



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

“Expresión de receptores para endocannabinoides en células de glioblastoma humano suplementadas con DHA”

TESIS

Que para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q.F.B. María de Lourdes Ibáñez González

Comité de Tutores

Director: Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Co-directora: Dra. Irazú Contreras García

Asesora: Dra. Esmeralda Morales González

Toluca, Estado de México

2021

Aviso de autoría

Yo, María de Lourdes Ibáñez González, autora responsable de la presente Tesis, la cual lleva como título “Expresión de receptores para endocannabinoides en células de glioblastoma humano suplementadas con DHA”, y en representación de los coautores:

a)Dr. José Antonio Estrada Guadarrama.

b)Dra. Irazú Contreras García

c)Dra. Esmeralda Morales González

Declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante, y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando a la Universidad Autónoma del Estado de México.

INDICE

	No. página
Resumen	4
Summary	5
1. Antecedentes	
1.1. Glioblastoma	6
Epidemiología del glioblastoma	6
Tratamiento del glioblastoma	7
Innovación en tratamientos contra el cáncer mediante modificaciones nutricionales	8
Línea celular U87MG	9
1.2. Sistema Endocanabinoide	11
Receptores para endocannabinoides	13
Receptor CB1	13
Receptor CB2	14
Endocannabinoides en el tratamiento del cáncer	15
1.3. Ácidos grasos omega-3	16
Funciones de los ácidos grasos omega-3	18
DHA	20
Relación de los ácidos grasos omega-3 con los endocannabinoides	22
Efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre células tumorales	24
2. Planteamiento del Problema	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	28
5. Justificación	29
6. Materiales y Métodos	30
6.1. Diseño de estudio	30
6.2. Procedimientos	
Cultivo de la línea celular	30
Suplementación con DHA en el medio de cultivo	33
Determinación de la expresión de proteínas por western blot	33
Determinación de la expresión de proteínas por microscopía de fluorescencia	39
Análisis de la expresión de receptores para	41

	endocannabinoides	
6.3.	Variables de Estudio	41
6.4.	Implicaciones Bioéticas	44
6.5.	Recolección de Datos	44
6.6.	Análisis Estadístico	44
7.	Referencias Bibliográficas	45
8.	Anexos	50
8.1	Carta de envío del artículo	50
8.2	Resumen del artículo	50

Resumen:

El glioblastoma es el tipo de tumor cerebral más común y agresivo, ya que tiene una mortalidad superior al 90% en 5 años, aún con tratamientos combinados agresivos, los cuales tienen efectos secundarios graves. Debido a ello, se buscan nuevas formas de tratarlo de manera más segura y con menos efectos secundarios. La manipulación del sistema endocanabinoide es una alternativa atractiva, ya que este sistema ha demostrado funciones anticancerígenas, inhibiendo la proliferación, supervivencia e invasividad de las células tumorales. Los endocannabinoides son compuestos derivados de ácidos grasos y su producción se relaciona con el consumo de estos en la dieta, particularmente, con los ácidos grasos esenciales omega-3, como el ácido docosahexaenoico (DHA), que también ha mostrado tener propiedades anticancerígenas. Debido a su relación metabólica y sus efectos antitumorales, es relevante comprobar la posible sinergia entre endocannabinoides y DHA para potenciar sus efectos anti-tumorales. El objetivo de este estudio fue identificar cambios en la expresión de receptores para endocannabinoides en una línea celular de glioblastoma humano suplementada con DHA. Para este fin, se emplearon cultivos de la línea U87MG, que fueron suplementados con DHA a concentraciones de 50, 100 y 150 μM durante 24, 48 o 72 horas. La expresión de receptores para endocannabinoides se determinó por medio de inmunofluorescencia y western-blot. Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en la expresión de los receptores CB_1 en las células de glioblastoma después del tratamiento con DHA a una concentración de 50 μM después de 72 horas de tratamiento; sin embargo, a concentraciones más elevadas, el tratamiento provocó una disminución significativa en la expresión de CB_1 y CB_2 , correspondiendo con un aumento en la muerte celular. Los resultados sugieren que la suplementación con DHA puede modular la expresión de receptores para endocannabinoides en las células de glioblastoma humano, pero sus efectos son variables en relación con la concentración y tiempo de exposición empleados.

Summary:

Glioblastoma is the most common primary tumor of the central nervous system. Despite multimodal therapies, it has no effective treatment, and its mortality rate exceeds 90%. Alternative therapies are being explored to improve life expectancy and quality of life for the patients, as well as enhancing the effects of traditional pharmacological and radiological treatments. Among these, nutritional supplementation with Omega-3 fatty acids has demonstrated its usefulness in clinical settings, as it has significant antiproliferative and proapoptotic effects on cancer cells. On the other hand, endocannabinoids are endogenous substances that have also shown antiproliferative and proapoptotic effects on tumor cells and may be produced directly from Omega-3 fatty acids. Despite their relationship, their possible synergism has not been fully explored as a potential therapeutic alternative for the treatment of cancer patients. The current study explored the potential effect of supplementation with Omega-3 fatty acids on the expression of endocannabinoid receptors in human glioblastoma cells. U87MG glioblastoma cells were supplemented *in vitro* with varying concentrations of docosahexaenoic acid for up to 72 hours and their expression of endocannabinoid receptors CB1 and CB2 was assessed by immunofluorescence and western blot. Results show a significant dose-dependent increase in CB1 receptor expression in glioblastoma cells after 50 μM docosahexaenoic acid supplementation for 72 hours. Nonetheless, CB1 and CB2 expression was decreased in glioblastoma cells supplemented with docosahexaenoic acid at 100 μM , corresponding with increased apoptosis in these cells. Our results suggest that supplementation with docosahexaenoic acid directly modulates endocannabinoid receptor expression in human glioblastoma cells *in vitro*, which may be relevant for regulating their antitumoral effect *in vivo*.

Antecedentes:

1.1. Glioblastoma

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica al glioblastoma como un tipo de cáncer de tumor primario. Afecta el sistema nervioso central se localiza generalmente en el cerebro (1). Es el cáncer de cerebro más frecuente y se encuentra frecuentemente en la materia blanca del lóbulo frontal, aunque también puede ser encontrado en otras áreas (2). El glioblastoma se clasifica como un tumor grado IV, de mayor gravedad y menor posibilidad de supervivencia. Su evolución es usualmente rápida y fatal (1).

El glioblastoma tiene características histopatológicas que incluyen necrosis, proliferación endotelial, atipia nuclear, pleomorfismo celular, actividad mitótica y trombosis vascular (2, 3). La sintomatología dependerá de la localización y avance del tumor; generalmente, los síntomas que se presentan son náuseas, vómito, convulsiones, focalización alterada, edemas, alteraciones en lenguaje y memoria o cambios en la personalidad (3).

No se conocen con claridad los factores de riesgo que predisponen para el desarrollo de los glioblastomas, aunque al igual que otros tipos de cáncer se asocian con radiación ionizante y la susceptibilidad genética (1). Se han encontrado varias mutaciones relacionadas con su desarrollo, como las mutaciones en el gen *p53*, en el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR) (2), genes que codifican la isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 o 2, así como mutaciones en los genes *TrK*, que son receptores tipo tirosina quinasa; además de metilaciones de MGMT (metil-guanina-O6-DNA metiltransferasa) y en el promotor TERT (telomerasa transcriptasa inversa) (4).

Epidemiología del glioblastoma

La incidencia total de tumoraciones cerebrales primordiales es de 21.42 por 10,000 habitantes, siendo de 5.42 por 100,000 habitantes en pacientes que tienen entre 0 y 19 años y de 27.85 por 100,000 habitantes en pacientes de 20 años y más. Los glioblastomas tienen una incidencia de 3.2 por 100,000 habitantes. Los tumores del sistema nervioso central, en habitantes pediátricos representan la segunda causa de mortalidad por carcinomas, luego de la leucemia, en tanto que en individuos adultos, el glioblastoma es el tumor de un nivel mayor más habitual, con una supervivencia al año de 39.3% y 5 años de 5.5% (1). El glioblastoma es más frecuente en los adultos mayores, donde no existe algún antecedente clínico de cáncer o alguna lesión maligna y tiene una frecuencia del 10% en pacientes jóvenes; la necrosis en los

pacientes jóvenes avanza de manera lenta, por lo cual puede dar un mejor diagnóstico y un mejor resultado a un tratamiento (5).

Tratamiento del glioblastoma

Los tratamientos que más se emplean para tratar el glioblastoma humano son la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia y los medicamentos dirigidos (6). La cirugía se considera como la primera opción, dependiendo el avance, el tamaño y la localización del tumor, donde se realiza una resección del tumor lo más extensa posible. Después, se considera la radioterapia o la quimioterapia con la temozolomida (5), el cual es un agente alquilante. Este medicamento tiene como mecanismo inhibir la replicación del ADN, manteniendo a la célula en la fase G₂/M del ciclo celular y deteniendo el crecimiento acelerado de las mismas, lo cual lleva a una autofagia celular, sin identificar y no afectar a las células cancerosas de las células sanas, por lo cual los efectos secundarios son de mayor impacto al organismo (7). Los tratamientos de quimioterapia con temozolomida tiene efectos secundarios como riesgo de infección, neutropenia, hematomas, sangrado, anemia, náuseas, vómito, estreñimiento, falta de apetito, fatiga, cefalea, convulsiones, hiperglucemia, alopecia, disnea y cambios en la piel y las uñas (8).

Para tratamientos con medicamentos dirigidos, se utiliza el Bevacizumab. Este medicamento es un anticuerpo IgG compuesto por un 7% de regiones de ADN murino y un 93% de regiones de ADN humano. Este medicamento tiene como mecanismo de acción inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos, lo cual bloquea el abastecimiento de sangre al tumor e induce la muerte de las células cancerígenas. Sin embargo, el Bevacizumab tiene efectos secundarios severos, como debilidad generalizada, dolor abdominal, náuseas, vómito, estreñimiento, falta de apetito e infección de vías respiratorias (9).

La radioterapia que normalmente se utiliza en el tratamiento del glioblastoma es la radioterapia intraoperativa (10). Es uno de los tratamientos que se utilizan después de la cirugía, dependiendo del diagnóstico e indicaciones del médico tratante. Este tratamiento tiene como efectos secundarios cansancio, escozor y ardor en la piel, cefalea, irritación en el cuero cabelludo, disfagia, linfedema y neumotórax (11).

Los tratamientos actuales para glioblastomas, como para otros tipos de cáncer, no garantizan que el cáncer se erradique totalmente, por lo cual se han estado estudiando e investigando nuevos fármacos y nuevos tratamientos donde los efectos secundarios sean menores y causen

el menor daño posible al organismo (12). Entre ellos, diversos estudios muestran al sistema endocanabinoide como un mecanismo fisiológico importante para evitar el desarrollo de células tumorales en diversos tipos de cáncer (12).

Innovación en tratamientos contra el cáncer mediante modificaciones nutricionales

La alimentación y nutrición tienen un papel muy importante como coadyuvantes en el tratamiento para el cáncer, se han encontrado estudios donde el uso de dieto-terapia en pacientes oncológicos sirve de pauta para una correcta nutrición lo cual sirve para obtener efectos beneficiosos sobre el paciente. La dieto-terapia se encarga no solamente de darle al paciente los nutrientes necesarios para las funciones esenciales y para cumplir el gasto energético del día, sino que también se encarga de ayudar al paciente con el proceso oncológico, de tal manera que se mantenga la fortaleza, proteger la función del sistema inmune y evitar o prevenir los riesgos de infecciones. Para cada tipo de cáncer se tiene que evaluar el tipo de cáncer, su estadio, el tratamiento con el que se continuará para su eliminación o control, contando con esta información se seleccionará el método con el cual se brindará la alimentación (13, 14).

La OMS y la Agencia Internacional de la Investigación del Cáncer (IACR), entre otras organizaciones, se han encargado de diseñar las dietas específicas para los pacientes oncológicos, diferentes dietas son administradas para los distintos tipos de cáncer, de esta manera el paciente tendrá los beneficios de cada alimento sin que afecte el tratamiento oncológico o sin causarle otro tipo de cáncer (13).

En el glioblastoma, se han estudiado los efectos de la dieta cetogénica, la cual consta de una disminución en los hidratos de carbono y un aumento de lípidos, esta dieta ha tenido resultados anticancerígenos positivos, como reducción y expansión del tumor; sin embargo, esta dieta también es conocida por los efectos negativos que tiene sobre las personas, por lo que el implementarla a veces no es una opción de beneficio. Para que este tipo de tratamientos funcione de forma adecuada, se tiene que estudiar el tumor, los resultados de laboratorio del paciente, su historial nutricional y el tratamiento que está llevando, antes de recetarla. Se han estudiado diversas dietas altas en grasas y bajas en proteínas que simulen los efectos de la dieta cetogénica, como la dieta CETI y la dieta Kendo, las cuales deben ser aprobadas por un médico antes de aplicarse (15, 16).

Existen estudios donde aseguran que el uso de lípidos en la dieta es beneficioso para el paciente. Los ácidos grasos omega-3 son utilizados en la dieta para pacientes oncológicos, ya que se ha visto que son movilizados, oxidados y utilizados de la manera más efectiva como fuente energética. En la implementación de los omega-3 en la dieta en los pacientes oncológicos se ha encontrado que hay una mejoría en su estancia hospitalaria, una recuperación mayor en la Unidad de Cuidados Intensivos. Los ácidos grasos omega-3 que se han encontrado en una cantidad superior en pacientes oncológicos ha sido el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) el cual tiene la capacidad de activar y aumentar la eficacia de los agentes anticancerígenos (17-19).

La suplementación con ácidos grasos de la familia omega-3 se ha considerado potencialmente beneficiosa, debido a los efectos inmunomoduladores y anti-tumorales evidenciados por estos compuestos, entre ellos, la inducción de apoptosis, disminución de la angiogénesis e invasividad de las células tumorales, además del incremento en la eficacia de la quimioterapia comúnmente usada para el tratamiento de tumores malignos (20, 21).

El mecanismo de acción del DHA indica que al enriquecer a la membrana celular con DHA se inducen cambios en la distribución de lípidos de la misma, que alteran el funcionamiento de los reguladores de señales para la supervivencia o muerte de la célula. Hay estudios que demuestran que la suplementación con DHA a células tumorales tiene un efecto benéfico, ya que induce apoptosis y autofagia sin causar citotoxicidad a las células sanas, por lo cual se ha propuesto como tratamiento adyuvante a largo plazo. Igualmente, el uso de endocannabinoides tiene potencial como adyuvante en el tratamiento contra cáncer, ya que estos compuestos presentan efectos similares a los ácidos grasos omega-3 y de hecho, ambos tipos de compuestos se relacionan entre sí, ya que afectan el ciclo celular, el estrés oxidativo y la autofagia en células tumorales, además de tener efectos antimigratorios, disminuyendo la metástasis, aunque sus efectos han sido estudiados por separado, por lo que aún no se ha determinado su posible sinergia en el tratamiento contra el cáncer (22).

Línea celular U87MG

La línea celular U87MG de humano se encuentra integrada en la ATCC (*American Type Culture Collection*), la cual es una organización que colecciona, almacena y distribuye estándares de referencia tanto de células como de microorganismos para la investigación y desarrollo tecnológico. La ATCC nos puede brindar toda la información necesaria para conocer la línea celular de interés, en este caso la U87MG, la cual es derivada de células de

glioblastoma de tejido de cerebro humano, presentando morfología epitelial y de características celulares adherentes (Figura 1) (23).

Esta línea celular tiene la característica cariotípica de ser hipodiploide, con un número de cromosomas modales de 44 en el 48% de las células. La tasa de ploidía más alta es de 5.9%. Doce marcadores son comunes a todas las células de esta línea, por ejemplo, el marcador der (1) tiene dos copias en la mayoría de las células. Solo hay una copia de X normal. N1, N6 y N9 no se encuentran en estas células (23).

La organización brinda los manuales de criopreservación y descongelación para sus líneas celulares, así como en qué tipo de medio este tipo de líneas deben estar cultivadas, ya que el medio de cultivo es muy importante. El medio de cultivo para esta línea celular es el Medio Eagle mínimo esencial modificado de Dulbecco (DMEM) y para su crecimiento se requiere una temperatura de 37°C, con 5% CO₂ para su incubación. Para la criopreservación es necesario utilizar el dimetil sulfoxido (DMSO).

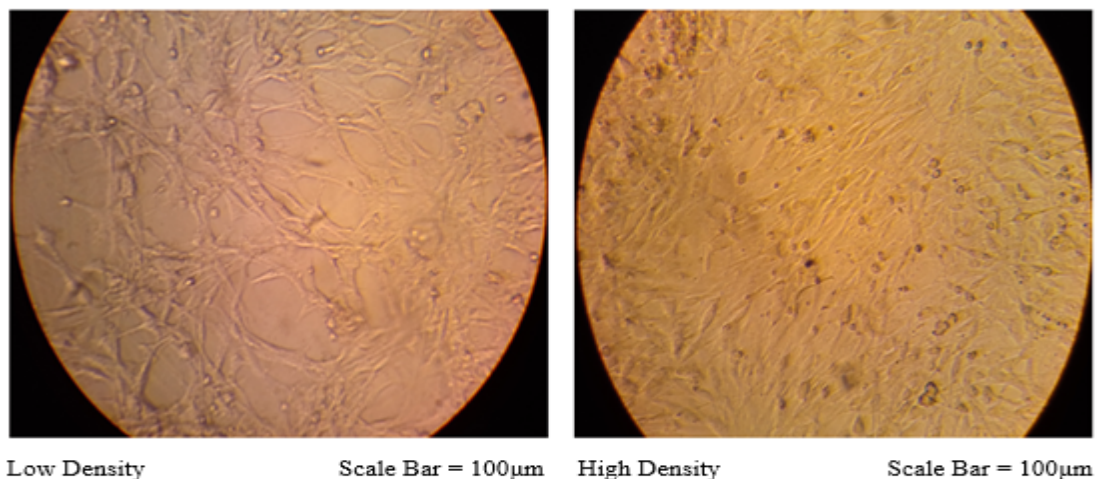


Figura 1. Línea celular U87MG (Tomada de 24).

Células de glioblastoma humano, línea celular U87MG, observación por microscopía en campo claro, a una escala de 100µm, en baja densidad (izquierda) y en alta densidad (derecha), con una magnificación de 60X.

La línea celular U87MG es utilizada en estudios para diferentes propósitos, como el conocimiento general de las células de glioblastoma, las señalizaciones que estas manejan, las interacciones de sustancias, como la cafeína, con los tratamientos oncológicos que se usan para el glioblastoma, donde la cafeína sensibiliza las células lo que permite que el tratamiento oncológico sea más efectivo al actuar en el ciclo G₂ de la célula (25).

En estudios nutricionales, la línea celular U87MG se ha estudiado el extracto de ácidos grasos de la *Clerodendrum volubile*, en los cuales se comprueba que estos tienen la capacidad de suprimir la migración celular, regula el ciclo celular y tiene propiedades antioxidativas (26). También se han usado en estudios con fármacos oncológicos en las cuales junto con emulsiones lipídicas nutricionales se pueden desarrollar nuevas formulaciones para aplicarlas en las líneas celulares con el fin de potenciar el efecto anticancerígeno del fármaco (27).

1.2. Sistema endocanabinoide

El sistema endocanabinoide es el conjunto de receptores para cannabinoides CB₁ y CB₂ (28), sus ligandos principales, 2-araquidonilglicerol (2-AG) y anandamida (AEA, N-araquidonoiletanolamida), con homología estructural al 9-tetrahidrocannabinol, y sus enzimas metabolizadoras (29), que son producidas de forma endógena. Este sistema regula múltiples funciones cognitivas, como son el aprendizaje, la memoria, el dolor, el sueño, las emociones, la conciencia y la atención (30-32), además de regular funciones a nivel sistémico y celular, como el metabolismo energético y el funcionamiento del sistema inmunológico, y la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (33).

El mecanismo de acción de este sistema depende de la entrada de calcio por canales iónicos, de manera que se libera una señal para la síntesis y liberación del endocanabinoide. Esta síntesis fomenta la hidrólisis de la fosfatidiletanolamina que está existente en la membrana celular por la acción de dos enzimas. Primero, se forma un precursor a partir de la fosfatidiletanolamina y un glicerofosfolípido conocido como araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE), esta reacción es catalizada por una aciltransferasa dependiente de calcio. Después, se produce una hidrólisis del NAPE por medio de una fosfolipasa dependiente de calcio, produciendo ácido fosfatídico y N-araquidonoiletanolamida (AEA). Ya que el AEA es sintetizado, este se libera al espacio extracelular, para que pueda actuar de manera autocrina o paracrina (Figura 2) (34, 35).

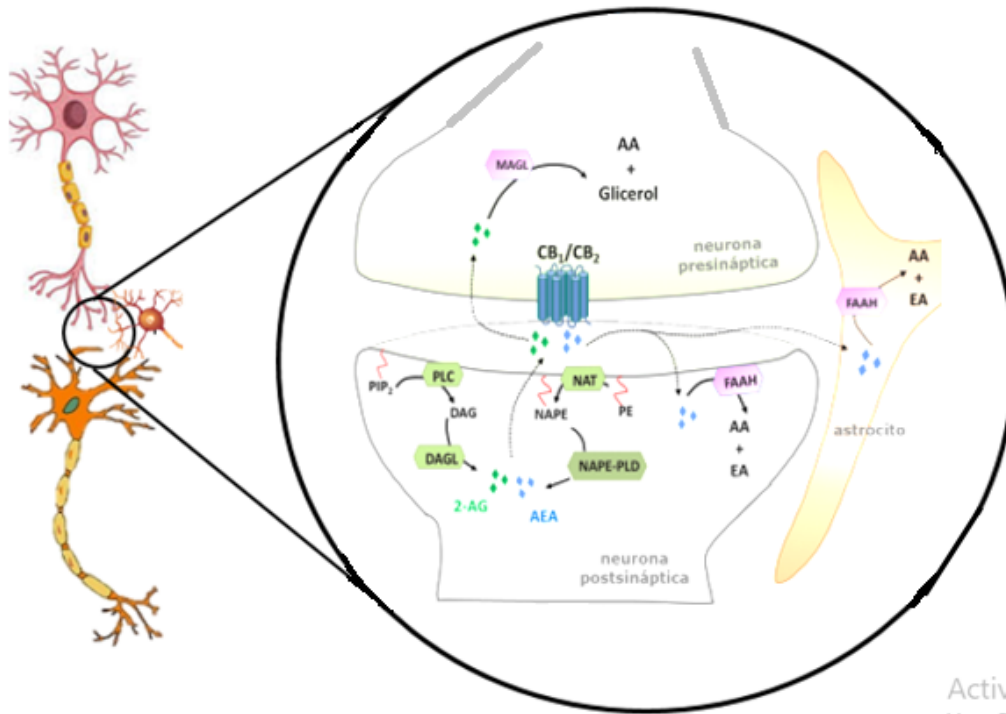


Figura 2. Mecanismo de acción para la síntesis de AEA y 2-AG (Tomada de 36).

Mecanismo de síntesis del 2-araquidonilglicerol (2-AG) y del N-araquidonoiletanolamida (AEA), activado por la entrada de la enzima fosfolipasa C (PLC), causando una reacción enzimática en cascada sobre el fosfatidilinositol-bisfosfato (PIP₂), sobre el ácido araquidónico (AA) y diacilglicerol (DAG), y estos sobre los receptores para endocannabinoides (CB₁ y CB₂) y sobre las enzimas ácido graso amida hidrolasa (FAAH) y monoglicerol lipasa (MAGL).

Mientras que la síntesis del 2-AG es independientemente de la síntesis del AEA, también se puede llevar a cabo por activación de canales de calcio. Cuando el calcio entra a la célula, puede activar la fosfolipasa C, que tiene acción sobre el fosfatidilinositol bifosfato que está presente en la membrana celular, generando diacilglicerol y ácido araquidónico. Ya una vez liberados al medio extracelular, la acción de los endocannabinoides se determina por el transporte de estos por la hendidura sináptica hacia el interior de la célula, lo que sería una recaptación por la enzima ácido graso amida hidrolasa (FAAH) y por su hidrólisis por medio de la monoglicerol lipasa (MAGL) (34, 35).

Los ligandos del sistema endocanabinoide están compuestos de moléculas con carácter hidrofóbico, derivadas de ácidos grasos, que también incluyen grupos amidas y ésteres de cadena larga poliinsaturada, cuyo precursor es el ácido araquidónico (37, 38). Los receptores CB₁ y CB₂ se encuentran acoplados a la proteína G (39). La enzima que se encarga de sintetizar a los endocannabinoides es el ácido graso amida hidrolasa y la enzima encargada de hidrolizar a los endocannabinoides es la monoglicerol lipasa (38).

Receptores para endocannabinoides

Los principales receptores endocannabinoides son CB₁ y CB₂, los cuales tienen distintas funciones y diferentes mecanismos de acción. CB₁ tiene más relación con el sistema nervioso central y CB₂ está más relacionado al sistema inmunológico (40). Como se mencionó anteriormente, estos receptores están acoplados a las proteínas G, con siete fragmentos transmembranales en su estructura, las cuales tienen como mecanismo de activación la hidrólisis de GTP (guanosín trifosfato) lo que genera GDP (guanosín difosfato) (35). Dependiendo el tipo de célula donde actúen, tienen función sobre la liberación de neurotransmisores, sobre la actividad de la adenilato ciclasa, regularización de canales de calcio y potasio, movilización de proteínas quinasas como la proteína quinasa A, la cual es una proteína que depende del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y participa en la regulación del metabolismo celular, además de tener un rol importante en la regulación del ciclo celular; así como la proteína quinasa C, la cual es una proteína que transduce señales celulares que promueven la hidrólisis de lípidos activada por diacilglicerol y fosfolípidos y ayuda en el crecimiento y la diferenciación celular (41).

Receptor CB₁

Este receptor es una proteína de 473 aminoácidos interpuesto en la membrana plasmática de la célula. Se encuentra principalmente en las neuronas presinápticas en las terminaciones nerviosas, encontrándose en mayor cantidad en áreas como el hipocampo, cerebelo y los ganglios basales del cerebro, los cuales, se hallan en la zona del cuerpo estriado. Estas terminaciones se encargan de la motricidad y de regular señales centrales y periféricas del organismo. Asimismo, se han encontrado en otros tejidos, como son las regiones periféricas de la próstata, amígdalas, ovarios, útero (42, 43), pulmón, músculo liso, hígado y páncreas (35).

En el cerebro, el receptor CB₁ está relacionado con el desarrollo neuronal, el comportamiento, la memoria y la cognición en general, y tiene un papel importante como blanco terapéutico para distintas patologías (44). Como características, este receptor inhibe la activación de la adenilato ciclasa y los canales de calcio, mientras que estimula los canales de potasio y las quinasas MAPK. Tiene como agonistas endógenos a la AEA y al 2-AG y como agonistas exógenos al delta9-tetrahidrocannabinol, nabilona (cannabinoides sintético y un análogo del Marinol), CP55940 (receptor agonista cannabinoides sintético que muchas veces es más potente

que el THC) y WIN55212-2 (potente receptor agonista canabinoide) y como antagonista al Rimonabant (antagonista selectivo usado como una droga antiobesidad) (41).

A nivel celular, se encuentra en la membrana plasmática, donde tiene un papel en la comunicación celular paracrina (35). Para que este receptor se active, se requiere de la estimulación de la neurona postsináptica por la neurona presináptica. Al entrar el calcio a la célula postsináptica se activan las enzimas sintetizadoras para los endocannabinoides, que una vez que alcanzan al receptor CB₁ de forma retrógrada, causan la inhibición de la adenilato ciclasa y la síntesis del AMPc en la neurona presináptica, inhibiendo a su vez la liberación de neurotransmisores por la neurona presináptica (41, 45). Este receptor sirve como regulador en el bloqueo de liberación de ciertos neurotransmisores, ya que actúa sobre los canales de calcio y de potasio, donde la conductancia se amplía y se reduce la entrada de estos iones, lo que causa una reducción de la despolarización y liberación de neurotransmisores (43, 46).

Receptor CB₂

Este receptor es un polipéptido de 360 aminoácidos. Se encuentra mayoritariamente en tejido inmunológico, específicamente en el bazo, amígdalas y células linfoides. Sin embargo, hay estudios donde se confirma que también están presentes en otros tejidos, como son el corazón, células óseas, células hepáticas y en partes del cerebro, particularmente en células microgliales y astrocitos (35). El receptor CB₂, al ser activado, se relaciona con el control de la locomoción, la percepción del dolor y la modulación de la neurotransmisión en áreas específicas del cerebro, como en el hipocampo, entre otras funciones (40). La implementación de los receptores CB₂ procede por las rutas similares que la de los receptores CB₁, solamente que con este receptor la liberación de los neurotransmisores y los canales de calcio y potasio no se ven afectados. Tiene como agonista endógeno al 2-AG, y agonista exógeno al HU210 que es un agonista mixto para el CB₁/CB₂ y es sintético, también tiene al JWH-133, que eliminando el grupo OH fenólico del HU210, se obtuvo como agonista selectivo, y su antagonista es el SR144528 (41, 47, 48).

El accionamiento de los receptores CB₂ lleva usualmente a un resultado inmunomodulador, estimulando la producción de linfocitos B, linfocitos T y la descarga de citocinas. El receptor CB₂ tiene una función anti-inflamatoria, ya que se expresa en las células linfoides y es regulador de estas respuestas, ya que controla la liberación de las citoquinas. Por ejemplo, regula la diferenciación de células B y T, el equilibrio de las respuestas Th₁ (linfocito T cooperador) con carácter pro-inflamatorio y las citocinas alternativas Th₂. En los macrófagos,

la estimulación del receptor CB₂ inhibe su proliferación y la liberación de moléculas pro-inflamatorias, como la IL-12 (interleucina 12) y el TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). También inhibe la fagocitosis y minimiza la señal de IL-2 sobre las células T. Adicionalmente, funciona como inmunosupresor disminuyendo la diferenciación celular de linfocitos T y B y se ha descubierto que suprime la migración de neutrófilos, mientras que favorece la migración de las células NK (*natural killer*) a sitios de inflamación (49, 50).

Endocannabinoides en el tratamiento del cáncer

Se han descrito predominantemente efectos inhibitorios de los endocannabinoides sobre el crecimiento tumoral, angiogénesis, migración y metástasis, sin hacer daño al tejido y las células sanas (33). Se ha encontrado que estos compuestos inducen la apoptosis en las células tumorales, lo cual ha sido beneficioso en combinación con los tratamientos actuales (51).

El proceso se lleva de acuerdo con una señalización en rutas donde se regulan las cinasas, causando un aumento en los niveles de lípidos, que ocasiona estrés en la célula y todo este proceso lleva a la célula a incrementar la autofagia. Por otro lado, la regulación del crecimiento y proliferación se lleva de acuerdo con la generación de la ceramida esfingolípida (52). Los agonistas exógenos del receptor CB1 se están empleando para disminuir los efectos adversos del cáncer. El THC sintético (dronabinol) y la nabilona previenen y combaten estos efectos. Se han utilizado cannabinoides que han demostrado tener efectos antitumorales al inhibir la proliferación celular y evitando la metástasis en carcinoma de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, carcinoma de colon, carcinoma de hígado, carcinoma de piel, leucemias y linfomas (35, 41).

Estudios sobre cáncer de mama, piel y próstata hablan de la señalización que los endocannabinoides producen en sus receptores cuando están presentes en células tumorales, ya que inducen la síntesis *de novo* de las ceramidas, que ocurre mediante la activación de la enzima ceramida sintasa y conduce a la activación subsecuente de la cascada de señalización de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), lo cual lleva al paro del ciclo celular y la apoptosis, promovida por la vía de señalización de ceramida-ERK. El aumento de ceramida también puede activar la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38 MAPK), que puede llevar a la apoptosis por múltiples mecanismos, como la activación de cisteín proteasas o caspasas, o a través de la liberación de citocromo C desde las mitocondrias (53).

La activación sostenida de la ERK promueve la inhibición de la ciclina quinasa p27 / KIP1, la cual modula a los reguladores del ciclo celular (ciclinas, cdk) que participan en el paro del ciclo celular y la apoptosis. Esto implica también la regulación de la proteína p53, que altera los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas, aumentando los niveles de la proteína proapoptótica Bax y disminuyendo los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl2, llevando a la activación de caspasas para el desencadenamiento de la apoptosis. Otra vía derivada de la activación de los receptores CB₁ o CB₂ inhibe la actividad de la adenilato ciclasa (AC) y disminuye tanto los niveles de AMPc como la actividad de la proteína quinasa A (PKA), lo que provoca una baja regulación de la transcripción génica y conduce a la apoptosis (53).

Estudios sobre glioblastomas demuestran que las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) juegan un papel fundamental en la adquisición de capacidades invasivas por las células tumorales, ya que estas pueden descomponer el colágeno que se encuentra en el espacio entre las células, por lo que descomponen la matriz celular y se han visto relacionadas con la invasividad de las células tumorales. Los endocannabinoides regulan la expresión de las MMPs, inhibiendo su acción sobre la matriz extracelular y promoviendo el control general de la invasividad de células tumorales. Se ha demostrado que los cannabinoides modulan las vías de metabolización de los esfingolípidos, aumentando así los niveles intracelulares de ceramida, un segundo mensajero lipídico que inhibe el crecimiento celular del tumor y promueve su supervivencia en diferentes ambientes. La estimulación de la síntesis de ceramida está involucrada en la apoptosis de células de glioma inducida por cannabinoides y en la inhibición de la angiogénesis en este tipo de tumores. La ceramida sintetizada *de novo* interviene en la regularización de la expresión de MMPs y en la proliferación de células tumorales. El efecto antiproliferativo de la ceramida esfingolípida atenuaría la expresión de MMPs y el crecimiento tumoral, mientras que la producción de esfingosina 1-fosfato desplazaría el equilibrio hacia la regulación positiva de MMP-2 y la tumorigénesis (54, 55).

1.3. Ácidos grasos omega-3

Los ácidos grasos son componentes orgánicos que se conforman por una cadena hidrocarbonada y un grupo carboxílico. El ácido graso linolénico (LNA) es el precursor para varios tipos de ácidos grasos considerados omega-3, los cuales son esenciales (56). Existen nueve ácidos grasos omega-3, el ácido graso alfa-linolénico (ALA), el ácido graso eicosapentaenoico (EPA), el ácido graso docosahexaenoico (DHA), el ácido graso estearidónico (SDA), el ácido graso eicosatetraenoico (ETA), el ácido graso docosapentaenoico (DPA), el ácido graso hexadecatrienoico (HTA), el ácido

tetracosapentaenoico (TPA) y el ácido tetracosahexaenoico (THA). En cuestiones de estructura difieren en el número de carbonos y el lugar del doble enlace, (Figura 3) (57).

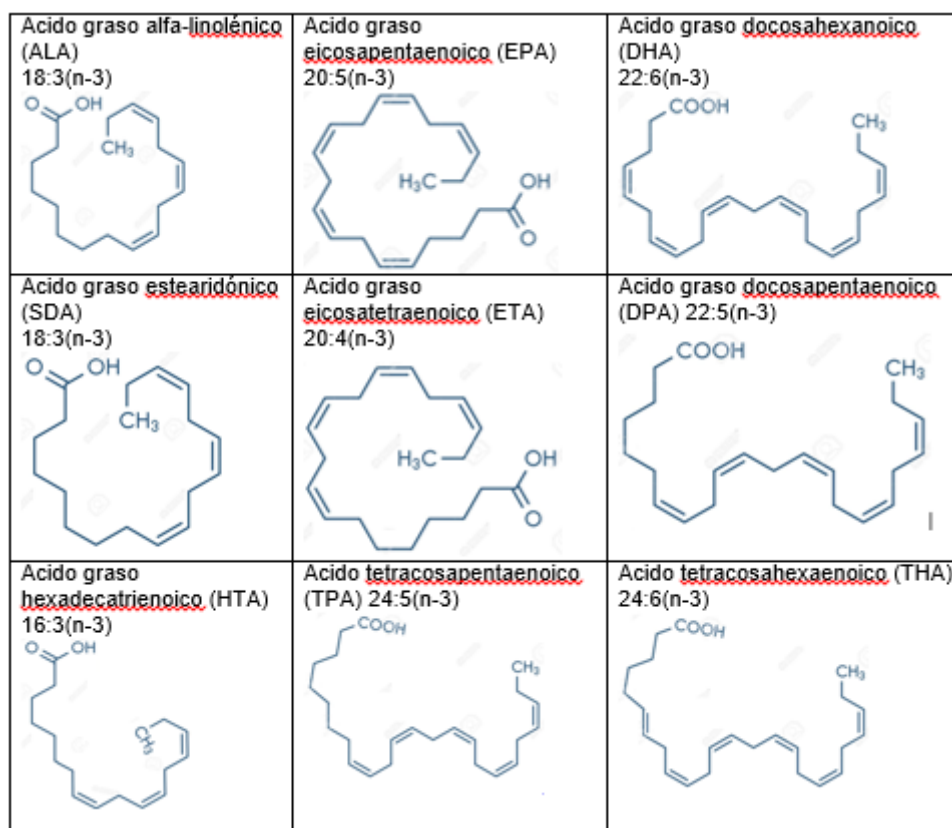


Figura 3. Ácidos grasos omega-3 (Modificada de 58).

En orden: ácido graso alfa-linolénico (ALA), ácido graso eicosapentaenoico (EPA), ácido graso docosahexaenoico (DHA), ácido graso estearidónico (SDA), ácido graso eicosatetraenoico (ETA), ácido graso docosapentaenoico (DPA), ácido graso hexadecatrienoico (HTA), ácido tetracosapentaenoico (TPA) y ácido tetracosahexaenoico (THA).

Estos compuestos se consideran esenciales, ya que deben ser obtenidos mayoritariamente de la dieta; sin embargo, el DHA y el EPA pueden ser sintetizados por reacciones químicas del organismo, a partir del precursor ALA (57). En investigaciones previas se ha observado que una alimentación carente en grasas se relacionaba con alteraciones cutáneas, originando más adelante la muerte. En estas investigaciones no se determinaron cuáles fueron los elementos dietarios cuya falta ejercían estos resultados, se pudo examinar que la suma elementos significativos de adiposidad de lácteos o de una suspensión homogénea hepático a la dieta retornaba los signos. Después, con la cromatografía de gases, fue factible disgregar y definir los diferentes tipos de ácidos grasos, descubriéndose que el LNA y el ALA eran los componentes que causaban déficits en la dieta y problemas clínicos y así se demostró la importancia de estos ácidos grasos y la de sus procedentes metabólicos; postulando así sus efectos benéficos en la salud (59).

En los recientes años, ha aumentado la relevancia de los ácidos grasos omega-3, en el cuerpo humano. Los ácidos grasos omega-3 que destacan más por sus efectos son el ALA, EPA y DHA, ya que se han visto involucrados en el beneficio de patologías importantes (60). El DHA tiene gran importancia para el desarrollo y función del sistema nervioso, el sistema inmune y el cardiovascular, ya que se debe consumir desde temprana edad, a diferencia con los demás. Para las enfermedades cardiocirculatorias el EPA ha sido de gran importancia para la prevención de estas. El EPA y el DHA han sido vinculados con los progresos en la salubridad como en la diabetes mellitus, artritis reumatoide, obesidad, asma, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad intestinal inflamatoria, algunos cánceres, falla crónica en riñones y daño al corazón e hígado, ya que estos participan en la regulación de la cognición, el mantenimiento celular, señalización, nutrición, etc. (59, 61, 62). Estos tres ácidos grasos omega-3 son los más comunes y con más información disponible, debido a que han sido los más investigados para nuevos tratamientos en enfermedades por medio de su combinación con medicamentos comunes y otras innovaciones nutricionales (63).

Funciones de los ácidos grasos omega-3

Se han encontrado estudios donde los ácidos grasos omega-3 fungen como antioxidantes e inhibidores del desarrollo o evolución de ciertas enfermedades, además de sus efectos anti-inflamatorios, regulando la expresión del factor nuclear κ B y los receptores proliferadores de peroxisomas (PPARs), que son factores de transcripción nucleares que conciernen a los receptores esteroideos (64).

La familia de PPARs incluye a PPARa, PPARb/d, PPARg1 y PPARg2. Estas moléculas regulan la expresión de genes de síntesis y oxidación de ácidos grasos y están implicados en el almacenamiento de ácidos grasos en diversos tejidos. Los PPARs se sitúan en la mayoría de los tejidos, siendo el PPARa la forma más numerosa en el hígado y el músculo esquelético, mientras que el PPARg se ubica principalmente en el tejido adiposo, entre otras. Los efectos anti-inflamatorios de los ácidos grasos omega-3 se han visto con el EPA y el DHA principalmente. En su proceso de síntesis, el ALA se convierte en SDA por medio de la delta 6-desaturasa y junto con la elongasa y delta 5-desaturasa y se convierte en EPA. Este se elonga y se desatura a DPA por medio de una desaturación peroxisomal hasta llegar al DHA, lo que se realiza mayoritariamente en las células hepáticas (Figura 4) (64, 65). El ácido araquidónico (AA), al ser un elemento de la estructura de las membranas celulares, es liberado desde los fosfolípidos por la implementación de la enzima fosfolipasa A2 durante los

primeros ciclos de un proceso inflamatorio. Posteriormente, un grupo de enzimas distinguidas como lipooxigenasas y ciclooxigenasas metabolizan al AA creando eicosanoides bioactivos, entre los que se pueden encontrar las prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (64).

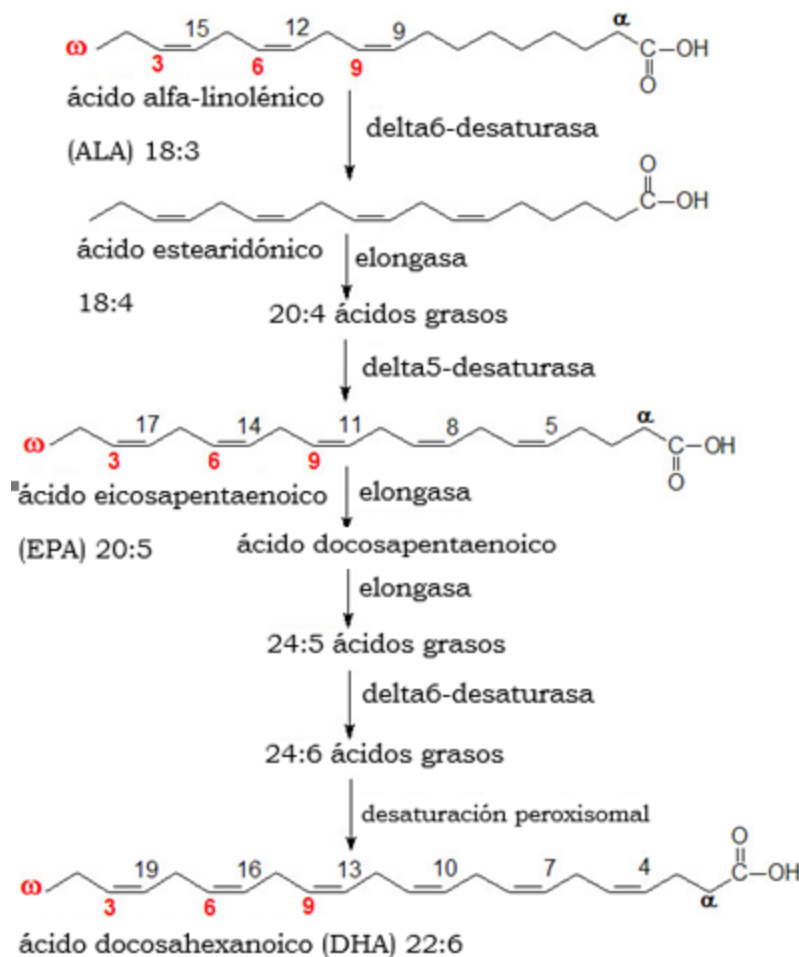


Figura 4. Síntesis del DHA (Modificada de 66).

El ácido α -linolénico por medio de desaturaciones y elongaciones da como resultado al ácido docosahexaenoico.

El ácido araquidónico (ARA) es un ácido graso poliinsaturado de la familia omega-6, su precursor es el ácido linolénico (LNA), se encuentra de forma esterificada en la membrana celular, tiene un nivel intracelular bajo por lo que para su liberación depende de las enzimas acilhidrolasas y de la fosfolipasa. El ARA es abundante en el cerebro y tiene gran importancia en el desarrollo y crecimiento del cerebro. Participa en funciones celulares como la división celular y en señalizaciones, también participa en la síntesis de los ligandos del sistema endocanabinoide (67).

El AA tiene dos vías de acción diferentes, la primera con ciclooxigenasas, que transforman el AA en tromboxano A₂ y varias prostaglandinas. Cabe señalar que hay dos isoenzimas

ciclooxigenasa diferentes: ciclooxigenasa1 (COX1) y ciclooxigenasa2 (COX2). La COX1 se expresa como un componente básico en casi todas las células; La COX2 se expresa en varios tipos de células y su expresión se ve incrementada por diversos estímulos. Entre las prostaglandinas derivadas de AA, la prostaglandina E2 (PGE2) es un potente mediador de inflamación, dolor, fiebre y aumento de la permeabilidad vascular (64).

La enzima 5-lipoxigenasa interviene en la vía metabólica secundaria de AA y hay un desarrollo diferente de los leucotrienos, entre los que destacan el leucotrieno B (LTB), el leucotrieno C y el leucotrieno D, los agentes proinflamatorios que provocan una mayor permeabilidad vascular, apoyan la función de inmunidad en las células y estimulan la liberación de citocinas inflamatorias. Este proceso se considera un mecanismo de defensa porque puede reducir la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α , que se liberan cuando se activan macrófagos y monocitos. Aunque estas citocinas son potentes activadores de la función inmunológica, la actividad excesiva de estos sustratos contribuye a la inflamación patológica, situación que se observa en la inflamación crónica del intestino y la artritis reumatoide, entre otras. El TNF- α juega un papel importante en la formación de caquexia en pacientes con cáncer (64).

La ingesta de alimentos con EPA y DHA puede reducir la producción de citocinas inflamatorias sus efectos pro-inflamatorios (64). Este efecto anti-inflamatorio empieza por la síntesis del DHA y EPA mediante la elongación y desaturación por las enzimas D6 y D5 desatura, dando como resultado la producción de sustancias como las protectinas D1 y resolvinas de la serie D por el DHA, así como, resolvinas de la serie E por el EPA. Estas sustancias regulan el proceso de inflamación, disminuyendo la producción y actividad de neutrófilos y la producción de citocinas pro-inflamatorias. También son protectores del sistema celular de donde se generan y participan en el retorno de los tejidos locales a la homeostasis inicial (63, 68, 69).

DHA

Como ya se mencionó antes, el DHA es un ácido graso que es sintetizado por el cuerpo a partir del ALA. Debido a su importancia en el cerebro, junto con el ARA, se considera cuantitativamente el ácido graso omega-3 más importante en este órgano (70). Este ayuda en varias funciones antes descritas y también ayuda al crecimiento y desarrollo del cerebro, principalmente en niños, mientras que en adultos es necesario para su mantenimiento (71), ya que forma parte de las membranas celulares del cerebro y participa en la señalización y en el

crecimiento neuronal (72). El DHA se aglomera en fosfolípidos cerebrales, principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y, en menor medida, en fosfatidilserina, derivados de inositol y esfingolípidos. La esterificación del oxidrilo central del glicerol es debido a la acumulación del DHA, ya que está integrado en los lípidos anfipáticos de este. La posición sn1 es asumida por colina o inositol, dependiendo del fosfolípido en cuestión (73).

En su campo de organización, el DHA adopta una configuración semi-helicoidal derivada del tamaño de gran extensión de su cadena y las seis posiciones insaturadas, las cuales tienen una mayor flexibilidad. Esta configuración concede que los lípidos anfipáticos que contienen DHA tengan una organización molecular bastante grande, de modo que se distribuyan menos moléculas por unidad de volumen a través de la membrana. Esto denota que las membranas que tienen fosfolípidos que tienen DHA serán estructuras con mayor desenrollamiento y menor tendencia a desarrollar estructuras cristalinas de naturaleza más densa. Algunos científicos en sus estudios han sugerido que esta sería una característica clave de las membranas que contienen DHA, ya que la alta fluidez facilitaría el movimiento de moléculas dentro de la membrana, como receptores, enzimas, proteínas G, factores de crecimiento nervioso, canales iónicos y señales, transmisión. Este es exclusivo de las células excitadoras, como las neuronas (46, 70, 74).

Las membranas de los sinaptosomas y las mitocondrias neuronales contienen la mayor cantidad de DHA. Cabe señalar que las neuronas no son tan grandes como para producir DHA desde de su predecesor, el ácido alfa-linolénico, y que las propias células gliales, especialmente los astrocitos, desaturan y prolongan el LNA para que se conviertan en DHA, que luego se transloca en las células. Los astrocitos y oligodendrocitos tienen un porcentaje menor de DHA y AA que las neuronas. Por tanto, la alta fluidez de las membranas neuronales tiene un papel en las funciones del DHA en el tejido del cerebro, asegurando el desarrollo de conos de crecimiento axonal, la unión e interacción sináptica y el efecto de las dendritas, optimizando así la plasticidad del tejido cerebral. Cabe señalar que esta área es de mayor valor en los procesos de neurogénesis, migración neuronal y formación de sinapsis, que son propios del desarrollo del sistema nervioso (70, 74).

El DHA está relacionado con el aprendizaje, la memoria y la comprensión, entre otras funciones cognitivas, así como en funciones bioquímicas como la síntesis del ácido α -linolénico por medio de enzimas como las elongasas y desaturasas, porque es importante para el neurodesarrollo de las personas (75), desde la concepción, el crecimiento y el desarrollo del

embrión y en el niño es fundamental que se tengan los niveles de DHA adecuados porque estos dependen de la concentración plasmática de la madre, lo que viene desde la nutrición en el embarazo y las proteínas transportadoras. Los niveles aumentan conforme avanza la gestación; sin embargo, en el momento del nacimiento hay un descenso de estos. Las necesidades de obtención de lípidos van en aumento ya que lo precisan las membranas celulares. En caso de que no se obtenga, puede dar lugar a un daño neurológico y a la manifestación de moléculas inflamatorias y favorecedoras de isquemia, causando fragilidad y ruptura de membranas en vasos sanguíneos y células cerebrales (72).

Relación de los ácidos grasos omega-3 con los endocannabinoides

Considerando al DHA como el ácido graso omega-3 más importante por sus niveles de concentración en el cerebro, junto con el ARA y el EPA, son considerados los precursores de varios mediadores lipídicos, incluyendo los endocannabinoides, ya que, por medio de la dieta, los ácidos grasos omega-3 son metabolizados hasta llegar a ser precursor de los endocannabinoides. El AEA y 2-AG se producen a partir de fosfolípidos ARA unidos a la membrana. La síntesis se produce la terminal post-sináptica a través de elevados niveles de calcio intracelular, ambos en respuesta a la demanda, y rápidamente degradados a ARA u oxigenados para mediadores bioactivos adicionales (76).

La vía principal para la producción de AEA comienza con la transferencia de N-aciltransferasa (NAT) de ARA de fosfatidilcolina (ARA-PC) a fosfatidiletanolamina (PE), para generar N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NArPE), que es seguida por la hidrólisis de N-acil fosfatidiletanolamida, fosfolipasa D (NAPE-PLD) para producir AEA. Otras vías incluyen la desacilación de NAPE por el dominio α / β -hidrolasa que contiene 4 (ABHD4) y la glicerofosfoaraquidonoetanolamida producida (GP-NAPE) es escindida por la fosfodiesterasa (PDE), para producir AEA, o la liso-NAPE se hidroliza por la liso-NAPE-fosfolipasa D (PLD) directamente a AEA. NAPE también puede hidrolizarse mediante fosfolipasa C (NAPE-PLC) para generar fosfoanandamida (PAEA), que se desfosforila a AEA mediante fosfatasas como la proteína tirosina fosfatasa (PTPN22) (77).

La producción de DHEA y EPEA a partir de DHA y EPA unidos a fosfolípidos comparten las mismas vías. La síntesis de 2-AG se da a partir de ARA unida a fosfatidilinositol (ARA-PI) a través de fosfolipasa C- β (PLC β) y la producción de un ARA-diacilglicerol (DAG), que se hidroliza por diacilglicerol lipasas- α para producir 2-AG. Otras vías incluyen la desfosforilación del ácido 2-AG-lisofosfatídico (2-AG-LPA) por la fosfatasa LPA (2-LPA-P)

o la fosfolipasa A1 (PLA1) que convierte PI en 2-araquidonoil-liso PI (2-AG-LPI) y luego a 2-AG por la enzima liso-fosfolipasa C (liso-PLC). Las vías de producción de 2-DPG y 2-EPG son actualmente desconocidas. 2-AG y AEA actúan en los receptores CB₁ y CB₂. El enriquecimiento de DHA y EPA en la dieta disminuye el ARA de fosfolípidos y aumenta los DHA y EPA de fosfolípidos, y favorece la producción de endocannabinoides derivados de DHA y EPA, mientras que el tratamiento *in vitro* de DHA y EPA aumenta las concentraciones de 2-AG. DHA y EPA también regulan la actividad y los niveles de los receptores CB₁ y CB₂ (Figura 5) (78).

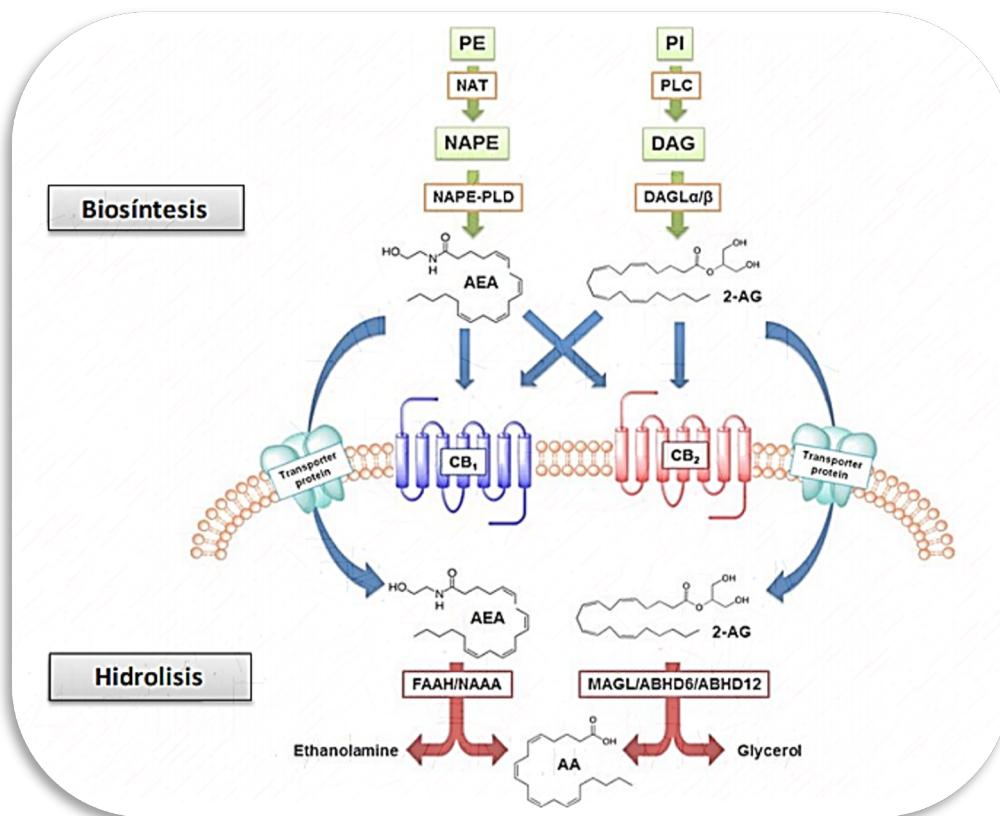


Figura 5. Biosíntesis e hidrólisis de los endocannabinoides (Tomada de 79).

Para la biosíntesis de N-araquidonoiletanolamida (AEA), la fosfatidiletanolamina (PE) se convierte en N-acilfosfatidiletanolamina (NAPE) por la acción de la enzima N-aciltransferasa (NAT) y posteriormente, la NAPE-fosfolipasa D (NAPE-PLD) transforma NAPE y da lugar a AEA. La biosíntesis de 2-araquidonoilglicerol (2-AG) comienza con la hidrólisis regulada por la enzima denominada fosfolipasa C (PLC) de la membrana lipídica fosfatidilinositol (PI), para generar diacilglicerol (DAG), que luego se convierte en 2-AGL por diacilglicerol lipasa (DAGL). Después de unirse a los receptores de cannabinoides y activar sus funciones biológicas, los endocannabinoides se eliminan mediante procesos enzimáticos específicos. La AEA se libera en ácido araquidónico (AA) y etanolamina por la amidohidrolasa de ácido graso (FAAH) y la amidohidrolasa de N-aciletanolamina (NAAA). El 2-AG se cataboliza en AA y glicerol por la monoacilglicerol lipasa (MAGL), α y β -hidrolasa-6 (ABHD-6) y ABHD-12.

Estudios recientes revelan la cascada de reacciones químicas que convierte los ácidos grasos omega-3 en endocannabinoides por medio de la oxidación enzimática de los endocannabinoides por el citocromo P450, ya que existe una producción endógena de metabolitos lipídicos procedentes de los ácidos grasos omega-3 que se originan a partir de la perturbación entre las vías metabólicas de los endocannabinoides y la vía del citocromo P450 (CYP) epoxigenasa. Los epóxidos endocannabinoides se derivan del DHA y del EPA, dando como producto ácido epoxieicosatetraenoico-etanolamida (EEQ-EA) y ácido epoxidocosapentaenoico-etanolamida (EDP-EA), respectivamente. Tanto EEQ-EA como EDP-EA se encuentran de forma endógena en el cerebro y órganos periféricos. Estos metabolitos se producen directamente por epoxigenación directa de los endocannabinoides docosahexanoil etanolamida (DHEA) y eicosapentaenoil etanolamida (EPEA) por células microgliales y por el CYP2J2, teniendo como función la disminución de la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y el aumento de las citocinas anti-inflamatorias, como IL-10, a través de la activación del receptor CB₂ (80).

Efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre células tumorales

Los ácidos grasos omega-3 tienen efectos anti-proliferativos e inhibidores de crecimiento en células dañadas. Se han realizado estudios donde confirman que estos compuestos tienen un efecto anti-migratorio y anti-proliferativo sobre las células tumorales. Debido a su afinidad lipídica, pueden activar, por medio de la activación de canales de calcio, a las proteínas cinasas A, dependientes del AMPc y las proteínas cinasas C, dependientes de Ca⁺², las cuales regulan la proliferación y migración de células tumorales. Estas tienen sitio en reacción a diversos factores de crecimiento y dan lugar a diversas reacciones celulares, como diferenciación, proliferación, apoptosis y migración (81, 82).

Existen varios estudios donde se habla de los efectos del DHA contra el cáncer, ya que se ha reportado que inhiben tanto el crecimiento como la proliferación mediante la suspensión del ciclo celular en la fase de G₀/G₁, que es mediada por la proteína *Forkhead box M1* (FOXM1), que es un factor de transcripción. También activan la autofagia y la apoptosis en células tumorales debido a la acumulación de p53, la desregulación de supervivencia y la activación de la caspasa-3, ya que el DHA funciona como un regulador para estos factores, lo cual, de cierta forma, se puede considerar como un anticancerígeno (83-86).

Se ha demostrado que el DHA inhibe el crecimiento e induce la muerte celular apoptótica y autofágica en varias líneas celulares de cáncer. Se han dado tratamientos de las células de

GBM con DHA, dando como resultado el aumento de la actividad autofágica, como lo revela el aumento de los niveles de LC3-II, proteína soluble que teniendo forma citosólica es conocida como LC3-I, que es conjugada a fosfatidiletanolamina para formar LC3-fosfatidiletanolamina conjugada (GFP-LC3), la cual se recluta para las membranas autofagosomales, por lo que refleja la actividad autofágica inducida por la privación de nutrientes y que puede llegar a la muerte celular autofágica (87). La activación del flujo autofágico, junto con la activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), disminuye los niveles de Akt fosforilado y la actividad de mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero). Esto es importante, ya que al activarse producen señales de autofagia, tanto por la liberación del p53 y la activación de la caspasa 3, lleva a la apoptosis celular. Dichos estudios se han realizado específicamente en líneas celulares de glioblastomas, lo que da un mejor soporte para un tratamiento conjunto a los actuales (83).

Adicionalmente, la suplementación con DHA favorece la respuesta inmunológica al promover la liberación de DAMPs (patrones moleculares asociados al daño celular), como la proteína de choque térmico HSP90 y la proteína no histónica HMGB1. Asimismo, la inducción de autofagia debido al tratamiento con DHA amplifica la apoptosis en las células tumorales debido a la inhibición del factor mTOR (un regulador negativo del inicio de la autofagia) por parte de DHA, mediante la activación de AMPK y la inhibición de PI3K/Akt y se ha visto que el DHA promueve tanto la apoptosis como la autofagia simultáneamente en tumores sólidos *in vivo* e *in vitro* (20-22, 88, 89).

El DHA también inhibe la fosforilación de STAT3 (transductor de señal y activador de transcripción 3) en células tumorales. La inhibición de STAT3 en las células tumorales está involucrada en el proceso apoptótico debido al DHA, ya que la desfosforilación de STAT3 se asocia con la muerte de las células cancerosas y el tratamiento con inhibidores de fosfatasa inhibe la muerte de las células cancerosas. Este estudio se llevó a cabo en células tumorales monocíticas y también se ha encontrado en células tumorales de próstata y de mama. Debido a esta evidencia, la suplementación con DHA se considera como una alternativa terapéutica importante para el tratamiento de patologías que requieran la modulación de la respuesta inmunológica y el funcionamiento neuronal y por lo tanto, puede ser efectiva en el tratamiento del glioblastoma (20-22, 88, 89).

2. Planteamiento del Problema:

El glioblastoma es el tipo de cáncer de cerebro más frecuente, que está clasificado por la OMS como tumor primario grado IV, por su origen y gravedad. A pesar de que en su tratamiento se emplean terapias combinadas de alta agresividad, la tasa de mortalidad en este tipo de tumores es superior al 90%. Los tratamientos actuales para glioblastomas no garantizan que las células cancerígenas se erradiquen totalmente, por lo que se están investigando nuevos fármacos y tratamientos para disminuir los efectos secundarios y causar el menor daño posible al organismo.

Diversos estudios muestran al sistema endocanabinoide como un mecanismo fisiológico importante para evitar el desarrollo de células tumorales en diversos tipos de cáncer. Este sistema regula múltiples funciones fisiológicas, entre las que se encuentran la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Se han descrito predominantemente efectos inhibitorios de los endocanabinoides sobre el crecimiento tumoral, angiogénesis, migración y metástasis, sin hacer daño al tejido y las células sanas del cerebro.

Asimismo, los endocanabinoides tienen estrecha relación con los ácidos grasos esenciales omega-3, dado que ambos comparten precursores lipídicos similares y sus concentraciones en el organismo se afectan mutuamente. Los ácidos grasos omega-3 también presentan efectos importantes sobre el metabolismo y supervivencia celular. Entre ellos, el ácido docosahexaenoico (DHA) tiene funciones de protección e inhibición del crecimiento de las células tumorales.

A pesar de que diversos estudios han demostrado la función protectora e inhibitoria tanto del sistema endocanabinoide como del DHA sobre las células tumorales, la relación que existe entre ambos sistemas para lograr estos efectos aún no ha sido estudiada. Por lo tanto, el presente proyecto plantea la siguiente pregunta de investigación:

Pregunta de investigación

¿Cómo se relaciona la expresión de receptores para endocanabinoides con la suplementación con DHA en células de glioblastoma humano?

3. Hipótesis:

Hipótesis Alterna

La suplementación de DHA incrementa la expresión de receptores para endocannabinoides en células de glioblastoma humano.

Hipótesis Nula

La suplementación de DHA no afecta la expresión de receptores para endocannabinoides en células de glioblastoma humano.

4. Objetivos:

Objetivo General

Identificar cambios en la expresión de receptores para endocannabinoides en líneas celulares de glioblastoma humano suplementadas con DHA.

Objetivos Específicos

- Establecer el nivel basal de expresión de receptores para endocannabinoides en cultivos celulares de la línea de glioblastoma humano U87MG, antes del tratamiento con DHA, por medio de western-blot y microscopia de fluorescencia.
- Suplementar directamente a las células de glioblastoma en cultivos con DHA puro, a diversas concentraciones y tiempos de exposición.
- Determinar si existen cambios en la expresión de receptores para endocannabinoides en las células de glioblastoma después de la suplementación con DHA.

5. Justificación:

El glioblastoma es la tumoración cerebral de un grado mayor y más usual, con una supervivencia al año y 5 años de 39.3% y 5.5%, correspondientemente, y debido a su naturaleza infiltrativa y proximidad a estructuras críticas, la resección completa rara vez es posible. Debido a su letalidad, el tratamiento para glioblastomas incluye terapias multimodales con cirugía, radioterapia, quimioterapia y medicamentos dirigidos. El tratamiento farmacológico causa efectos secundarios severos, como fatiga, dolor, náuseas, vómito, en ciertos casos diarrea o estreñimiento, pérdida del apetito, alopecia, estos efectos secundarios son debidos a que los fármacos no solamente actúan sobre las células de cáncer, sino también sobre las células sanas. A pesar del uso de todos estos tratamientos, no se han encontrado alternativas útiles para incrementar la supervivencia o mejorar significativamente la calidad de vida de los pacientes.

A causa de ello, se continúa la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Entre ellas, las modificaciones dietéticas, como una buena alimentación rica en ácidos grasos omega-3, han mostrado su utilidad como inmunomoduladores e inhibidores del crecimiento tumoral en varios modelos experimentales. El uso del DHA como un adyuvante en terapia anticancerígena ha mostrado su efectividad en modelos de cáncer de mama, colon y próstata; no obstante, los mecanismos que promueven estos efectos a nivel celular aún no han sido plenamente esclarecidos.

Igualmente, múltiples estudios muestran al sistema endocanabinoide como un mecanismo fisiológico importante en la regulación del sistema inmunológico y en el crecimiento y apoptosis de células tumorales en diversos tipos de cáncer. Los endocannabinoides, a su vez, tienen estrecha relación con los ácidos grasos esenciales omega-3, dado que ambos comparten precursores lipídicos y sus concentraciones en el organismo se afectan mutuamente, teniendo como característica común el evitar la proliferación y desarrollo de células tumorales.

Debido a que los ácidos grasos omega-3 se relacionan con la producción de endocannabinoides y a que dicho sistema se relaciona igualmente con el control del metabolismo, proliferación y supervivencia celular en tumores, es de interés conocer los mecanismos que relacionan ambos sistemas, para determinar estrategias que permitan el empleo de estos en la práctica clínica.

6. Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, México.

6.1. Diseño de estudio

Tipo de estudio

Experimental, prospectivo, comparativo.

Universo de estudio

Cultivos de células derivadas de glioblastoma humano: línea celular U87MG.

Método de muestreo

Por conveniencia

Tamaño de muestra

5 millones de células por muestra, por triplicado.

6.2. Procedimientos

Cultivo de la línea celular

Las células que se utilizaron en este proyecto son pertenecientes a la línea celular U87MG, derivadas de células de glioblastoma humano. Las cuáles se encontraron disponibles en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se utilizaron los métodos para cultivo celular de la ATCC (American Type Culture Collection), específicos para la línea celular U87MG. Todos los procedimientos de cultivo celular se realizaron en esterilidad.

1. Descongelación

Los viales de la línea celular, almacenados a -70°C , se descongelaron a 37°C en baño de agua por 2 minutos, hasta que estuvieron parcialmente descongeladas. Las muestras se encontraban con Dimetil Sulfoxido (DMSO), que es una sustancia criopreservadora que a temperatura ambiente es tóxica para las células. Después de que estuvieron parcialmente descongeladas, se pasaron a hielo. La descongelación fue rápida, para evitar la muerte de las células. Las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS), el cual comprende cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, este se asemeja al líquido extracelular del organismo. La osmolaridad que tiene la solución coincide con la del cuerpo humano, ya que

es una solución isotónica y su pH es de 7.4. Más adelante, las células se centrifugaron a 2,500 rpm por 10 minutos a 20°C. Se quitó la solución criopreservadora con mucho cuidado, después se agregó más PBS y se volvió a centrifugar. Las células sedimentadas se homogenizaron con medio Eagle mínimo esencial modificado de Dulbecco (DMEM), que contiene una mezcla de aminoácidos como L-glutamina, que suministra nitrógeno para el NAD, el NADPH y los nucleótidos y ayuda como un origen de energía secundaria para el metabolismo; glucosa y galactosa, debido a que son la principal fuente de energía; sales inorgánicas, que asisten al sostenimiento del equilibrio osmótico y a ajustar el potencial de membrana al proveer iones de sodio, potasio y calcio, y; suero, que es una complicada suspensión de albúmina, factores de crecimiento e inhibidores del crecimiento; es uno de los elementos con mayor importancia de los medios de cultivo celular y ayuda como fuente de aminoácidos, proteínas y vitaminas, el cual fue completado con 7.5% de suero fetal bovino (SFB), que aporta factores de crecimiento y micronutrientes, los cuales complementan de manera adecuada los requerimientos metabólicos que aseguran la proliferación y adhesión celular, además del 1% de antibióticos (estreptomina y penicilina) y anfotericina, ya que estos evitan la contaminación y el crecimiento de microorganismos, como bacterias y hongos. El medio DMEM permitió el crecimiento celular *in vitro*, proveyendo los nutrientes claves necesitados por la célula y se colocaron en cajas Petri de 100x15cm con cultivo celular para incubarse a 37°C, con 5% CO₂ en incubadora para cultivo celular. Se cambiaron el medio al día siguiente para quitar los restos de DMSO que hayan quedado.

2. Cambio de medio DMEM

- Los cambios de medio de cultivo varían en cuestión de días, dependiendo del recipiente que se haya utilizado para el sembrado de las células.
- Para botellas de cultivo celular de 75cm², el cambio de medio de cultivo debe de realizarse cada 3 días.
- Para caja Petri de 100x15cm, el cambio de medio de cultivo debe de realizarse cada 2 días.
- Para caja de 6 pozos, el cambio de medio de cultivo debe de realizarse cada día.

El cambio de medio de cultivo sirve para reponer los nutrientes y eliminar los productos de degradación. Si se observa que el medio se torna naranja-amarillento, significa que el pH cambió y denota una acidificación en este. La línea celular puede mantenerse, antes de entrar a senescencia, entre 50 a 70 pases. Las células tienen la característica de adherirse al fondo de

la caja o botella. Una vez que las células comienzan a crecer y alcanzan una monocapa confluyente, es necesario separarlas para evitar que mueran.

Tripsinización

Este proceso se realizó periódicamente, ya que es parte del mantenimiento de las líneas celulares y se realizó antes de que el envase este completamente lleno de células, para evitar su muerte. La tripsina es una enzima que deshace los enlaces de las proteínas por medio del proceso de hidrólisis. En cultivos celulares de células adherentes se utiliza para desunir las células de la superficie de crecimiento y poder sostenerlas en suspensión. Sin embargo, si las células se suspenden mucho tiempo en tripsina, esta daña las células. Por ello, se debe inhibir la tripsina utilizando medio de cultivo, porque este contiene suero, que inhibe la acción de la tripsina.

Pasos:

- Se removió el medio de cultivo DMEM.
- Las células se lavaron cuidadosamente con PBS dos veces.
- Se removió la solución PBS.
- Se agregó una solución de tripsina/EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), el cual es un agente quelante que eliminará los cationes divalentes presentes en el medio que median la interacción célula-substrato, (0.05% - EDTA 0.53 mM).
- Se incubaron a 37°C durante 2-3 minutos, checando periódicamente y se dieron unos pequeños golpes para ayudar al despegue de las células.
- Se añadió posteriormente el medio DMEM con suero, para inhibir la tripsina. Se agregó la misma cantidad que se agregó de tripsina/EDTA.
- Se centrifugaron por 5 minutos a 3,000 revoluciones por minuto.
- Se quitó el sobrenadante con cuidado.
- Se resuspendieron en 1 mililitro de medio de cultivo.
- Se contaron las células en la cámara de Neubauer (Figura 6).

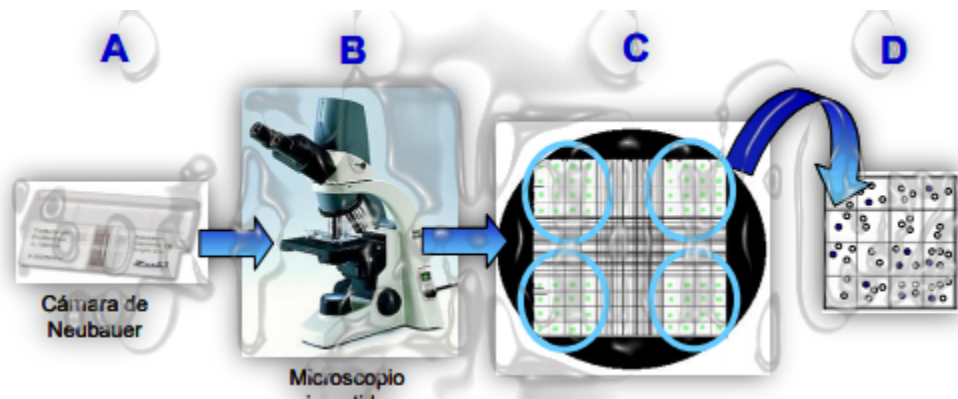


Figura 6. Cámara de Neubauer (Tomada de 90).

Proceso de conteo de células.

- Se tomaron 10 μL de la suspensión de células y se mezclaron con 90 microlitros de azul tripano al 0.4%.
- Se contaron las células en la cámara de Neubauer. Las células que estuvieron coloreadas de azul no se contaron, porque están inactivas, ya que el azul tripano es un coloide que se mete en el interior de las células que presentan rupturas en la membrana. Así pues, las células que se muestran de color azul son consideradas no servibles y estas no se contaron.
- Se sembraron las células en el medio DMEM
- Las células se incubaron a 37°C, con 5% CO_2 .

Suplementación con DHA en el medio de cultivo

Se adicionó DHA puro, marca SIGMA con número de catálogo D2534 Lot# SLCC6206, directamente en el medio de cultivo celular a concentraciones de 50, 100 y 150 μM , durante 24, 48 o 72 horas.

Determinación de la expresión de proteínas por western blot

Este procedimiento se realizó antes y después de la suplementación con DHA a las líneas celulares.

1. Extracción de proteínas

Buffer de lisis:

- 10 mL de Tris 0.5M pH 6.8
- 50 μL de EDTA 0.2M pH 8.0
- 200 μL de EGTA 50mM pH 7.9
- 102 μL de β -mercaptoetanol

- 1 mL de IGEPAL

Nivelar hasta el volumen de 100 mL con agua destilada, almacenar la solución en una botella de color ámbar o envuelta en papel de aluminio a 4°C. La solución permanece estable durante aproximadamente un mes si se almacena en condiciones adecuadas.

Completar con inhibidores de proteasas antes de usar:

- 5 µL/mL de Leupeptina (5 mg/mL).
- 5 µL/mL de aproptinina (10 mg/mL).
- 20 µL/mL de PMSF (10 mg/mL).
- 20 µL de Na₃VO₄ (100 mM). Opcional, este inhibidor desactiva fosfatasas de tirosina.
- 100 µL/mL de NaF (500 mM). Opcional, este inhibidor desactiva fosfatasas de serina.

Se agregó buffer de lisis a la capa de células dependiendo del tamaño del pozo o frasco de cultivo.

- 50 µL para placas de 12 pozos
- 70-100 µL para placas de 6 pozos
- 200-300 µL para frascos de 25 cm
- 500-1000 µL para frascos de 75 cm

Nota: la cantidad puede variar dependiendo de la confluencia de la capa celular.

Una vez agregado el buffer, se rasparán las células con un embolo de una jeringa de 1 mL o con un raspador de células. Se recuperarán las células en un tubo de 1.5 mL y se incubarán en hielo 45 minutos, haciendo vortex cada 15 minutos. Transcurridos los 45 minutos en hielo, se centrifugaron a 13,000 revoluciones por minuto por 25 minutos. Se recuperaron el sobrenadante en un tubo limpio y etiquetado. Se dosificaron las proteínas por el método de Bradford.

Nota: Si las proteínas no se usan inmediatamente pueden guardarse a -20°C por 1 o 2 semanas.

2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford (BIO-RAD)

Éstandares de albumina

Solución de trabajo: albumina bovina 2 mg/mL

Se prepararon los estándares como se indica en la siguiente tabla.

Concentración (mg/ml)	Albumina (2 mg/mL)	Agua destilada
0.1	50 μ L	950 μ L
0.2	100 μ L	900 μ L
0.4	200 μ L	800 μ L
0.6	300 μ L	700 μ L
0.8	400 μ L	600 μ L
1.0	500 μ L	500 μ L
1.2	600 μ L	400 μ L

Los tubos se guardaron a 4°C.

Se alistó el reactivo de para cuantificar proteínas por el método de Bradford con agua destilada a una dilución de 1:4. Se alistó lo equivalente a 200 μ L/pozo (se preparó extra para unos 4-6 pozos). En una placa de 96 pozos, se colocaron 5 μ L de los estándares en dos pozos dejando vacíos, los dos primeros pozos como blanco (solo mezcla Bradford). Se mezcló la muestra con el vortex y se añadió 1 μ L de cada muestra por duplicado. Se utilizó el buffer de lisis como control negativo (para verificar que el buffer solo no reacciona con el Bradford). Se agregó 200 μ L/mL por pozo, se agitó ligeramente, se removi6 las burbujas con una punta y se ley6 la absorbancia a 595nm. Se calcul6 la concentraci6n de prote6na en las muestras en relaci6n con la concentraci6n de los est6ndares, empleando regresi6n lineal. Se alistaron las muestras a una concentraci6n de 1 μ g/ μ L, considerando que se tiene que agregar “*sample loading buffer*” (SLB) 4x (la concentraci6n final del buffer de carga es 1X). Las muestras se colocaron en un ba6o seco 5 min a 95°C y al terminar este tiempo, se incubaron otros 5 min en hielo antes de utilizarlas para la separaci6n de prote6nas. Cuando se present6 volumen de evaporaci6n en la tapa del tubo, las muestras se centrifugaron 1 min a 13,000 rpm para no perder volumen por el agua evaporada.

Buffer de carga de muestra (SLB) 4X

- 3.8 mL de agua destilada
- 1 mL de Tris 0.5M pH 6.8
- 0.8 mL de Glicerol
- 0.4 mL de azul de bromofenol al 1%
- 1.6 mL de SDS 10%

El buffer se alicuotó en tubos de 1.5 mL con 950 μ L de la mezcla y fueron almacenados a -20°C. Previa al uso de cada tubo, se completó con 50 μ L por tubo de 2- β -mercaptoetanol. El tubo que ya tiene mercaptoetanol se guardó a 4°C.

3. Preparación de geles de acrilamida

Acrilamida/Bis 30%, 2.67%

- 146 g de acrilamida (altamente neurotóxica, utilizar guantes, bata y cubrebocas)
- 4 g de N'N metileno-bis acrilamida

Se disolvió en 300 mL de agua. Cuando estuvo disuelta, se completó a 500 mL y se filtró con gasa. Se guardó a 4°C en un frasco ámbar o frasco envuelto en papel aluminio.

Preparación del gel de corrida (running gel) 10%

	6%	7.5%	10%	12%
Agua destilada	5.3 mL	4.8 mL	6.97 mL	3.3 mL
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	4.25 mL	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L	100 μ L	170 μ L	100 μ L
Acrilamida/Bis 30%, 2.67	2.0 mL	2.5 mL	5.61 mL	4.0 mL
APS 10%	100 μ L	100 μ L	170 μ L	100 μ L
TEMED	25 μ L	25 μ L	34 μ L	25 μ L
Volumen total	10 mL	10 mL	17 mL	10 mL

Preparación del gel de apilamiento (stacking gel) 4%

	4%
Agua destilada	6.1 mL
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 μ L
Acrilamida/Bis 30%, 2.67	1.33 mL
APS 10%	100 μ L
TEMED	25 μ L

Volumen total	10 mL
---------------	-------

Se prepararon los geles al porcentaje deseado, limpiando previamente los vidrios con etanol al 70%

Se preparó el buffer de corrida del concentrado 5X.

Buffer de corrida (running buffer) 5X

- 15 g de Tris base
- 72 g de Glicina

Se disolvió en 700 mL de agua destilada y se completó a 1 L, filtrar con gasa. Se almacenó a temperatura ambiente.

Buffer de corrida 1X

Running buffer 5X	200 mL
SDS 10%	10 mL
Agua destilada	790 mL

Una vez ensamblada la cámara de electroforesis, se llenó con buffer de corrida y se removieron los peines cuidadosamente para no dañar los pozos. En el primer pozo, se agregaron 3µL del marcador de peso molecular. En los pozos subsecuentes, se cargaron 30µg de proteína por muestra (previamente calentadas y centrifugadas). Se corrió a 100V, hasta que el frente de corrida llegue al fondo del gel.

Nota: los µg de proteína pueden variar dependiendo el anticuerpo primario. Para algunos que están más diluidos, se deberá cargar de 50 a 100 µg de proteína.

4. Transferencia de proteínas en membrana PVDF

Buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol)

Cuando la migración de las proteínas terminó, se desensamblaron los geles, se cortó el gel de apilamiento y se remojó el gel en buffer de transferencia.

Por cada gel se prepararon:

- 1 membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF): es un fluoropolímero termoplástico altamente inerte químicamente. Se emplea en condiciones que requieren mucha pureza,

fortaleza y elevada resistencia a ácidos, bases y disolventes. Esta membrana se utiliza por su capacidad para adsorber polipéptidos de forma inespecífica (cortar del tamaño del gel para economizar) y se cortó una pequeña pestaña en la esquina derecha.

- 4 papeles whatman gruesos, los cuales son filtros estándares de referencia mundial por su calidad y fiabilidad para la filtración en técnicas de laboratorio.

Las membranas se hidrataron en metanol absoluto por un periodo de 30 segundos y después se enjuagó con buffer de transferencia aproximadamente por 1 o 2 minutos. Se empaparon las esponjas y los papeles whatman con buffer de transferencia. Se preparó el sándwich de transferencia como se indica a continuación:

- Esponja/2 papeles whatman/gel (con el marcador de peso molecular en el lado derecho)/membrana (con la esquina cortada en el mismo lado del marcador de peso molecular)/esponja.
- En cada paso eliminar las burbujas en cada paso, rodando una pipeta.

En la transferencia en cámara húmeda se llenó e insertó el casete con cuidado para no crear burbujas, se añadió un poco más de buffer y transferir a 60mA ~30V por toda la noche a 4°C. Al terminar el tiempo de transferencia se sacó la membrana y se enjuagó en TBS-Tween 20.

TBS 10X

- 80 g NaCl
- 24.2 g Tris base

Se disolvió en 800 mL de agua destilada, se ajustó pH a 7.6 con HCl y se ajustó el volumen final a 1 L.

TBS 1X-Tween 20

- 100 mL de TBS 10X
- 1 mL de Tween 20 (concentración final 0.01%)
- 899 mL de agua destilada

5. Incubación de las membranas con los anticuerpos

Para reducir el riesgo de unión inespecífica, la membrana se bloqueó durante 1 hr a temperatura ambiente con albumina bovina al 1% en TBS-Tween según sea la indicación (1 o 5 g de albumina bovina por cada 100 mL de TBS-T). Las membranas fueron bloqueadas toda la noche a 4°C en agitación. Se incubó el anticuerpo primario previamente diluido (en albumina) 1 hr a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en agitación. Se lavó 3 veces 5

min con TBS-Tween. Se incubó la membrana con el anticuerpo secundario 1hr a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces 5min con TBS-Tween. Se desarrolló la membrana con el método disponible en el laboratorio (diaminobenzidina).

Nota: Las diluciones de los anticuerpos varían según el fabricante, así como el tiempo de incubación y la solución en la que se diluyen.

Otras soluciones:

Persulfato de amonio 10% (APS 10%)

1 g de persulfato de amonio se disuelve en 10 mL de agua destilada. Guardar a 4°C.

Tris 1.5 M pH 8.8

18 g de Tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Tris 0.5 M pH 6.8

6 g de Tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 6.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Lauril sulfato de sodio 10% (SDS 10%)

10 g de SDS, disolver en 70 mL de agua destilada, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua.

Determinación de la expresión de proteínas por microscopía de fluorescencia

Este procedimiento se realizó antes y después de la suplementación con DHA en el medio de cultivo.

Sembrado celular en cubreobjetos

Se limpiaron los cubreobjetos a utilizar con alcohol al 70%. Una vez limpios los cubreobjetos, se colocaron en la caja de 6 pozos, a la cual se le agregó alcohol al 70% y se dejó en la campana con luz UV hasta que la caja esta seca completamente. Los cubreobjetos quedaron fijos a la caja donde las células fueron cultivadas. La migración de las células se realizó de acuerdo con el procedimiento de tripsinización y después las células fueron sembradas directamente sobre los cubreobjetos, que estaban ya esterilizados y colocados en la placa de

cultivo celular de 6 pozos, donde se agregaron 1.5 mL de medio de cultivo completo para la supervivencia de las células.

Buffer de bloqueo

PBS + Tritón ó PBS + Tween

BSA 1%

Buffer de lavado PBS 1x + Tween 20

1 mL de PBS + 1 μ L de Tween 20, guardarlo en refrigeración 4°C.

Buffer de lavado PBS 1x + Tritón

10 mL de PBS + 30 μ L de Tritón.

Tinción de inmunofluorescencia

- Una vez que hubo suficientes células en los cubreobjetos (estas aún deben tener espacio entre ellas), se removió el medio de cultivo.
- Se hicieron lavados con 1ml de PBS en agitación, este debe cubrir todo el pozo.
- Se removió el PBS.
- Procedimiento metanol -20°C.
 - Se agregó 1.5 mL de metanol -20°C, se mantuvo en refrigeración por 15 min.
 - Se hicieron 3 lavados con PBS-Tritón.
 - Se retiró el PBS-Tritón, se agregó el bloqueo con PBS-Tritón + BSA 1%, se dejó 1 hora en agitación.
 - Se retiró el bloqueador y se hicieron 3 lavados con PBS-Tritón.
 - Se retiró el PBS-Tritón y se añadieron los anticuerpos primarios, tomando en cuenta la siguiente proporción 1:100 diluidos en PBS-Tritón.
 - Se dejó incubando a 4°C durante la noche en oscuridad.
 - Se lavaron con PBS-Tritón, 3 veces por 5 min cada vez.
 - Se agregaron anticuerpos secundarios, a una dilución de 1:200, y se incubaron por 2 horas a 4°C, en oscuridad.
 - Se lavaron con PBS-Tritón.
 - En un portaobjetos se agregó 35 μ L de Vectashield.
 - Se colocó el cubreobjetos cuidando que el lado que contiene las células toque el portaobjetos.

- Se dejó secar y posteriormente se colocó barniz alrededor del cubreobjetos para sellar.
- Se observó a microscopio de fluorescencia Nikon Ti, empleando objetivos 20x y 60x.

NOTA: Dilución 1:100= 1 μ L de anticuerpo y 99 μ L de PBS-Tritón o PBS + Tween 20.

La información de los anticuerpos, compañía y número de catálogo se proporcionará una vez que se empiece con la experimentación.

Análisis de la expresión de receptores para endocannabinoides

El análisis de la expresión dependió de los métodos de western blot y microscopia de fluorescencia, por medio de densitometría y valores de intensidad media de fluorescencia y número de células positivas para cada marcador, mediante el programa Image J.

6.3. Variables de Estudio

- Variable independiente: Cultivo celular, suplementación con DHA
- Variable dependiente: Expresión de receptores para endocannabinoides.

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Cultivo celular	Proceso mediante el que se cultivan células individuales en condiciones controladas fuera de un organismo vivo.	Siembra y cultivo de números específicos de células de líneas celulares comerciales en condiciones controladas de incubación (Medio de cultivo, tiempo, 37°C, 5% CO ₂), <i>in vitro</i> .	Independiente	Cuantitativa discreta / continua	Número de células por muestra Tiempo de cultivo
Suplementación con DHA	Adición de ácido docosahexaenoico purificado a los cultivos celulares	Adición directa de concentraciones variables de DHA al medio de cultivo celular durante tiempos de exposición variables.	Independiente	Cuantitativa discreta	50, 100 o 150 μM 24, 48 o 72 horas
Expresión de receptores para endocannabinoides	Disposición de los receptores de endocannabinoides CB1 o CB2 en las células en cultivo.	Rastreo de la disposición de los receptores en las células, determinada por medio de densitometría de las bandas de proteína obtenidas por western blot Determinación de la intensidad media de fluorescencia de los	Dependiente	Cuantitativa continua	Densidad de la banda en relación al control de carga (valor arbitrario) Intensidad media de fluorescencia (valor arbitrario)

		receptores en las células, detectada por microscopía de fluorescencia			
--	--	---	--	--	--

6.4. Implicaciones Bioéticas

El protocolo se envió a revisión al Comité de Ética de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. Cumpliendo con el Parte I y III, Artículo 315, Capítulo 1 del Título Decimocuarto, de la Ley General de Salud.

6.5. Recolección de datos

Se recolectaron los datos obtenidos por medio de los programas ImageJ y Nikon Viewer y se compilaron en bases de datos con los programas estadísticos SPSS.

6.6. Análisis estadístico

En este estudio paramétrico, los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de ANOVA de medidas repetidas, para comparación de la expresión de los receptores entre grupos experimentales y ANOVA de dos vías, para el análisis del impacto de la concentración y tiempo de exposición al DHA sobre la expresión de los receptores para endocannabinoides.

7. Referencias Bibliográficas:

1. Contreras LE. Epidemiología De Tumores Cerebrales. Revista Médica Clínica Las Condes. 2017;28(3):332-8.
2. Miguel Ángel Celis MAA-L, Alberto González-Aguilar¹, et al. Primer consenso mexicano sobre recomendaciones de la atención multidisciplinaria del paciente con glioblastoma multiforme (GBM). Grupo Interdisciplinar Mexicano de Investigación en Neurooncología (GIMINO). Gaceta Médica de México. 2015;151:403-15.
3. Wirsching HG GE, Weller M. . Glioblastoma Handbook of clinical neurology. 2016;139:381-97.
4. Wang Y, Liu X, Guan G, Zhao W, Zhuang M. A Risk Classification System With Five-Gene for Survival Prediction of Glioblastoma Patients. Frontiers in neurology. 2019;10:745.
5. Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2013;19(4):764-72.
6. Batash R, Asna N, Schaffer P, Francis N, Schaffer M. Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review. Current medicinal chemistry. 2017;24(27):3002-9.
7. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2016;35(1):23.
8. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. Jama. 2015;314(23):2535-43.
9. Minion LE, Tewari KS. The safety and efficacy of bevacizumab in the treatment of patients with recurrent or metastatic cervical cancer. Expert review of anticancer therapy. 2017;17(3):191-8.
10. Giordano FA, Wenz F, Petrecca K. Rationale for intraoperative radiotherapy in glioblastoma. Journal of neurosurgical sciences. 2016;60(3):350-6.
11. Martínez YYN. Efectos de los corticoides en el perfil metabólico, en la evolución y el pronóstico de los pacientes con glioblastoma [Doctoral]: Universidad Autónoma de Barcelona; 2018.
12. Davis ME. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. Clinical journal of oncology nursing. 2016;20(5 Suppl):S2-8.

13. Soler JP-C. Alimentación y terapia nutricional coadyuvante al tratamiento del cáncer. In: Panamericana EM, editor. *Oncología Integrativa: Manual básico y clínico*. España 2020. p. 315-30.
14. Oliva Anaya CA, Mederos Curbelo ON, García Sierra JC, Barrera Ortega JC, Castellanos González JA. Soporte nutricional y calidad de vida en pacientes con cáncer de esófago y cardias. *Revista Cubana de Cirugía*. 2016;55:0-.
15. Alvarez Cano Fernandez JC, Neyra Najar AS. Una revisión sistemática de la dieta cetogénica como coadyuvante efectivo del tratamiento del cáncer. 2020.
16. Martuscello RT, Vedam-Mai V, McCarthy DJ, Schmoll ME, Jundi MA, Louviere CD, et al. A Supplemented High-Fat Low-Carbohydrate Diet for the Treatment of Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(10):2482-95.
17. Samara Palma Milla ALCyCGC. Nutrición Parenteral en el paciente oncológico. *Nutrición Clínica en Medicina*. 2015;IX(2):173-87.
18. Hernando Requejo O, Rubio Rodríguez, M.^a Carmen Nutrición y cáncer. *Nutrición Hospitalaria*. Redalyc. 2015;32(1):67-72.
19. Bermejo LM G-CC, Dahdouh S, López Plaza B. Compuestos bioactivos de alimentos como coadyuvantes a los tratamientos de cáncer de mama: vitamina D y omega-3. *Nutrición Hospitalaria*. 2018;35(6):64-9.
20. Gaston R, Maria Eugenia P, Das UN, Eynard AR. Polyunsaturated Fatty Acids Differentially Modulate Cell Proliferation and Endocannabinoid System in Two Human Cancer Lines. *Archives of medical research*. 2017;48(1):46-54.
21. Mita R, Beaulieu MJ, Field C, Godbout R. Brain fatty acid-binding protein and omega-3/omega-6 fatty acids: mechanistic insight into malignant glioma cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(47):37005-15.
22. D'Eliseo D, Di Renzo L, Santoni A, Velotti F. Docosahexaenoic acid (DHA) promotes immunogenic apoptosis in human multiple myeloma cells, induces autophagy and inhibits STAT3 in both tumor and dendritic cells. *Genes & cancer*. 2017;8(1-2):426-37.
23. Collection ATC. U-87 MG (ATCC® HTB-14™) 2020. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx#characteristics>.
24. González MdLI. Línea celular U87MG. 2021.
25. Li N, Zhang P, Kiang KMY, Cheng YS, Leung GKK. Caffeine Sensitizes U87-MG Human Glioblastoma Cells to Temozolomide through Mitotic Catastrophe by Impeding G2 Arrest. *BioMed research international*. 2018;2018:5364973.

26. Erukainure OL, Ashraf N, Naqvi AS, Zaruwa MZ, Muhammad A, Odusote AD, et al. Fatty Acids Rich Extract From *Clerodendrum volubile* Suppresses Cell Migration; Abates Oxidative Stress; and Regulates Cell Cycle Progression in Glioblastoma Multiforme (U87 MG) Cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9(251).
27. Najlah M, Kadam A, Wan K-W, Ahmed W, Taylor KMG, Elhissi AMA. Novel paclitaxel formulations solubilized by parenteral nutrition nanoemulsions for application against glioma cell lines. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;506(1):102-9.
28. Di Marzo V, Piscitelli F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. 2015;12(4):692-8.
29. Ramer R, Schwarz R, Hinz B. Modulation of the Endocannabinoid System as a Potential Anticancer Strategy. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10(430).
30. Murillo-Rodriguez E, Pastrana-Trejo JC, Salas-Crisostomo M, de-la-Cruz M. The Endocannabinoid System Modulating Levels of Consciousness, Emotions and Likely Dream Contents. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2017;16(4):370-9.
31. Basavarajappa BS, Shivakumar M, Joshi V, Subbanna S. Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. *Journal of neurochemistry*. 2017;142(5):624-48.
32. Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in lipid research*. 2016;62:107-28.
33. Flygare J, Sander B. The endocannabinoid system in cancer-potential therapeutic target? *Seminars in cancer biology*. 2008;18(3):176-89.
34. Jourdan T, Godlewski G, Kunos G. Endocannabinoid regulation of beta-cell functions: implications for glycaemic control and diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2016;18(6):549-57.
35. Cueto CR. Desregulación del sistema endocannabinoide en las ataxias espinocerebelosas [Tesis de Doctorado]. Dialnet: Universidad Complutense de Madrid; 2015.
36. González MdLI. Mecanismo de acción para la síntesis de AEA y 2-AG 2020.
37. Ruginsk SG, Vechiato FM, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. The endocannabinoid system and the neuroendocrine control of hydromineral balance. *Journal of neuroendocrinology*. 2014;26(6):370-6.
38. Aban CE, Accialini PL, Etcheverry T, Leguizamon GF, Martinez NA, Farina MG. Crosstalk Between Nitric Oxide and Endocannabinoid Signaling Pathways in Normal and Pathological Placentation. *Frontiers in physiology*. 2018;9:1699.

39. Ahamed M, van Veghel D, Ullmer C, Van Laere K, Verbruggen A, Bormans GM. Synthesis, Biodistribution and In vitro Evaluation of Brain Permeable High Affinity Type 2 Cannabinoid Receptor Agonists [(11)C]MA2 and [(18)F]MA3. *Frontiers in neuroscience*. 2016;10:431.
40. Li Y, Kim J. CB2 Cannabinoid Receptor Knockout in Mice Impairs Contextual Long-Term Memory and Enhances Spatial Working Memory. *Neural plasticity*. 2016;2016:9817089.
41. Ana Isabel Fraguas-Sánchez AMF-C, Ana Isabel Torres-Suárez. Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2014;80(3).
42. Panagis G, Mackey B, Vlachou S. Cannabinoid Regulation of Brain Reward Processing with an Emphasis on the Role of CB1 Receptors: A Step Back into the Future. *Frontiers in psychiatry*. 2014;5:92.
43. Alonso. MH. Cannabinoides y la Enfermedad de Alzheimer. [Posgrado]: Universidad de la Laguna; 2019.
44. Ghosh S, Gonzalez-Mariscal I, Egan JM, Moaddel R. Targeted proteomics of cannabinoid receptor CB1 and the CB1b isoform. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2017;144:154-8.
45. Alejandra E. Ruiz-Contreras IO-M, Octavio Amancio Belmont. Marihuana y sus efectos sobre el cerebro, la toma de decisiones y la inteligencia. Una revisión narrativa. *Revista internacional de investigación en adicciones*. 2016;2(2):47-53.
46. Luz Angela Rojas Bernal GACP. Neurobiología de la patología dual. *Health and Addictions*. 2017;17(2):108-9.
47. Balenga NA, Martinez-Pinilla E, Kargl J, Schroder R, Peinhaupt M, Platzer W, et al. Heteromerization of GPR55 and cannabinoid CB2 receptors modulates signalling. *British journal of pharmacology*. 2014;171(23):5387-406.
48. Lax P, Esquivá G, Altavilla C, Cuenca N. Neuroprotective effects of the cannabinoid agonist HU210 on retinal degeneration. *Experimental eye research*. 2014;120:175-85.
49. Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. 2016;73(23):4449-70.
50. Howlett AC, Abood ME. CB1 and CB2 Receptor Pharmacology. *Advances in pharmacology*. 2017;80:169-206.
51. Osuka S, Van Meir EG. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(2):415-26.

52. Lopez-Valero I, Saiz-Ladera C, Torres S, Hernandez-Tiedra S, Garcia-Taboada E, Rodriguez-Fornes F, et al. Targeting Glioma Initiating Cells with A combined therapy of cannabinoids and temozolomide. *Biochemical pharmacology*. 2018;157:266-74.
53. Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and cancer: therapeutic implication. *British journal of pharmacology*. 2014;163(7):1447-63.
54. Martinez EM. Efecto de la activacion del receptor CB2 en la fisiopatologia del cancer colorrectal. Madrid: Universidad Autonoma de Madrid; 2016.
55. Blazquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, Gonzalez-Feria L, et al. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer research*. 2008;68(6):1945-52.
56. Tejada S, Martorell M, Capo X, Tur JA, Pons A, Sureda A. Omega-3 Fatty Acids in the Management of Epilepsy. *Current topics in medicinal chemistry*. 2016;16(17):1897-905.
57. Coronado M VS, Gutiérrez R, García B, Díaz G. Los ácidos grasos Omega-3 y Omega-6: Nutrición, bioquímica y salud. Universidad Autónoma Metropolitana. 2016;25(3):72-9.
58. autor Cpe. Ácidos grasos Omega-3 estructura química. 2019.
59. Hernandez-Rodas MC, Morales P J, Valenzuela B R, Morales I G, Valenzuela B A. Beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3 en la enfermedad por hígado graso no alcohólico. *Revista chilena de nutrición*. 2016;43:196-205.
60. Costantini L, Molinari R. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. 2017;18(12).
61. Forsyth S, Gautier S, Salem N. The importance of dietary DHA and ARA in early life: a public health perspective. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2017;76(4):568-73.
62. Cardoso C, Afonso C, Bandarra NM. Dietary DHA and health: cognitive function ageing. 2016;29(2):281-94.
63. Castellanos T L, Rodriguez D M. El efecto de omega 3 en la salud humana y consideraciones en la ingesta. *Revista chilena de nutrición*. 2015;42:90-5.
64. Valenzuela B RTO, Gladys González E, Marcela Valenzuela B, Alfonso. Ácidos grasos Omega-3 (EPA Y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista chilena de nutrición*. 2011;38:356-67.
65. Matencio Hilla E, Abellán Ballesta P, Romero Braquehais F. Funcionalidad y recomendaciones nutricionales de ácidos grasos esenciales y sus derivados en la alimentación del lactante a partir de los 6 meses de edad. *Enfermería Global*. 2012;11:367-80.
66. González MdLI. Síntesis del DHA. 2020.

67. Orellana P, Valenzuela R, Valenzuela A, Morales GI. Efectos neuroprotectores del ácido araquidónico y del ácido docosahexaenoico en las etapas extremas de la vida: Una visión integradora. *Revista chilena de nutrición*. 2018;45:80-8.
68. Prokopiou E, Kolovos P, Kalogerou M, Neokleous A, Papagregoriou G, Deltas C, et al. Therapeutic potential of omega-3 fatty acids supplementation in a mouse model of dry macular degeneration. *BMJ open ophthalmology*. 2017;1(1):e000056.
69. DÍAZ ORTEGA JLVG, Christian Jhonatan. Bases moleculares de los derivados metabólicos de ácidos omega -3 en el proceso antiinflamatorio. *Dialnet*. 2014;4(2):175-7.
70. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in aging neuroscience*. 2015;7:52.
71. Horrocks LA, Yeo YK. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological research*. 1999;40(3):211-25.
72. M. Gil-Campos JDS. Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE PEDIATRÍA*. 2010;73(3):142.
73. Sanhueza JN, Susana Valenzuela, Alfonso. Ácido docosahexaenoico (DHA), desarrollo cerebral, memoria y aprendizaje: La importancia de la suplementación perinatal. *Revista chilena de nutrición*. 2014;31:84-92.
74. Lauritzen L, Brambilla P, Mazzocchi A, Harslof LB, Ciappolino V, Agostoni C. DHA Effects in Brain Development and Function. *Nutrients*. 2016;8(1).
75. Colombo J, Jill Shaddy D, Kerling EH, Gustafson KM, Carlson SE. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) balance in developmental outcomes. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*. 2017;121:52-6.
76. Brown I, Cascio MG, Rotondo D, Pertwee RG, Heys SD, Wahle KW. Cannabinoids and omega-3/6 endocannabinoids as cell death and anticancer modulators. *Progress in lipid research*. 2013;52(1):80-109.
77. Velasco PR. Papel del receptor endocannabinoides tipo 1 en la respuesta a glucocorticoides en la línea celular de músculo esquelético C2C12 [Master]: Universidad de Chile; 2017.
78. Dyall SC. Interplay Between n-3 and n-6 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Endocannabinoid System in Brain Protection and Repair. *Lipids*. 2017;52(11):885-900.
79. González MdLI. Biosíntesis e hidrólisis de los endocannabinoides 2021.

80. McDougale DR, Watson JE, Abdeen AA, Adili R, Caputo MP, Krapf JE, et al. Anti-inflammatory ω -3 endocannabinoid epoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(30):E6034-E43.
81. Elsherbiny ME, Chen H, Emara M, Godbout R. omega-3 and omega-6 Fatty Acids Modulate Conventional and Atypical Protein Kinase C Activities in a Brain Fatty Acid Binding Protein Dependent Manner in Glioblastoma Multiforme. 2018;10(4).
82. MELÓN JMO. Proteína quinasas como dianas farmacológicas 2010. 28-32].
83. Kim S, Jing K, Shin S, Jeong S, Han SH, Oh H, et al. omega3-polyunsaturated fatty acids induce cell death through apoptosis and autophagy in glioblastoma cells: In vitro and in vivo. *Oncology reports*. 2018;39(1):239-46.
84. Lin R, Zhang Z, Chen L, Zhou Y, Zou P, Feng C, et al. Dihydroartemisinin (DHA) induces ferroptosis and causes cell cycle arrest in head and neck carcinoma cells. *Cancer letters*. 2016;381(1):165-75.
85. Du J, Wang T, Li Y, Zhou Y, Wang X, Yu X, et al. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin. *Free radical biology & medicine*. 2019;131:356-69.
86. Sam MR, Esmaeillou M, Shokrgozar MA. Fish-Oil-Derived DHA-mediated Enhancement of Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells is Associated with Accumulation of p53, Downregulation of Survivin, and Caspase-3 Activation. *Nutrition and cancer*. 2017;69(1):64-73.
87. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2008;445:77-88.
88. Chen S, Zhang H, Pu H, Wang G, Li W, Leak RK, et al. n-3 PUFA supplementation benefits microglial responses to myelin pathology. *Scientific reports*. 2014;4:7458.
89. Kim SH, Kang SH, Kang BS. Therapeutic effects of dihydroartemisinin and transferrin against glioblastoma. *Nutrition research and practice*. 2016;10(4):393-7.
90. González MdLI. Conteo celular por el método de la cámara de Neubauer. 2021.

8. Anexos:

8.1. Carta de envío del artículo:

Journal of Molecular Neuroscience - Submission Notification to Author

em.jomn.0.6d67c9.5b50029d@editorialmanager.com
<em.jomn.0.6d67c9.5b50029d@editorialmanager.com>
on behalf of

Journal of Molecular Neuroscience <em@editorialmanager.com>

Wed 30/06/2021 12:22

To: José Antonio Estrada Guadarrama <jaestrada@uaemex.mx>

Re: "Expression of endocannabinoid receptors in human glioblastoma cells supplemented with DHA"

Full author list: María de Lourdes González-Ibañez, BSc; Irazú Contreras, PhD; José A. Estrada, PhD

Dear Dr José Estrada,

We have received the submission entitled: "Expression of endocannabinoid receptors in human glioblastoma cells supplemented with DHA" for possible publication in Journal of Molecular Neuroscience, and are listed as the corresponding author.

You will be able to track the status of the submission through your login.

If you have any queries, please contact the editorial office as soon as possible.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Journal of Molecular Neuroscience

****Our flexible approach during the COVID-19 pandemic****

If you need more time at any stage of the peer-review process, please do let us know. While our systems will continue to remind you of the original timelines, we aim to be as flexible as possible during the current pandemic.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal

8.2. Resumen del artículo:

Abstract

Glioblastoma is the most common primary tumor of the central nervous system. Despite multimodal therapies, it has no effective treatment, and its mortality rate exceeds 90%. Alternative therapies are being explored to improve life expectancy and quality of life for the patients, as well as enhancing the effects of traditional pharmacological and radiological treatments. Among these, nutritional supplementation with Omega-3 fatty acids has demonstrated its usefulness in clinical settings, as it has significant antiproliferative and proapoptotic effects on cancer cells. On the other hand, endocannabinoids are endogenous substances that have also shown antiproliferative and proapoptotic effects on tumor cells and may be produced directly from Omega-3 fatty acids. Despite their relationship, their possible synergism has not been fully explored as a potential therapeutic alternative for the treatment of cancer patients. The current study explored the potential effect of supplementation with Omega-3 fatty acids on the expression of endocannabinoid receptors in human glioblastoma cells. U87MG glioblastoma cells were supplemented *in vitro* with varying concentrations of docosahexaenoic acid for up to 72 hours and their expression of endocannabinoid receptors CB1 and CB2 was assessed by western blot and immunofluorescence. Results show a significant dose-dependent increase in CB1 receptor expression in glioblastoma cells after 50 μM docosahexaenoic acid supplementation for 72 hours. Nonetheless, CB1 and CB2 expression was decreased in glioblastoma cells supplemented with docosahexaenoic acid at 100 μM , corresponding with increased apoptosis in these cells. Our results suggest that supplementation with docosahexaenoic acid directly modulates endocannabinoid receptor expression in human glioblastoma cells *in vitro*, which may be relevant for regulating their antitumoral effect *in vivo*.

Resumen

El glioblastoma es el tumor primario más común del sistema nervioso central. A pesar de las terapias multimodales, no tiene un tratamiento eficaz y su tasa de mortalidad supera el 90%. Se están explorando terapias alternativas para mejorar la esperanza de vida y la calidad de vida de los pacientes, así como potenciar los efectos de los tratamientos farmacológicos y radiológicos tradicionales. Entre estos, la suplementación nutricional con ácidos grasos Omega-3 ha demostrado su utilidad en entornos clínicos, ya que tiene importantes efectos antiproliferativos y proapoptóticos sobre las células cancerosas. Por otro lado, los endocannabinoides son

sustancias endógenas que también han mostrado efectos antiproliferativos y proapoptóticos sobre las células tumorales y pueden producirse directamente a partir de ácidos grasos omega-3. A pesar de su relación, su posible sinergia no se ha explorado completamente como una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de pacientes con cáncer. El estudio actual exploró el efecto potencial de la suplementación con ácidos grasos Omega-3 sobre la expresión de receptores endocannabinoides en células de glioblastoma humano. Las células de glioblastoma U87MG se suplementaron *in vitro* con concentraciones variables de ácido docosahexaenoico durante hasta 72 horas y se evaluó su expresión de los receptores endocannabinoides CB1 y CB2 mediante transferencia de Western e inmunofluorescencia. Los resultados muestran un aumento dependiente de la dosis significativo en la expresión del receptor CB1 en células de glioblastoma después de la suplementación con ácido docosahexaenoico 50 μM durante 72 horas. No obstante, la expresión de CB1 y CB2 se redujo en células de glioblastoma suplementadas con ácido docosahexaenoico a 100 μM , lo que corresponde a un aumento de la apoptosis en estas células. Nuestros resultados sugieren que la suplementación con ácido docosahexaenoico modula directamente la expresión del receptor endocannabinoides en células de glioblastoma humano *in vitro*, lo que puede ser relevante para regular su efecto antitumoral *in vivo*.