación de vías apoptóticas) producidos por los agonistas cannabinoides en modelos tumorales tanto en líneas celulares como en modelos con animales. Como terapéuticos han sido aprobados como agentes paliativos para el control de los efectos (náusea, vómito, dolor y pérdida del apetito) producidos por terapias para tratar el cáncer (quimioterapia y radioterapia) (Chakravarti *et al.*, 2014; Pertwee, 2006). Por lo anterior, la evaluación de los diferentes agonistas cannabinoides (endógenos y sintéticos) en un modelo celular gástrico, permitirá comprender los efectos y comparar los posibles tipos de muerte que lleven a demostrar la participación positiva de los cannabinoides en cáncer .

4. HIPÓTESIS

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

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los efectos antitumorales de los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 en la línea gástrica humana AGS.

5.2 Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar la morfología de la línea tumoral gástrica humana AGS tratada con los distintos agonistas cannabinoides a diferentes tiempos utilizando microscopia de contraste de fases.
- ✓ Evaluar la viabilidad celular de la línea tumoral gástrica humana AGS con los diferentes agonistas cannabinoides a diferentes concentraciones, mediante la técnica de viabilidad por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-difeniltetrazolio bromida).
- ✓ Analizar los cambios en el perfil electroforético del DNA en presencia de los diferentes agonistas cannabinoides y analizar los posibles tipos de muerte celular en la línea tumoral humana AGS empleando electroforesis.
- ✓ Identificar los posibles tipos de muerte en la línea tumoral humana AGS tratada con los diferentes agonistas a cannabinoides mediante citometría de flujo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

La línea celular AGS (Adenocarcinoma Gástrico Humana ATCC, CRL-1739) se cultivó partiendo de un segundo pase de sembrado, en botellas T-75 (Corning™) con medio F-12 HAM suplementado con suero fetal bovino (SBF) al 10% e incubado a 37°C y 5% de CO₂. Las células se crecieron hasta obtener un 70% de confluencia en el cultivo. A las 24 horas las células fueron resembradas empleando los siguientes recipientes de cultivo; placas de 24 pozos (0.5 ml), cajas petri de 35 x 10 mm y placas de 6 pozos (2.5 ml), dependiendo del tipo de protocolo experimental a estudiar.

6.2 Reactivos.

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

6.3 Tratamiento con agonistas cannabinoides

Para realizar los diferentes ensayos, la línea celular de adenocarcinoma gástrico humana (AGS) fue tratada con los diferentes agonistas cannabinoides, Anandamida (AEA), (R)-(+)-Meth-anandamida (Meth-AEA), CP-55,940 (CP) y sus respectivos controles a diferentes concentraciones (0.5 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M), las cuales fueron determinadas mediante una curva dosis-respuesta (IC₅₀) y respaldadas por estudios realizados en líneas tumorales gástricas (Xian *et al*, 2010; Park *et al*, 2011) a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hrs) según el protocolo diseñado en cada experimento.

6.4 Evaluación Morfológica

Se evaluó la morfología de la línea celular de adenocarcinoma gástrico (AGS) por 24, 48 y 72 horas de tratamiento con los diferentes agonistas cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) a diferentes concentraciones (0.5 μ M, 2.5 μ M y 5 μ M) y los respectivos controles tratados con dimetil sulfoxido (DMSO). Los cambios morfológicos fueron observados utilizando un microscopio invertido en contraste de fases, denominado, lector multimodal de imágenes celulares (Cytation 5™). Las imágenes se observaron con objetivo 20x. Las imágenes se procesaron mediante el software Gen5™ de BioTek.

6.5 Ensayo de viabilidad celular por MTT

La viabilidad de la línea celular fue determinada mediante el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) (Cat. No. 298-93-1). Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos, a una densidad de 7x10⁵ células por pozo, se dejaron adherir durante la noche, posteriormente fueron tratadas con los diferentes agonistas cannabinoides (AEA, Meth-AEA, CP-559,40) a una concentración de 5 μ M durante 24 horas, los respectivos controles fueron tratados con dimetilsulfoxido (DMSO) (Cat. No. 0231-500ml). Posteriormente se añadió el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) 100 μ l por pozo y se incubó por 3 horas a 37°C. Una vez terminada la incubación, se retiró el

medio de cultivo y la reducción del (MTT) a cristales de formazan se determinó diluyendo el precipitado con 200 μ l de DMSO, tomando 100 μ l sobre una placa de 96 pozos para su lectura a 595 nm, usando un lector de ELISA (iMark microplate readerTM, Bio Rad). Los datos obtenidos en este ensayo fueron por triplicado y se analizaron mediante una prueba de ANOVA de una vía, seguido de una prueba post-hoc (Tukey).

6.6 Evaluación de la Fragmentación del DNA por Laddering.

La línea celular AGS humana fue sembrada en cajas petri de 35 x 10mm a una densidad de 7×10^5 células, tratadas con los diferentes agonistas cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) a 5 μ M y un control positivo de muerte apoptótica, para el cual se empleó un inhibidor de cinasas, descrito como inductor de muerte apoptótica, estaurosporina (STS) (Sigma AldrichTM, Cat. No. S6942) a una concentración de 0.5 μ M por 24 horas. Se realizó la extracción del DNA conforme a las indicaciones del protocolo de extracción para cultivo celular, QIAamp DNA mini kit (Cat.51304) QIAGEN. Se cuantificó la concentración y pureza empleando el espectrofotómetro (NanoDrop 2000TM, ThermoFisher). Se analizó el perfil electroforético para lo cual se emplearon 10 μ L de DNA obtenido de cada condición experimental. Se evaluó la integridad del DNA empleando un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio sometiéndolo durante 20 minutos a 100 volts. Los perfiles electroforéticos se observaron empleando un fotodocumentador por fluorescencia (Fusion Fx5TM). Este ensayo fue repetido por triplicado con su respectivo control positivo de muerte (STS).

6.7 Citometría de flujo

Con el propósito de evaluar los tipos de muerte celular presentes, la línea gástrica AGS fue expuesta a los diferentes cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) por 24 horas a 5 μM con sus respectivos controles (control positivo, estaurosporina (STS) y control negativo, sin tratamiento), sobre una placa de 6 pozos, a una densidad de 1×10^6 células por pozo. AGS fue marcada con Annexina V (FITC) (Cat. No. 640922) y con 7-AAD (PE-Cy5) (Cat. No. 640922) (BioLegend, San Diego, CA, USATM). Una vez realizado el tratamiento, se retiró el medio, se realizó un lavado con PBS y se recolectó la línea AGS, posteriormente se homogenizó en 1 ml de buffer de fosfatos (PBS) en diferentes tubos eppendorf de 1.5 ml, conforme al diseño del tratamiento con los agonistas. Se cuantificó la densidad celular por condición experimental, utilizando un contador de células (Cell Counter, Bio RadTM). Con Annexina V se evaluó apoptosis (temprana y tardía) y con 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) se evaluó necrosis. Las células fueron centrifugadas por 5 minutos, se retiró el sobrenadante (PBS) y se re-suspendieron en 1ml con buffer de unión a Annexina V (1X). Se tomó de cada condición experimental 100 μl de la suspensión celular y se transfirió para cada caso a tubos de citometría de 5 ml, a cada tubo se le añadieron 5 μL de Annexin V (FITC), se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 15 minutos y posteriormente se llevó a un volumen final de 400 μl con el Buffer de unión a Annexina V (1X). Se realizó el mismo procedimiento para el 7-AAD (7-Aminoactinomicina D), sin embargo, en este caso se añadió 10 μl de 7-AAD (PE-Cy5) en un tubos de citometría de 5 ml. Cada condición fue analizada utilizando un citómetro de Flujo (Attunne Nxt Flow Cytometer, from Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Calif, USATM) y los datos se procesaron mediante FlowJo software 10.1 (Tree Star. Ashland, Or, USATM).

6.8 Análisis Estadístico.

Los resultados representan el valor de la media \pm el error estándar de la media (S.E.M) de cada experimento por triplicado. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba post-hoc (Tukey's). El valor de $p < 0.05$ se considero significativo. El análisis fue realizado empleando el software SPSS versión 20.

7. RESULTADOS

7.1 Cambios morfológicos en la línea celular AGS durante el tratamiento con los agonistas cannabinoides.

Microfotografías en contraste de fases representativas demuestran cambios morfológicos en la línea celular de adenocarcinoma gástrico humana AGS desde las 24 hasta las 72 horas de tratamiento con los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 (Figura 4-6). La línea humana AGS en condiciones control (DMSO) (A) presenta una morfología poligonal definida, alta densidad celular con un crecimiento continuo y adherente.

En presencia de anandamida (Fig. 4) la línea AGS humana presenta un encogimiento celular, pérdida de la turgencia y una aparente disminución de células adherentes (B-D). A tiempos prolongados (48 y 72 horas) y a mayor concentración estos cambios fueron más evidentes y se observa un menor número de células, encogimiento, compartimentalización así como una degradación parcial del soma con formación de detritos. En presencia de Meth-AEA (Fig. 5) se observa encogimiento celular entre 24- 72 horas a 0.5 μ M, comparando la morfología ocurrida en presencia de AEA. La morfología se altera significativamente exhibiendo una forma más alargada, parecida a fibroblastos (E-G) y a las 72 horas se observa una disminución de células, degradación y formación de detritos. En presencia de CP-55,940 (Fig. 6) desde las 24 horas se inician los cambios, hay encogimiento celular que se observa en los tratamientos con AEA y con Meth-AEA, pérdida de la adherencia y disminución de células, estos aspectos se mantiene hasta las 72 horas a 2.5 μ M y 5 μ M en donde la pérdida celular y la degradación se hacen más evidentes.

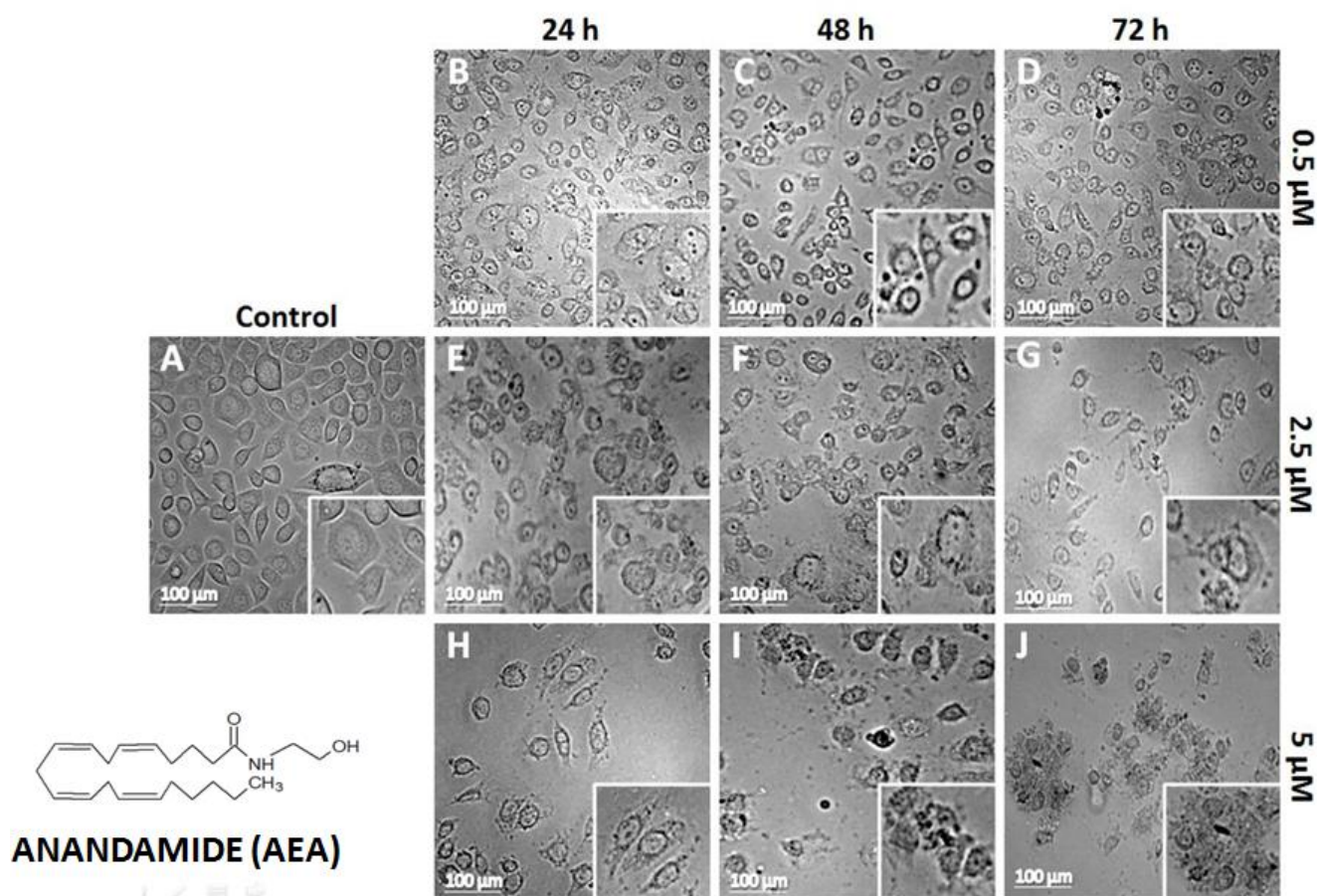


Figura 4. Microfotografías de contraste representativas que muestran los cambios morfológicos de la Anandamida (AEA) a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 y 5 μM) en la morfología de la línea celular gástrica AGS expuesta a diferentes periodos de tiempo (24, 48 and 72 h). A representa el control tratado con DMSO por 3 DIV; **B, C y D** células tratadas con AEA (0.5 μM a diferentes tiempos); **E, F y G** células tratadas con AEA (2.5 μM a diferentes tiempos); **H, I and J** células tratadas con AEA (5 μM a diferentes periodos de tiempo). En los insertos se muestran aspectos morfológicos representativos. Las micrografías fueron obtenidas empleando un microscopio digital (Cytation™ 5, Biotek). Escala: 100 μm.

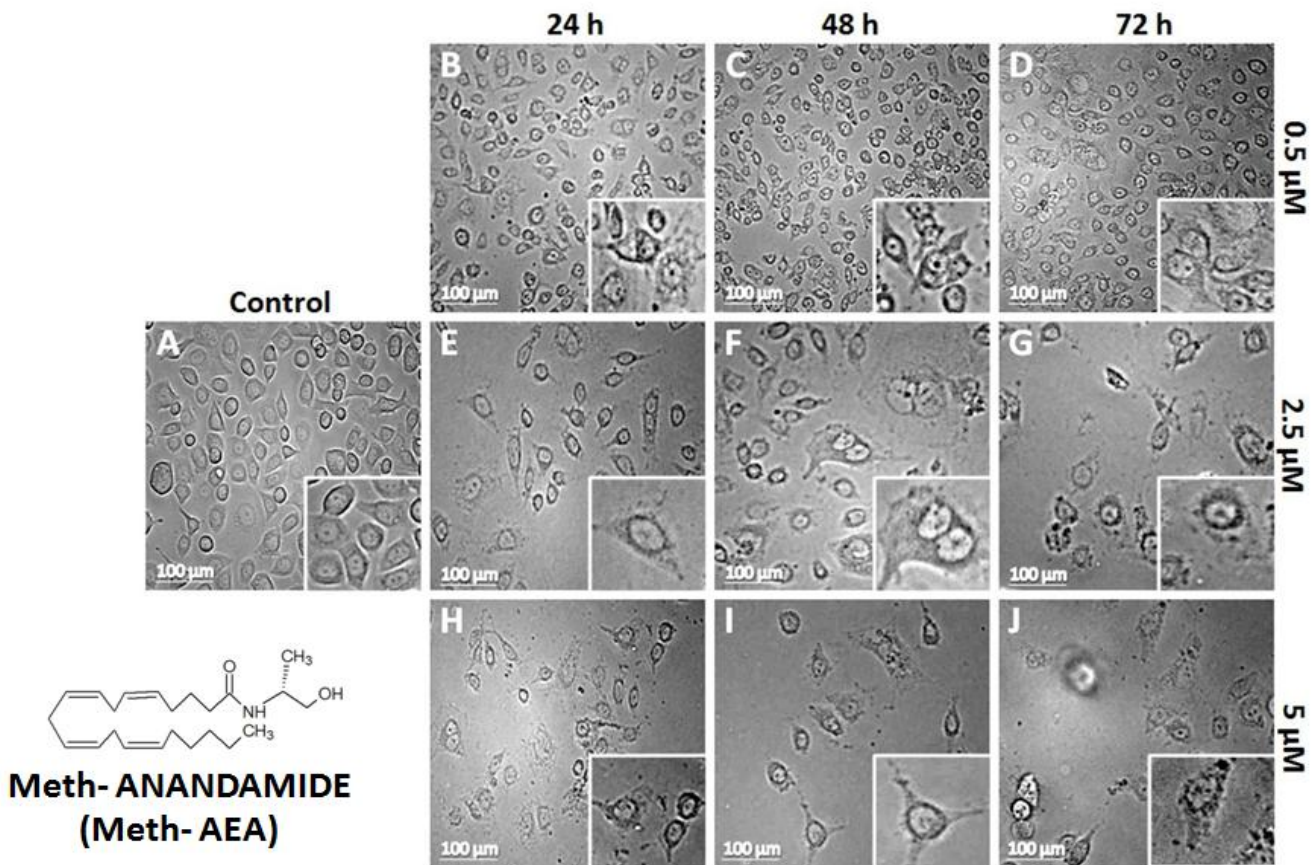


Figura 5. Microfotografías de contraste representativas que muestran los cambios morfológicos de la (R)-(+)-Methanandamide (Meth-AEA) a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 y 5 μM) en la morfología de la línea celular gástrica AGS expuesta a diferentes periodos de tiempo (24, 48 and 72 h). A representa el control tratado con DMSO por 3 DIV; **B, C y D** células tratadas con Meth-AEA a 0.5 μM a diferentes tiempos; **E, F y G** células tratadas con Meth-AEA a 2.5 μM a diferentes tiempos; **H, I and J** células tratadas con Meth-AEA 5 μM a diferentes periodos de tiempo. En los insertos se muestran aspectos morfológicos representativos. Las micrografías fueron obtenidas empleando un microscopio digital (Cytation™ 5, Biotek). Escala: 100 μm.

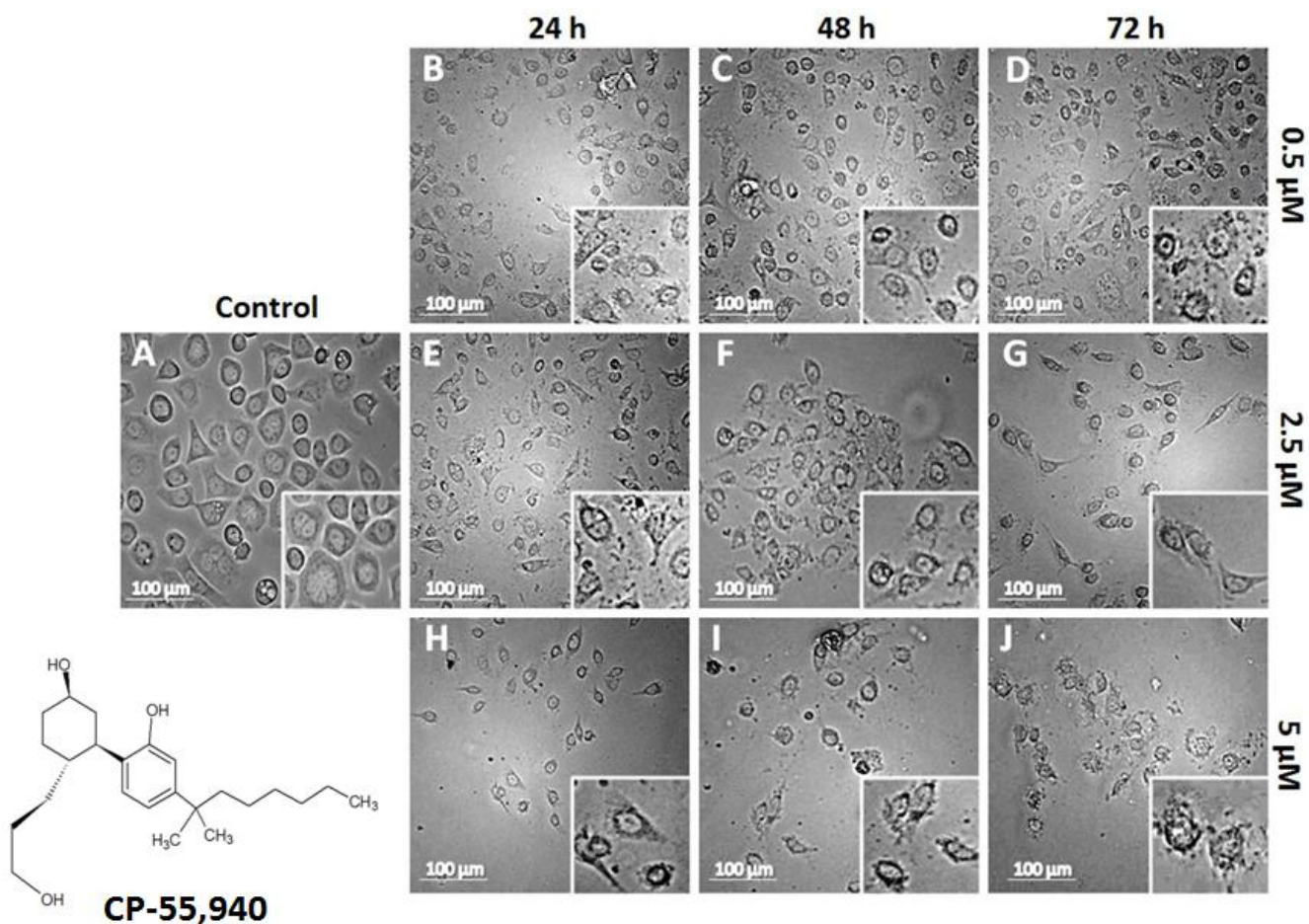


Figura 6. Microfotografías de contraste representativas que muestran los cambios morfológicos del CP-55,940 (CP) a diferentes concentraciones (0.5, 2.5 y 5 μM) en la morfología de la línea celular gástrica AGS expuesta a diferentes periodos de tiempo (24, 48 and 72 h). A representa el control tratado con DMSO a 3 DIV; B, C y D células tratadas con CP a 0.5 μM a diferentes tiempos; E, F y G células tratadas con CP at 2.5 μM a diferentes tiempos; H, I and J células tratadas con CP 5 μM a diferentes periodos de tiempo. En los insertos se muestran aspectos morfológicos representativos. Las micrografías fueron obtenidas empleando un microscopio digital (Cytation™ 5, Biotek). Escala: 100 μm.

7.2 Evaluación de la viabilidad celular por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT).

Se evaluó la viabilidad celular de la línea AGS humana en cultivos tratados con (AEA, Meth-AEA y CP-55,940) empleando el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT) como un parámetro indirecto de actividad mitocondrial. En la figura 7 se observa la viabilidad de la línea AGS humana expuesta por 24 horas con los diferentes cannabinoides (AEA, Meth-AEA y CP-55,940). Observamos cambios similares en la viabilidad empleando los diferentes agonistas cannabinoides, estos efectos fueron dependientes de la concentración. Los efectos con los diferentes agonistas cannabinoides empleados muestran una disminución en la viabilidad aproximada de un 20% a una concentración de 0.5 μ M y hasta una disminución de un 40% a 5 μ M con respecto al control. No observamos diferencias significativas entre los diferentes agonistas cannabinoides pero si con respecto al control ($P < 0.05$)

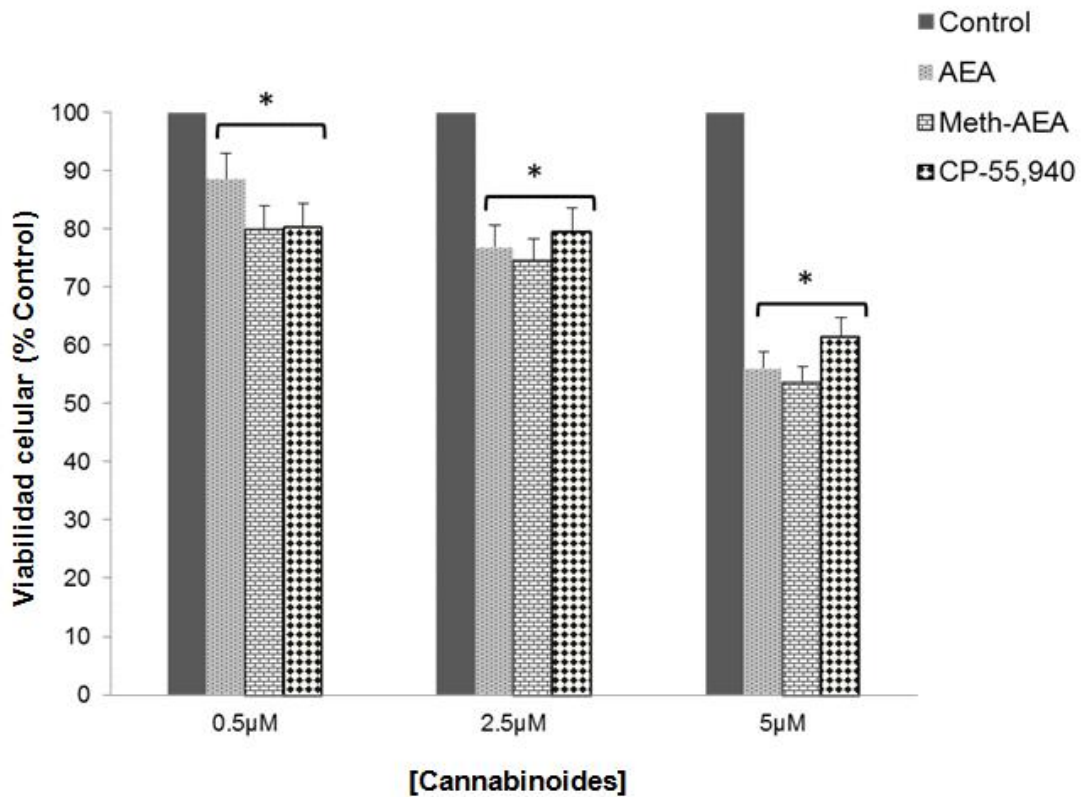


Figura 7. Efecto de los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 sobre la viabilidad celular en la línea gástrica humana AGS mediante el ensayo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolio bromida (MTT). AGS fue tratada a diferentes concentraciones de cannabinoides (0.5, 2.5 y 5 μM) evaluado a las 24 horas. Los resultados son mostrados como el porcentaje de viabilidad relacionado al control. Cada barra representa el promedio de n=3 experimentos (± S.E.M) por grupo. Se realizó un análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post-hoc (Tukey) para comparar los tratamientos. * $p < 0.05$ denota el análisis estadístico de las diferencias con respecto al porcentaje del control.

7.3 Efectos en la fragmentación del DNA en la línea celular AGS gástrico, inducido por los agonistas cannabinoides mediante el ensayo de Ladder.

Con el objetivo de conocer los mecanismos de muerte asociados a los cambios morfológicos evaluamos los patrones de bandeo del DNA empleando la técnica electroforética de barrido de DNA en geles de agarosa al 1%. Empleamos los lisados de la línea AGS tratada con los diferentes agonistas a 5 μM por 24 horas. Utilizamos un inhibidor de cinasas de amplio espectro (estaurosporina, STS, 0.5 μM) como control de muerte apoptótica. La extracción del DNA de la línea AGS se realizó de acuerdo al protocolo QIAamp DNA Mini Kit (Cat.51304) (QIAGEN). En la figura 8 se observa un patrón de fragmentación del DNA (180 pb) de la línea AGS tratada con STS como control positivo de muerte apoptótica (Lizarbe, 2007). Las células AGS sin tratamiento no muestran fragmentación del DNA, mientras que los agonistas cannabinoides generaron un patrón de bandeo del DNA con características apoptóticas

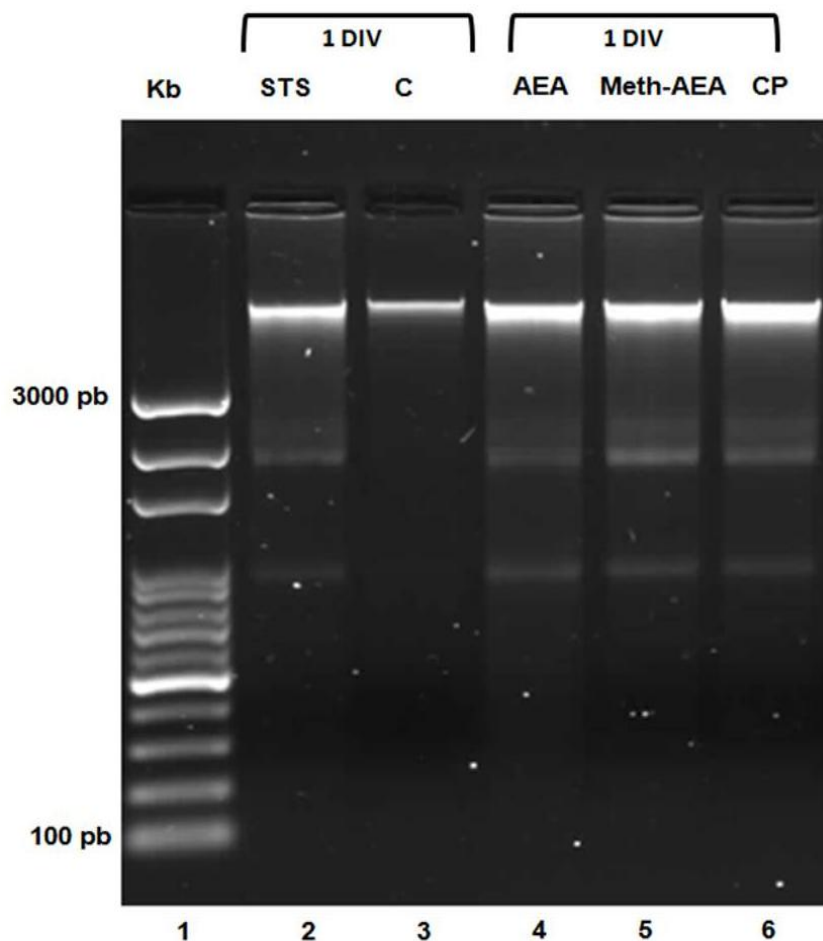


Figura 8. Ensayo de fragmentación del DNA y evaluación de los mecanismos de muerte en la línea tumoral AGS humana. La línea AGS fué tratada con AEA, Meth-AEA y CP-55,940 utilizando 5 μ M por 24 hrs. El carril Kb corresponde a los marcadores de peso molecular (3000-100 pb). Los carriles STS y C corresponden al control positivo de muerte apoptótica y a la condición control (sin tratamiento), respectivamente. Los carriles 4,5 y 6 corresponden a los tratamientos con los diferentes agonistas a cannabinoides. En todos estos se muestra la fragmentación del DNA en fragmentos de 180 pb. Se muestra una imagen representativa de una serie de 3 experimentos.

7.4 Evaluación de los mecanismos de muerte mediante Citometría de Flujo.

Con el objetivo de evaluar los tipos de muerte presentes en la línea celular humana AGS, tratadas con cannabinoides, se realizó una citometría de flujo, empleando marcadores positivos de muerte, Annexina V para evaluar apoptosis y 7-AAD para evaluar necrosis. Las condiciones experimentales en las que se trataron las células AGS fueron las mismas que se emplearon para los estudios de fragmentación del DNA. Cada cuadrante en el gráfico de la figura 9 representa un estado de muerte asociado a Annexina o a 7-AAD. Q1= necrosis Q2= apoptosis tardía/muerte celular Q3= apoptosis y Q4= células vivas. La población de células vivas disminuye en presencia de estaurosporina (STS), observándose un aumento de la población celular en estado apoptótico (Q2), en presencia de los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 se aprecia un patrón de distribución de poblaciones similar al control de muerte positivo. Sin embargo, el mayor nivel de muerte apoptótica tardía se obtuvo con los tratamientos de AEA (80.20 unidades) y CP (75.4 unidades). Estos resultados en conjunto con el patrón de bandeo observado anteriormente, demuestran que la muerte celular programada de tipo apoptótica es el principal tipo de muerte asociado a los efectos antiproliferativos de los cannabinoides AEA y CP-55,940. No se observa claramente la presencia de eventos necróticos lo que hace presumir, en términos generales, que los eventos fueron transitorios entre apoptosis y apoptosis tardía. En el caso de Meth-AEA se observa una transición directa de vivas hacia muerte tardía (58.94 unidades) comparado con AEA y CP-55,940, sin embargo, las densidades celulares para necrosis (Q1) y apoptosis temprana (Q3) son mayores en Meth-AEA, comparándolo con los otros agonistas (2.56 y 41.1 unidades), lo que sugiere que las células expuestas a Meth-AEA pueden migrar de vivas a muerte apoptótica tardía en 24 horas con un curso temporal más rápido, comparado con las condiciones en AEA y CP-55,940.

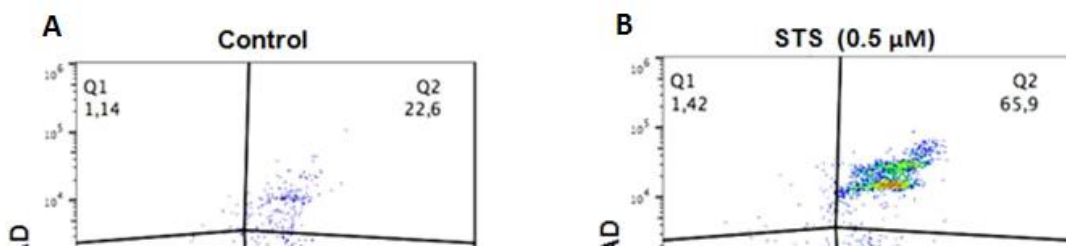


Figura 9. Análisis por Citometría de Flujo (Flow Jo Software). Inducción de apoptosis/muerte tardía empleando la concentración 5 μ M de los agonistas AEA, Meth-AEA y CP-55,940 en la línea celular AGS expuesta por 24 hrs. Q1: Necrosis tardía, Q2: apoptosis tardía (verde), Q3: apoptosis temprana y Q4: células vivas. La figura muestra en la parte superior los paneles control; (A) negativo, sin tratamiento; (B) control positivo de muerte, poblaciones tratadas con Estaurosporina (STS); C, D y E tratamientos con los agonistas cannabinoides (AEA, MET y CP-55940). En la parte inferior de cada gráfico se añadió una tabla informativa de cada condición; RL1 = Annexina; BL3 = 7-AAD.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudiaron los efectos inducidos por los agonistas cannabinoides AEA, Meth-AEA y CP-55,940 al evaluar la morfología, viabilidad celular y tipos de muerte celular en un modelo celular de adenocarcinoma gástrico humano (AGS). Estos efectos se estudiaron a diferentes concentraciones y tiempos. El estudio revela que los tres agonistas cannabinoides ejercen alteraciones morfológicas y disminución celular cuando se emplearon a una mayor concentración y a tiempos más largos de exposición. En el ensayo de fragmentación se observa un patrón de degradación o fragmentación del DNA, indicando un posible efecto apoptótico. Los efectos más relevantes resultaron al evaluar la densidad por citometría de flujo los tipos de muerte apoptótica (temprana, tardía y necrosis), sugiriendo que AEA y CP-55940 son más efectivos para inducir mecanismos de muerte apoptótica, mientras que Meth-AEA es efectivo para inducir muerte tardía.

El uso de cannabinoides como agentes antitumorales en diferentes estudios, desde cultivo celular hasta modelos con animales, ha demostrado que a concentraciones μM se favorecen efectos citotóxicos, inhibiendo el crecimiento de células malignas, procesos invasivos e inducción de muerte apoptótica, a través de mecanismos de señalización relacionados con la inhibición de proteínas mitogénicas (RAS-ERK/MAPK), estimulación sostenida de ceramida, activación de moléculas pro-apoptóticas como BCL-2, incremento en Ca^{2+} intracelular e inhibición de p21 (Guindon & Hohnmann *et al*, 2011; Maltifano *et al*, 2012; Abrams. D & Guzman M, 2015; Chakravarti *et al*, 2014; Sarfaraz *et al*, 2008). Los mecanismos antes mencionados conducen a eventos de muerte en la célula, siendo la autofagia y la apoptosis los más estudiados hasta ahora (Clavaruso *et al*, 2012; Maccarrone & Finazzi, 2003; Zogopolous, 2015).

Los receptores CB_1 y CB_2 , así como las enzimas de degradación, están incrementados en tejidos tumorales (Velasco *et al*, 2012). Este aumento está asociado con la agresividad del tumor (Maltifano *et al*, 2011; Velasco *et al*, 2016). En tejidos normales se ha observado que

la expresión de los receptores cannabinoides se mantiene por debajo y sin cambios drásticos en comparación con tejidos tumorales (Fowler *et al*, 2010; Malfitano *et al*, 2011).

En células gástricas tumorales, se ha observado un aumento en la expresión de los receptores cannabinoides (línea HGC-27) (Miyato *et al*, 2009). Clínicamente el aumento en la expresión de los receptores en algunos tipos de cáncer, como por ejemplo, en carcinoma hepatocelular ha mostrado tener una mejor respuesta al tratamiento antitumoral comparándolo con aquellos con una menor expresión (Folgi & Breshi, 2008). En cáncer gástrico, estudios recientes en modelos *in-vitro* sugieren que el sistema endocannabinoide participa en eventos pro-apoptóticos. Xian y colaboradores emplearon un cannabinoide sintético (WIN 55,212-2) observando la inhibición en la actividad de AKT dependiente de la concentración, así como un aumento en la actividad de caspasa 3 en células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS y MNK) (Xian *et al*, 2010). Además, en otro estudio comprobaron que el mismo cannabinoide sintético WIN 55,212-2 indujo arresto celular en la fase G0/G1 (Park *et al*, 2011). Actualmente las enzimas de degradación de los endocannabinoides van tomando gran interés y se están proponiendo modelos *in-vitro* para evaluar los efectos anti-tumorales del sistema endocannabinoide mediante la inhibición catalítica de las mismas para el desarrollo de terapias farmacológicas en cáncer (Guindon & Hohmann., 2011).

Los efectos mostrados por los tres cannabinoides probados en este trabajo posiblemente muestren características específicas debido a que cada ligando posee una selectividad funcional y diferentes intervalos de orden en cuanto a la eficacia y potencia sobre vías de transducción de señales en la misma célula (Bosier *et al*, 2010). Anandamida, posee una fuerte afinidad por el recetor CB₁ (Pertwee., 2010) incidiendo sobre vías como ERK, Kras y p21, así como en el aumento de los niveles de calcio intracelular que conllevan al desacoplamiento de la mitocondria y a la liberación del citocromo C (Maccarrone & Agró., 2003). CP-55,940 es un ligando que se une con la misma afinidad tanto a CB₁ como a CB₂ (Chakravarti *et al*, 2014; Pertwee., 2010), esto le confiere un mayor espectro de funciones (Rinaldi- Carmona *et al*, 1996; Ortega *et al*, 2015), además, se ha demostrado que activa cinasas de estrés como JNK (Bosier *et al*, 2010). Coudaback y colaboradores determinaron la eficacia de CP-55,940 para activar diferentes cinasas e inducir apoptosis en células de

astrocitoma, con cambios en la expresión de los receptores (Coudaback *et al*, 2010; Brown *et al*, 2013). Por su parte, Meth-AEA es un análogo de anandamida con una afinidad mayor por el receptor CB₁ (Chakravarti *et al*, 2014; Pertwee., 2010), se ha visto que en cáncer cervical produce efectos similares que el endógeno anandamida, inhibiendo la proliferación de células tumorales, junto con un aumento en la expresión de COX-2 así como un aumento en la síntesis de prostaglandinas, lo que lleva finalmente a la activación de vías apoptóticas (Brown *et al*, 2013). Lo anterior es un sustento de los efectos y mecanismos de los cannabinoides probados en el presente trabajo, en la línea celular gástrica humana AGS.

Ante todo esto surge una importante pregunta ¿Los efectos mostrados pueden observarse en células normales? Ortega y colaboradores, en 2015, probaron diferentes agonistas cannabinoides (Meth-AEA, WIN y CP-55940) en células de glioblastoma (C6 y U373) y en astrocitos primarios, observando que los efectos fueron diferentes. En células de glioblastoma hubo daño y mecanismos que condujeron hacia la muerte, mientras que en astrocitos primarios no se presentó ningún efecto notorio de daño celular, concluyendo que los cannabinoides son inocuos en células normales y que posiblemente están implicados en mecanismos totalmente diferentes (Ortega *et al*, 2015). Velasco y colaboradores mencionan que la viabilidad de células normales no se ve afectada, una vez que las condiciones cambian por acción de los agonistas cannabinoides basándose en diferentes estudios con distintas líneas tumorales (Velasco *et al*, 2016). Por lo tanto, la estimulación de los receptores cannabinoides parece estar acoplada a diferentes mecanismos de señalización en células transformadas versus células no transformadas mostrando una acción selectivamente farmacológica y preferencial sobre células tumorales, sin embargo, debe existir una concentración de cannabinoides significativamente relevante, esto quiere decir, gran afinidad y mayor concentración (Fowler *et al*, 2010; Ortega *et al*, 2015; Velasco *et al*, 2016). Hay dos factores que deben tomarse en cuenta para determinar la actividad antitumoral de los cannabinoides, la concentración y la duración del tratamiento. A bajas concentraciones (nM) se favorece la proliferación (Bifulco *et al*., 2006; Sarfaraz *et al*, 2014) y a concentraciones altas (4-10µM) se promueven efectos tóxicos (Alexander *et al*, 2009) inhibiendo la actividad de factores de crecimiento, los cuales inducen proliferación (Grimaldi & Caspasso, 2011; Fogli *et al*, 2008; Maltifano *et al*, 2011), así se benefician tipos de muerte

como la autofagia, apoptosis y necrosis, este último mediante la estimulación del ligando (TRAIL) (Clavaruso *et al*, 2012; Maccarrone & Finazzi, 2003; Zogopolous, 2015)

En este trabajo se observó que el tratamiento con los diferentes agonistas, promueve cambios morfológicos, como encogimiento y pérdida de tamaño, condensación del citoplasma y disminución de la densidad celular, estos efectos son dependientes de la concentración y del tiempo de exposición. el ensayo de viabilidad por MTT, los cannabinoides ejercieron una disminución celular significativa ($p > 0.05$) de un 40% a las 24h, IC_{50} (5 μ M), con respecto al control sin tratamiento. Para evaluar los tipos de muerte celular presentes, realizamos el ensayo de fragmentación del DNA, en donde observamos un patrón de bandedo con características apoptóticas. Por otro lado, el ensayo de citometría sugiere que existe más de un tipo de muerte. La tinción con Annexina V/7AAD es un método bastante útil para diferenciar entre muerte apoptótica temprana y tardía (Stoddart., 2011). El 7-AAD se intercala en el DNA por lo tanto debe de existir una pérdida en la integridad de la membrana para que la molécula sea capaz de atravesar hacia el núcleo, diferencia importante con Annexina V, que solo reconoce fosfatidil-serina en la cara externa de la membrana, ambas características son el fundamento de la técnica por citometría empleada en este estudio. Se ha contemplado que la citometría de flujo no hace diferencias categóricas entre muerte apoptótica tardía y necrosis, esta estrategia metodológica nos proporciona información valiosa que nos hace pensar en la transición que se establece en la célula tumoral de un estado apoptótico temprano, hacia un estado de apoptosis tardía e incluso necrosis. Los cambios morfológicos, la disminución en la viabilidad celular, el patrón de fragmentación del DNA y los eventos de muerte mostrados en la citometría de flujo, son el primer paso hacia el desarrollo de futuros ensayos, con el fin de caracterizar un mecanismo molecular y ampliar el escaso conocimiento presente en modelos gástricos, sin embargo, esto también da elementos para asumir, en términos generales, que los cannabinoides inducen eventos antitumorales.

9. CONCLUSIÓN

Los agonistas cannabinoides (AEA, Meth y CP-55,940), como agentes antitumorales, son altamente selectivos y efectivos para favorecer procesos apoptóticos en células tumorales. El tratamiento con los agonistas cannabinoides indujo cambios morfológicos en la línea tumoral de adenocarcinoma gástrico AGS, estos resultó evidente desde las 24 horas y dependientes de la dosis y del tiempo de exposición, sin embargo, cada cannabinoide indujo cambios a diferentes tiempos, siendo CP-55,940 el que presentó una mayor eficacia en menor tiempo. Los efectos mostrados en el ensayo de viabilidad celular por MTT indicaron que los agonistas cannabinoides empleados poseen una gran capacidad antiproliferativa al disminuir de manera significativa la actividad metabólica de la línea tumoral gástrica AGS con respecto al control. En el ensayo de fragmentación del DNA se pudo afirmar la actividad pro-apoptótica de los cannabinoides, sin embargo, aún hay mucho que indagar en relación a los mecanismos moleculares por los cuales estos agonistas actúan en este modelo tumoral. En la citometría de flujo se apreció la transición entre los posibles tipos de muerte (apoptosis y/o muerte tardía). Finalmente, la originalidad de este trabajo radica en la comparación de los efectos inducidos por agonistas endógenos y por otro lado los sintéticos en donde se sabe poco en un modelo tumoral gástrico.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrams, D., & Guzman, M. (2015). Cannabis in cancer care. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(6), 575–586.
2. Adami, M., Frati, P., Bertini, S., Kulkarni-Narla, A., Brown, D. R., Soldani, G. (2002). Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *British Journal of Pharmacology*, 135(7), 1598–1606.
3. Adams, I., & Martin, B. (1996). Cannabis: Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction (Abingdon, England)*, 91(11), 1585–614.
4. Alexander, A., Smith, P., & Rosengren, R. (2009). Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer letters*, 285(1), 6–12.
5. Antonia, M., & Iracheta, L. (2008). EL SUICIDIO Y LA MUERTE CELULAR. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 101(2), 1--33.
6. Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Izzo, A. A. (2012). Chemopreventive effect of the non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 90(8), 925–934
7. Battista, N., Di Tommaso, M., Bari, M., & Maccarrone, M. (2012). The endocannabinoid system: An overview. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 6, 1-7.
8. Bifulco, M., Laezza, C., Portella, G., Vitale, M., Orlando, P., Petrocellis, D., & Marzo, D. (2001). Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(14), 2745–7.

9. Bifulco, M., & Di Marzo, V. (2002). Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: A call for further research - nature medicine. *Nature Medicine*, 8(6), 547–550.
10. Bifulco, M., Laezza, C., Pisanti, S., & Gazerro, P. (2006). Cannabinoids and cancer: Pros and cons of an antitumour strategy. , 148(2), 123-135.
11. Bifulco, M., Malfitano, A., Pisanti, S., & Laezza, C. (2008). Endocannabinoids in endocrine and related tumours. *Endocrine-related cancer*., 15(2), 391–408.
12. Bosier, B., Muccioli, G., Hermans, E., & Lambert, D. (2010). Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Biochemical pharmacology*., 80(1), 1–12.
13. Brown, I., Cascio, M. G., Rotondo, D., Pertwee, R. G., Heys, S. D., & Wahle, K. W. J. (2013). Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Progress in Lipid Research*, 52(1), 80–109.
14. Burdyga, G. (2004). Expression of Cannabinoid CB1 receptors by Vagal afferent Neurons is inhibited by cholecystokinin. *Journal of Neuroscience*, 24(11), 2708–2715.
15. Caffarel, M.M. (2006). 9-Tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Research*, 66(13), 6615–6621.
16. Calvaruso, G., Pellerito, O., Notaro, A., & Giuliano, M. (2012). Cannabinoid-associated cell death mechanisms in tumor models (review). *International journal of oncology*., 41(2), 407–13.

17. Carracedo, A., Llorente, M., Egia, A., Blázquez, C., García, S., Giroux, V., Velasco, G. (2006). The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer cell.*, 9(4), 301–12.
18. Chakravarti, B., Ravi, J., & Ganju, R. K. (2014). Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: Current status and future implications. 5(15), 5852–5872.
19. Cianchi, F., Papucci, L., Schiavone, N., Lulli, M., Magnelli, L., Vinci, M., Masini, E. (2008). Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.*, 14(23), 7691–700.
20. Coutts, A. A., & Izzo, A. A. (2004). The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: An update. *Current Opinion in Pharmacology*, 4(6), 572–579.
21. Cruz-Reyes, C., & Gamboa-Dominguez, A. (2013). Her2 amplification in gastric cancer is a rare event restricted to the intestinal Phenotype. *International Journal of Surgical Pathology*, 21(3), 240–246.
22. Cudaback, E., Marrs, W., Moeller, T., & Stella, N. (2010). The expression level of CB1 and CB2 receptors determines their efficacy at inducing Apoptosis in Astrocytomas. , 5(1), 1-10.
23. Dalton, G., Bass, C., Horn, V., & Howlett, A. (2009). Signal transduction via cannabinoid receptors. *CNS & neurological disorders drug targets.*, 8(6), 422–31.

24. Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.-C., & Piomelli, D. (1994). Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*, *372*(6507), 686–691.
25. Ellert-Miklaszewska A, Kaminska B, Konarska L (2005) Cannabinoids down-regulate PI3K/Akt and Erk signaling pathways and activate proapoptotic function of Bad protein. **Cell Signal** *17*, 25-37.
26. Martel, C., Forman, D., & Plummer, M. (2013). Gastric cancer. *Gastroenterology Clinics of North America*, *42*(2), 219–240.
27. De Petrocellis, L., Melck, D., Palmisano, A., Bisogno, T., Laezza, C., Bifulco, M., & Di Marzo, V. (1998). The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation, *95*(14), 8375–8380.
28. De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2009). An introduction to the endocannabinoid system: From the early to the latest concepts. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *23*(1), 1–15.
29. Di Marzo, V., & De Petrocellis, L. (2012). Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? , *367*(1607), 3216-3228.
30. Díaz-Laviada, I., & Ruiz-Llorente, L. (2005). Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini reviews in medicinal chemistry.*, *5*(7), 619–30.
31. Fezza, F., Bari, M., Florio, R., Talamonti, E., Feole, M., & Maccarrone, M. (2014). Endocannabinoids, related compounds and their metabolic routes. *Molecules (Basel, Switzerland).*, *19*(11), 17078–106.
32. Fogli, S., & Breschi, M. C. (2007). *The molecular bases of cannabinoid action in cancer* [Review of the *Cancer Therapy Vol 6*, 103-116.

33. Galanti, G., Fisher, T., Kventsel, I., Shoham, J., Gallily, R., Mechoulam, R., Toren, A. (2008). Δ^9 -Tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression by downregulation of E2F1 in human glioblastoma multiforme cells. *Acta Oncologica*, 47(6), 1062–1070.
34. Galve-Roperh, I., Sánchez, C., Cortés, M. L., del Pulgar, T. G., Izquierdo, M., & Guzmán, M. (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: Involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation - nature medicine. *Nature Medicine*, 6(3), 313–319.
35. Galve-Roperh, I., Chiurchiù, V., Díaz-Alonso, J., Bari, M., Guzmán, M., & Maccarrone, M. (2013). Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 633–650.
36. Greenhough, A., Patsos, H. A., Williams, A. C., & Paraskeva, C. (2007). The cannabinoid δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits RAS-MAPK and PI3K-AKT survival signalling and induces bAD-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer*, 121(10), 2172–2180.
37. Grimaldi, C., & Capasso, A. (2011). The Endocannabinoid system in the cancer therapy: An overview. *Current Medicinal Chemistry*, 18(11), 1575–1583.
38. Guindon, J., & Hohmann, A. G. (2011). The endocannabinoid system and cancer: Therapeutic implication. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), 1447–1463.
39. Hermanson, D. J., & Marnett, L. J. (2011). Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(3-4), 599–612.

40. Hudler, P. (2012). Genetic aspects of gastric cancer instability. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10.
41. Izzo, A. A., & Sharkey, K. A. (2010). Cannabinoids and the gut: New developments and emerging concepts. *Pharmacology & Therapeutics*, 126(1), 21–38.
42. J. Fowler, C., B. Gustafsson, S., Chu Chung, S., Persson, E., O.P. Jacobsson, S., & Bergh, A. (2010). Targeting the Endocannabinoid system for the treatment of cancer – A practical view. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 10(8), 814–827.
43. Jin, Z., Jiang, W., & Wang, L. (2015). Biomarkers for gastric cancer: Progression in early diagnosis and prognosis. *Oncology Letters*.
44. Laezza, C., Pisanti, S., Crescenzi, E., & Bifulco, M. (2006). Anandamide inhibits Cdk2 and activates Chk1 leading to cell cycle arrest in human breast cancer cells. *FEBS Letters*, 580(26), 6076–6082.
45. Maccarrone, M., & Finazzi-Agró, A. (2003). The endocannabinoid system, anandamide and the regulation of mammalian cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 10(9), 946–955.
46. Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Gangemi, G., Gazzo, P., Laezza, C., & Bifulco, M. (2011). Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(3), 297–308.
47. Marzo, D., & Deutsch, D. (1999). Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiology of disease*, 5, 386–404.

48. Massa, F., Storr, M., & Lutz, B. (2005). The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *Journal of Molecular Medicine*, 83(12), 944–954.
49. McAllister, S. D., & Glass, M. (2002). CB1 and CB2 receptor-mediated signalling: A focus on endocannabinoids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 66(2-3), 161–171.
50. Miyato, H., Kitayama, J., Yamashita, H., Souma, D., Asakage, M., Yamada, J., & Nagawa, H. (2009). Pharmacological synergism between Cannabinoids and Paclitaxel in gastric cancer cell lines. *Journal of Surgical Research*, 155(1), 40–47.
51. Munson, A., Harris, L., Friedman, M., Dewey, W., & Carchman, R. (1975b). Antineoplastic activity of cannabinoids. *Journal of the National Cancer Institute.*, 55(3), 597–602.
52. Nikan, M., Nabavi, S. M., & Manayi, A. (2016). Ligands for cannabinoid receptors, promising anticancer agents. *Life Sciences*, 146, 124–130.
53. Olea-Herrero, N., Vara, D., Malagarie-Cazenave, S., & Díaz-Laviada, I. (2009). Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: Involvement of CB2. , 101(6).
54. Ortega, A., Rangel-López, E., Hidalgo-Miranda, A., Morales, A., Ruiz-García, E., Meneses-García, A., Del Angel, S. A. (2015). On the effects of CP 55-940 and other cannabinoid receptor agonists in C6 and U373 cell lines. *Toxicology in Vitro*, 29(7), 1941–1951.

55. Park, J. M., Xian, X.-S., Choi, M.-G., Park, H., Cho, Y. K., Lee, I. S., Chung, I.-S. (2011). Antiproliferative mechanism of a cannabinoid agonist by cell cycle arrest in human gastric cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(4), 1192–1205.
56. Partida-Rodríguez, O., Torres, J., Flores-Luna, L., Camorlinga, M., Nieves-Ramírez, M., Lazcano, E., & Perez-Rodríguez, M. (2010). Polymorphisms in TNF and HSP-70 show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer. *International Journal of Cancer*.
57. Pertwee, R. G. (2010). ChemInform abstract: Pharmacology of Cannabinoid receptor ligands. *ChemInform*, 30 (45).
58. Petersen, G., Moesgaard, B., Schmid, P. C., Schmid, H. H. O., Broholm, H., Kosteljanetz, M., & Hansen, H. S. (2005). Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue. *Journal of Neurochemistry*, 93(2), 299–309.
59. Pisanti, S., Picardi, P., D'Alessandro, A., Laezza, C., & Bifulco, M. (2013). The endocannabinoid signaling system in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(5), 273–282.
60. Pérez-pérez, G. I., Bosques-padilla, F. J., Crosatti, M. L., Tijerina-menchaca, R., & Garza-gonzález, E. (2005). Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40(1), 56–60.
61. Rinaldi-Carmona, M., Calandra, B., Shire, D., Bouaboula, M., Oustric, D., Barth, F., Fur, L. G. (1996). Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278(2), 871–878.

62. Ruiz C., Jimenez M.E. (2015). Revuelta A. Panorama Epidemiológico del Cáncer. Boletín Epidemiológico: *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Único de Información*, No 5., Vol. 32
63. San Juan, A. Cáncer de Estómago. Instituto Nacional de Cancerología México; *American Cancer Society.*, 1minuto.org (En línea).
64. Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, Í. J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Velasco, G. (2009). Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, *119*(5).
65. Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Hernández-Tiedra, S., Davila, D., Francis, S. E., Velasco, G. (2016). The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1831*(10), 1573–1578.
66. Sampieri, C. L. (2010). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis. *World Journal of Gastroenterology*, *16*(12), 1500.
67. Sampieri, C. L. (2014). Gastric cancer research in Mexico: A public health priority. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(16), 4491.
68. Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Cannabinoids for cancer treatment: Progress and promise. *Cancer Research*, *68*(2), 339–342.
69. Sarfaraz, S., Afaq, F., Adhami, V. M., Malik, A., & Mukhtar, H. (2006). Cannabinoid receptor Agonist-induced Apoptosis of human prostate cancer

cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *Journal of Biological Chemistry*, 281(51), 39480–39491.

70. Stoddart M.J. (2011). Mammalian cell viability. *Methods and Protocols. Methods in molecular biology. Springer Protocols*, no.740.
71. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
72. Tramer, M. R. (2001). Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: Quantitative systematic. *BMJ*, 323(7303), 16–16.
73. Van Dross, R., Soliman, E., Jha, S., Johnson, T., & Mukhopadhyay, S. (2013). Receptor-dependent and receptor-independent endocannabinoid signaling: A therapeutic target for regulation of cancer growth. *Life Sciences*, 92(8-9), 463–466.
74. Van Sickle, M. D., Oland, L. D., Ho, W., Hillard, C. J., Mackie, K., Davison, J. S., & Sharkey, K. A. (2001). Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology*, 121(4), 767–774.
75. Velasco, G., Hernández-Tiedra, S., Dávila, D., & Lorente, M. (2016). The use of cannabinoids as anticancer agents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, 259–266.
76. Velasco, G., Sánchez, C., & Guzmán, M. (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(6), 436–444.
77. Vemuri, V. K., & Makriyannis, A. (2015). Medicinal chemistry of cannabinoids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(6), 553–558.

78. Vinod, B. (2011). Medicinal Chemistry of Cannabinoids-An Overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2, no. 4
79. Villalta, Kirian. August 3, 2008. n.p., 2012. www.atcc.org.
80. Wang, J., & Ueda, N. (2009). Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 89(3-4), 112–119.
81. Xian, X.-S., Park, H., Cho, Y. K., Lee, I. S., Kim, S. W., Choi, M.-G., Park, J. M. (2010). Effect of a synthetic cannabinoid agonist on the proliferation and invasion of gastric cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*.
82. Xian, X., Park, H., Choi, M., & Park, J. (2013). Cannabinoid receptor agonist as an alternative drug in 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells. *Anticancer research.*, 33(6), 2541–7.
83. Yoong, J., Michael, M., & Leong, T. (2011). Targeted therapies for gastric cancer. *Drugs*, 71(11), 1367–1384.