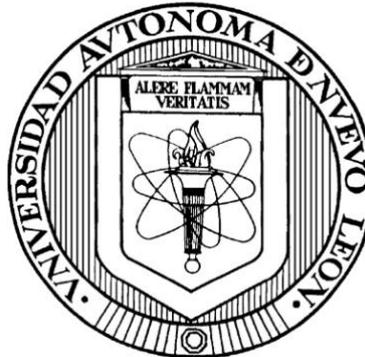


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Análisis del efecto citotóxico del Cannabidiol sobre líneas celulares cancerígenas”

POR

MVZ. JONATHAN EMMANUEL PERALES MARTÍNEZ

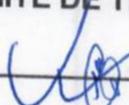
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Mayo, 2024

“Análisis del efecto citotóxico del Cannabidiol sobre líneas celulares cancerígenas”

Aprobación de tesis por el comité particular del
MVZ. Jonathan Emmanuel Perales Martínez

COMITÉ DE TESIS



Dr. Uziel Castillo Velázquez

Presidente



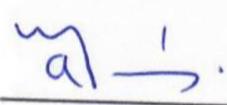
PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar

Secretario



Dr. Adolfo Soto Domínguez

Vocal



Dra. Alicia Magdalena Nevárez
Garza

Vocal



Dra. Aimé Garza Arredondo

Vocal

Análisis del efecto citotóxico del Cannabidiol sobre líneas celulares cancerígenas”

Aprobación de tesis por el comité particular de
MVZ. Jonathan Emmanuel Perales Martínez

COMITÉ DE TESIS



Dr. Uziel Castillo Velázquez

Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez

Director o Codirector Externo



Dr. Uziel Castillo Velázquez

Subdirector de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Jesús Perales y Honoria Martínez, quienes me inculcaron los valores que ahora me rigen como persona, por hacer de mí un hombre de bien, por enseñarme a trabajar y salir adelante. A mi hermano mayor Israel quien es mi ejemplo a seguir, a mi cuñada Angélica, mis sobrinos Linus, Daniel e Hiram que me han dado la fuerza de seguir adelante. A mi hermano menor Ángel por estar conmigo en los momentos difíciles. A Alyson, que me acompañaste antes de que comenzara este proyecto; a mi amigo Rodrigo, gracias por los consejos y tu apoyo incondicional. Jonas, Jeny y Kibsaim, muchas gracias por tanto de verdad. Edgar, llegaste en el momento indicado, evitándome llegar a la locura. Kevin, gracias por abrir esta línea de investigación, eres un ejemplo por seguir.

Dr. Doctor Uziel Castillo Velázquez gracias también, por creer en mí desde el inicio de la carrera, por el apoyo en mi desarrollo profesional, por los regaños, consejos.

Gracias a todos los laboratorios y al personal que ayudó para la culminación de este trabajo. Estando en Tizayuca, por ti pude visualizar un plan para mi desarrollo profesional y la culminación de este trabajo es solo un escalón de todo lo que me propuse.

DEDICATORIA

A mi amigo Óscar Adán Becerra Sifuentes, que continúa luchando contra el cáncer; a mi familia, que en todo momento me apoyó me dio ánimo y fuerza para seguir adelante.

A mi abuela materna Antonia Martínez Reséndiz Q.E.P.D; mi tío Antonio Martínez Martínez Q.E.P.D y a mi abuela paterna Ofelia Soto Bazaldua Q.E.P.D.

Dame Señor, Dios mío, lo que te queda; aquello que nadie te pide. No te pido el reposo, ni la tranquilidad del alma ni del cuerpo. No te pido riqueza, ni éxito, ni salud, tantos te piden esto, Dios mío, que ya no te debe sobrar para dar. Dame, Señor, lo que te queda, aquello que todos rehúsan. Quiero la inseguridad y la inquietud, quiero la lucha y la tormenta. Dame eso, Dios mío, definitivamente; dame la certeza de que esa será mi parte siempre, porque no siempre tendré el valor de pedírtelo. Dame, Señor, lo que te queda, dame aquello que otros no quieren, pero también dame el coraje, la fuerza y la fe.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Cáncer	1
1.1.2	Epidemiología	1
1.1.3	Tratamiento	2
1.2	Cannabidiol	3
1.2.1	Sistema endocannabinoide	4
1.3	Citotoxicidad	4
2.	ANTECEDENTES (LITERATURA REVISADA)	6
2.1	Cáncer cervicouterino	6
2.2	Cáncer de mama	7
2.3	Cáncer de colon	8
3.	JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
4.	HIPÓTESIS	11
5.	OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	11
5.1	OBJETIVO GENERAL	11
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.	12
6.1	Lugar De Procesamiento De Muestras	12
6.2	Cultivo celular	12
6.3	Citotoxicidad celular	14
6.4	Ensayo de fragmentación nuclear	16
6.5	Ensayo de viabilidad celular	16
6.6	Análisis estadístico	17
7.	RESULTADOS	18

7.1 El CBD induce cambios morfológicos en las células cancerígenas	18
7.2 El CBD disminuye la intensidad de fluorescencia nuclear de las células cancerígenas.	40
7.3 El CBD induce una alteración del metabolismo en las células cancerígenas.	62
7.4 El CBD disminuye la viabilidad en las células cancerígenas.	64
7.5 Determinación de la dosis media inhibitoria (IC ₅₀) de CBD en las líneas celulares cancerígenas.	65
7.6 Tipo de muerte celular inducido por CBD.	67
8. DISCUSIÓN	72
9. CONCLUSIONES	77
10. PERSPECTIVA	78
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células HaCaT tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	20
Figura 2. Células HaCaT tratadas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	21
Figura 3. Células HaCaT tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	22
Figura 4. Células HaCaT tratadas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	23
Figura 5. Células HeLa estimuladas durante 24 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	25
Figura 6. Células HeLa estimuladas durante 48 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	26
Figura 7. Células HeLa estimuladas durante 72 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	27
Figura 8. Células HeLa estimuladas durante 96 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	28
Figura 9. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 24 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	30
Figura 10. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	31
Figura 11. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 72 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	32

Figura 12. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 96 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	33
Figura 13. Células Caco-2 estimuladas durante 24 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	36
Figura 14. Células Caco-2 estimuladas durante 48 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	37
Figura 15. Células Caco-2 estimuladas durante 72 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	38
Figura 16. Células Caco-2 estimuladas durante 96 h a diferentes concentraciones de CBD y controles.	39
Figura 17. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	41
Figura 18. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	42
Figura 19. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	43
Figura 20. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT tratadas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	44
Figura 21. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	46
Figura 22. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	47
Figura 23. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	48

Figura 24. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	49
Figura 25. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	51
Figura 26. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	52
Figura 27. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	53
Figura 28. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	54
Figura 29. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	56
Figura 30. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	57
Figura 31. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	58
Figura 32. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles.	59
Figura 33. Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia emitida a través del marcaje de núcleos con DAPI en células expuestas con diferentes concentraciones de CBD en diferentes tiempos.	60
Figura 34. Análisis por línea celular de su exposición a diferentes concentraciones de CBD y controles, a través del marcaje nuclear con DAPI.	61
Figura 35. Análisis de citotoxicidad mediante ensayo MTT en células tratadas durante 24, 48, 72 y 96 horas con diferentes concentraciones de CBD.	63

- Figura 36.** Comportamiento celular contra diferentes concentraciones de CBD mediante el ensayo MTT. 64
- Figura 37.** El cannabidiol (CBD) reduce la viabilidad de las células cancerígenas. 65
- Figura 38.** Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apopxin green mediante citometría de flujo en células HaCaT estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. 67
- Figura 39.** Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apopxin green mediante citometría de flujo en células HeLa estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. 68
- Figura 40.** Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apopxin green mediante citometría de flujo en células MDA-MB-231 estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. 69
- Figura 41.** Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apopxin green mediante citometría de flujo en células Caco-2 estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura química del Cannabidiol.	3
Tabla 2. Receptores cannabinoides expresados en la línea HeLa.	6
Tabla 3. Clasificación por subtipos moleculares en cáncer de mama.	7
Tabla 4. Receptores cannabinoides expresados en la línea Caco-2.	9
Tabla 5. Graduación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos. 15	
Tabla 6. Determinación de dosis media inhibitoria IC ₅₀ por línea celular.	66
Tabla 7. Tipo de muerte celular inducido por la administración de 5 y 10 µM de CBD y controles, a las 24 horas en las líneas celulares.	71

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

SÍMBOLO O ABREVIATURA DESCRIPCIÓN

μM	Micromolar
μl	Microlitros
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
CBD	Cannabidiol
CCR	Cáncer de colon o recto
CO_2	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
h	horas
HER2	Factor epidérmico humano 2
IC_{50}	Concentración media inhibitoria
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino

RE Receptor de estrógeno
RP Receptor de progesterona
RPM Revoluciones por minuto
SEC Sistema endocannabinoide
seg segundos
TA Temperatura ambiente
TNBC Cáncer de mama triple negativo
VPH Virus del papiloma humano

RESUMEN

Introducción. La célula es la unidad más básica y funcional de la vida, preparada para producir las reacciones químicas necesarias para mantener la homeostasis y la proliferación celular. La proliferación celular es llevada a cabo por un proceso ordenado de pasos conocido como ciclo celular, la alteración de los puntos de control específicos de estos mecanismos puede llevar al mal funcionamiento de la célula, provocando una mayor propagación celular y dándole la capacidad de evitar la muerte celular programada. El acumulo de estas células es conocido como cáncer, el cual tiene la capacidad de originarse en cualquier órgano o tejido. Los tipos de cáncer que abordaremos de manera in vitro en este trabajo son el cáncer cervicouterino, mama y colon. El tratamiento para abordar a los pacientes depende del tipo y que tan avanzado se encuentra, las terapias convencionales empleadas son la cirugía, radioterapia y quimioterapia. El uso de estas terapias con lleva efectos secundarios los cuales se pueden prevenir, disminuir o controlar. Actualmente el Cannabidiol es usado como tratamiento complementario para disminuir efectos secundarios ocasionados por las terapias tradicionales y además se menciona un efecto anticancerígeno. **Objetivo.** El propósito de este estudio fue analizar el efecto citotóxico del cannabidiol en las líneas celulares cancerígenas, determinamos una IC₅₀, analizamos los cambios morfológicos y evaluamos el tipo de muerte celular. **Materiales y métodos.** Utilizamos células HeLa, MDA-MB-231, Caco-2 y HaCaT como control normal. Se estimularon con diferentes concentraciones de CBD, para posteriormente evaluarse mediante ensayos de citotoxicidad y fluorescencia a las 24, 48, 72 y 96 h. Además, analizamos los cambios morfológicos mediante fotos de microscopía de contraste de fase y fluorescencia. También determinamos los tipos de muerte celular que induce a las 24 h, mediante un ensayo de apoptosis/necrosis con citometría de flujo. **Resultados.** Se expuso una baja de la viabilidad celular en todas las líneas celulares en los 4 tiempos evaluados, lo cual nos permitió calcular la IC₅₀ a las 24 h para cada línea celular, para HeLa 9.4 µM, MDA-MB-231 10.3 µM, Caco-2 4.3 µM y HaCaT 5.2 µM. Analizamos la

morfología celular mediante fotomicroscopia en las líneas celulares después de aplicar el CBD a las 24, 48, 72 y 96 h, evidenciando cambios morfológicos relacionados con estrés y muerte celular, así como también se observaron alteraciones morfológicas nucleares por citofluorescencia relacionados con muerte celular. Por último, determinamos el tipo de muerte celular estimulado por el CBD durante 24 h para cada línea celular, para HeLa con 5 μM se indujo 28% de apoptosis, con 10 μM un 52% de apoptosis, para MDA-MB-231 con 5 μM se indujo 82% de apoptosis, con 10 μM un 81% de apoptosis, para Caco-2 con 5 μM se indujo 79% de apoptosis, con 10 μM un 87% de apoptosis, para HaCaT con 5 μM se indujo 51% de apoptosis tardía, con 10 μM un 28% de apoptosis tardía.

Conclusión. Los cambios morfológicos observados por microscopia de contraste de fase, así como los cambios nucleares por fluorescencia indican que el CBD ejerce un efecto citotóxico en las líneas celulares. Por otra parte, en la línea celular HeLa y Caco-2 podemos observar un efecto dosis dependiente de CBD, diferente a lo observado en, la línea MDA-MB-231, no mostró esta respuesta. Además, el tipo de muerte celular que induce el CBD con concentraciones de 5 y 10 μM en líneas celulares cancerígenas expuestas durante 24 h es apoptosis, mientras que en células normales causó apoptosis tardía.

Palabras clave: Cáncer, Cannabidiol, Citotóxico, Caco-2, HeLa, MDA-MB-231

1. INTRODUCCIÓN

La unidad formadora de la vida es la célula, formada por un complejo sistema de organelos encargados de llevar cabo los mecanismos y reacciones químicas necesarias para la vida, además posee mecanismos regulatorios para mantener la homeostasis y proliferación celular (Hanselmann y Welter, 2022). La proliferación celular es llevada a cabo por un proceso ordenado de pasos conocido como ciclo celular, mediante mecanismos complejos genéticamente codificados y minuciosamente regulados por puntos de control (Matthews et al., 2022). Con el paso del tiempo la célula puede adquirir daños genéticos conocidos como mutaciones que alteran su mecanismo de replicación, regulación y le dan la capacidad de evitar la muerte celular. Este proceso da origen a la proliferación anormal de la célula y genera un tumor maligno, también conocido como cáncer (Guleria y Sambyal., 2023).

1.1 Cáncer

El cáncer es definido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un grupo de enfermedades que puede comenzar en los diferentes órganos o tejidos del cuerpo, cuando células atípicas se desarrollan incontrolablemente”. (OMS, 2022). En cambio, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) lo menciona de la siguiente manera, “Grupo de enfermedades por la que algunas células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo”. (NCI, 2022). Esta patología afecta tanto hombres, mujeres y animales provocando millones de casos nuevos cada año, se considera una de las causas más importantes de muerte nivel.

1.1.2 Epidemiología

Las estadísticas del cáncer en el 2020 a nivel mundial fueron de 19 292 789 de casos y se reportan 9 958 133 de muertes, por otra parte, América Latina y el Caribe presentaron 1 470 274 casos de cáncer y el número estimado de muertes fue de 713 414 para el mismo año, a nivel nacional México presentó una incidencia de 195 499 casos y una mortalidad de 90 222 (Globocan, 2020). Estos datos estadísticos son el resultado del conjunto de tipos de cáncer que afectan a toda la población. El NCI expuso a los tipos de cáncer que afectaron a la población en el año 2020 siendo el principal el cáncer de mama, seguido el pulmonar, colorrectal y en menor grado próstata, estomago, hígado y cervicouterino (NCI, 2022). Dependiendo del tipo y que tan avanzado se encuentre, son las características por considerar para elegir un tratamiento.

1.3 Tratamiento

La terapia para el cáncer trata de inducir muerte celular en una población que solo existe debido a su capacidad para evitarla. Los tres pilares con los que se aborda esta patología es la cirugía, radioterapia y la quimioterapia, la primera es práctica, removiendo la mayor cantidad de tejido afectado y las otras dos son efectivas causando muerte celular (Gregorio et al; 2016). Todos los pacientes reciben la combinación de dos o más terapias (NCI, 2022).

El uso de estas terapias provoca efectos secundarios como: anemia, diarrea, dolor, edema y vómitos, solo por mencionar algunos. El NCI tiene una lista de todos los efectos secundarios, donde hace las recomendaciones para prevenir, disminuir o controlarlos (NCI, 2022). El Cannabidiol (CBD) es utilizado como tratamiento complementario para disminuir los efectos secundarios ocasionados por las terapias convencionales usadas en el cáncer (Good et al., 2019; NCI, 2024).

1.2 Cannabidiol

El CBD es un fitocannabinoide, sintetizado en los tricomas glandulares de las flores de *Cannabis sativa* (Gülck y Møller, 2020). Su extracción puede ser llevada a cabo por diferentes métodos (Radwan et al., 2021). Posee una estructura terpenofenolica, que contiene 21 átomos de carbono, de fórmula química $C_{21}H_{30}O_2$ (Silvestro et al., 2020). Su estructura química se muestra en la tabla 1.

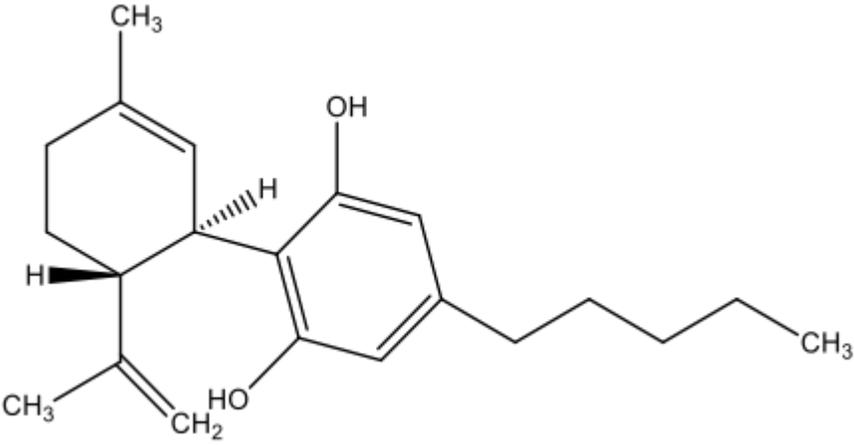
	
Compuesto	Cannabidiol
Nombre IUPAC	2-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol
Fórmula molecular	$C_{21}H_{30}O_2$
Peso Molecular	314 g/mol

Tabla 1. Adaptado de Hashis-I: The structure of Cannabidiol, Mechoulam y Shvo, 1963, Tetrahedron, 19, [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(63\)85022-X](https://doi.org/10.1016/0040-4020(63)85022-X): Estructura química del cannabidiol. Generado en el software ChemDraw Ultra 12.0. PerkinElmer Inc. 2010.

Este compuesto brinda a los usuarios múltiples acciones terapéuticas como analgésico, ansiolítico, antiemético, anticonvulsivo, cardioprotector, desinflamatorio, neuroprotector. Además, no causa efectos psicoactivos (Atalay et al., 2020; Baswan et al., 2020; Sholler et al., 2020; Britch et al., 2021; Gorelick et al., 2022;). Dichos efectos se deben a su interacción con un sistema complejo de receptores, ligandos endógenos y enzimas (Peng et al., 2022), denominado sistema endocannabinoide (SEC) (Di Marzo y Piscitelli, 2015).

1.2.1 Sistema endocannabinoide

El SEC, es un sistema evolutivo de homeostasis, compuesto por ligandos derivados de lípidos, receptores acoplados a proteína G, canales de potencial receptor transitorio y sus respectivas enzimas para su metabolismo (Mechoulam et al., 1998). Actualmente está reportado que el SEC presenta anormalidades en diferentes tipos de cáncer (Cherkasova et al., 2022). Esto ha motivado a investigadores a analizar el efecto citotóxico del CBD.

1.3 Citotoxicidad

El efecto citotóxico del CBD se ha evaluado en modelos *in vitro* de cáncer cervicouterino (Taylor et al., 2021), colon (Jeong et al., 2019) y de mama (Sultan et al., 2018). Por ejemplo, en un modelo donde se usaron células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, aplicaron 5 μM de CBD durante 12 y 24 h, esto causó estrés del retículo endoplásmico y eventualmente la apoptosis (Shrivastava et al., 2011). En células de cáncer de colon Caco-2 y HCT116, se aplicaron diferentes dosis de CBD desde 0.01 a 10 μM durante 24 horas, evidenciando que estas dosis en ese lapso no causaron un efecto citotóxico (Aviello et al., 2012; Kis et al., 2019). Por otra parte, se observó que en pólipos precancerosos y colon sano obtenidos por biopsia de diferentes pacientes, el CBD aplicado a 15 μM disminuyó la viabilidad afectando el tejido precanceroso (Ben-Ami Shor et al., 2022). Por otra parte, en cáncer cervicouterino, se

evaluaron extractos de *C. sativa* en comparación con CBD, demostrando resultados variables con los extractos de la planta y sugiriendo que el CBD es más efectivo en causar muerte celular (Lukhele y Motadi, 2016) por otra parte, se expuso que la citotoxicidad del CBD en células HeLa es dependiente de la densidad de siembra celular (Ramer et al., 2010). Para esto, el efecto citotóxico del CBD es muy complejo y depende de múltiples factores, siendo estos la concentración, pureza, tiempo y el tipo de cáncer, motivo por el cual se sigue investigando. En este trabajo abordaremos específicamente el cáncer cervicouterino con células HeLa, cáncer de mama con células MDA-MB-231 y cáncer de colon con células Caco-2.

2. ANTECEDENTES (LITERATURA REVISADA)

2.1 Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino afecta a las células glandulares productoras de mucosidad de la última porción del cuello uterino (NIH, 2023), la cual está conformada por el endocérvix y el exocérvix (Ramachandran y Dörk, 2021). Es en este lugar donde las células escamosas delgadas y planas que cubren el exocérvix se encuentran con las células glandulares y columnares del endocérvix, esta parte es mejor conocida como zona de transformación debido a su predisposición a mutaciones precancerosas ocasionadas por el papilomavirus humano (VPH) (Ramachandran y Dörk, 2021). Actualmente se han reconocido tipos de VPH de alto riesgo, como lo son 16 y 18, identificados como factor clave en la aparición de la neoplasia intraepitelial cervical (Schubert et al., 2023). Después de la agregación del genoma de VPH en la célula infectada se provoca la alteración del gen E2, el cual contiene la actividad del gen E6 y E7, generando su activación proteica, provocando la replicación del genoma viral. La interacción característica de E6 es degradar a p53 y de E7 es inhibir la proteína de retinoblastoma (Pal y Kundu, 2020). Además, ambas, promueven la glucólisis aeróbica (Hu et al., 2022). En la actualidad también se menciona una alteración del SEC que promueve la aparición de cáncer (Taylor et al., 2021). Los receptores cannabinoides investigados en la línea HeLa se reportan en la tabla 2.

Tabla 2. Receptores cannabinoides expresados en la línea HeLa.

HeLa		
Receptores	Expresión	Referencia
CB ₁	Media	(Contassot et al., 2004; Ramer y Hinz, 2008)
CB ₂	Media	(Contassot et al., 2004; Ramer y Hinz, 2008)
TRPV ₁	Media	(Contassot et al., 2004; Ramer y Hinz, 2008)

2.2 Cáncer de mama

El Cáncer de mama, se origina en células que conforman la glándula mamaria. Dicha estructura está conformada por tres partes principales: lobulillos, ductos y tejido conectivo. Los lobulillos se encargan de la síntesis de la leche para ser transportada por los conductos hasta el pezón y el tejido conectivo se encarga de mantener la estructura. Los tipos de cáncer más comunes son ductal o lobulillar (CDC, 2023). Además, está dividido por subtipos moleculares basados en el estatus del receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y el factor de crecimiento epidérmico humano dos (HER2). En base a estos receptores se puede clasificar en cuatro subtipos: 1) Luminal A, 2) Luminal B, 3) HER2+ y 4) Cáncer de mama triple negativo (TNBC) (Sultan et al., 2018; Almeida et al., 2022). La clasificación por subtipos moleculares en cáncer de mama se resume en la tabla 3.

Subtipo	RE	RP	HER2
Luminal A	Positivo	Alto	Negativo
Luminal B	Positivo	Negativo o bajo	Positivo o negativo
HER2+	Negativo	Negativo	Positivo
TNBC	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 3. Adaptado de Cannabinoids in Breast Cancer, C. Ferreira., et al 2022, *Molecules*, 27, <https://doi.org/10.3390/molecules27010156>: Clasificación por subtipos moleculares en cáncer de mama.

El TNBC es un tipo de cáncer agresivo, caracterizado por la falta de expresión de receptores basales RE, RP y HER2. Estos receptores son usados para su control con terapias hormonales y otros fármacos. Por tal motivo el panel

terapéutico para abordarlo se mira reducido, dejando a los fármacos citotóxicos como única opción terapéutica (Dass et al., 2021).

2.3 Cáncer de colon

El cáncer de colon o recto (CCR) afecta a las células glandulares del intestino grueso, esta porción del sistema gastrointestinal se divide en colon y recto. El primero es un ducto muscular de alrededor de 1.5 metros de longitud, su porción proximal está conformada por el colon ascendente y transversal, mientras que su porción distal se divide en colon descendente y colon sigmoide, la actividad primordial es absorber agua y sodio de los restos del quilo, el contenido residual es materia fecal, que a través de movimientos peristálticos llega al recto y por último al ano (NCIC, 2023).

Múltiples factores están asociados a la aparición del CCR, un estilo de vida poco saludable, estrés crónico, uso inadecuado de antibióticos causando la modificación de la microbiota intestinal, así como antecedentes genéticos e incluso la cronicidad de las enfermedades inflamatorias intestinales (Li et al., 2021). Estos factores son mencionados en la historia natural del cáncer colorrectal, además se menciona la secuencia adenoma – adenocarcinoma (Winawer, 1999).

La lesión conocida como pólipo adenomatoso precancerígeno, tiene un tiempo promedio de evolución para dar origen al adenocarcinoma que depende del tamaño del pólipo adenomatoso, grande (>1 cm) 5.5 años y pequeños hasta 10 años (Winawer, 1999; Sanjurjo, 2011). Este tipo de lesiones han formado parte de investigaciones para aclarar la función del SEC en la progresión del cáncer (Zaiachuk et al., 2021). Actualmente se sabe que los componentes del sistema endocannabinoide están desregulados en el CCR, lo cual nos permitió ver qué receptores están presentes en la línea celular Caco-2, se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Receptores cannabinoides expresados en la línea Caco-2

Caco-2		
Receptores	Expresión	Referencia
CB ₁	Baja	(Aviello et al., 2012; Borrelli et al., 2014)
CB ₂	Media	(Aviello et al., 2012; Borrelli et al., 2014)
TRPA ₁	Baja	(Borrelli et al., 2014)
TRPV ₁	Media	(Aviello et al., 2014; Borrelli et al., 2014)
TRPV ₂	Baja	(Borrelli et al., 2014)
PPAR γ		(Aviello et al., 2014)
TRPM8	Baja	(Borrelli et al., 2014)
5-HT _{1A}	Media	(Borrelli et al., 2014)

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y millones de personas son diagnosticadas anualmente. Actualmente, los tratamientos convencionales incluyen quimioterapia, radioterapia y cirugía, sin embargo, presentan efectos secundarios (dolor, vómito, anorexia). El CBD extraído de la planta *Cannabis sativa* se ha utilizado como tratamiento complementario para tratar los efectos secundarios ocasionados por los tratamientos convencionales usados en esta enfermedad, así mismo, se menciona que tiene un efecto anticancerígeno.

4. HIPÓTESIS

La administración de CBD inducirá un efecto citotóxico y antiproliferativo sobre las células cancerígenas.

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios a nivel celular inducidos por CBD a una dosis citotóxica en líneas celulares cancerígenas.

5.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la dosis media inhibitoria (IC_{50}) de CBD en las líneas celulares cancerígenas.
2. Evaluar los cambios morfológicos *in vitro* inducidos por el CBD.
3. Evaluar el tipo de muerte celular *in vitro* inducida por CBD.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Lugar De Procesamiento De Muestras

Este trabajo se realizó en el departamento de inmunología veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), así como en el departamento de histología de la Facultad de Medicina (FM) y otra parte en el departamento de inmunología y virología de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCM), todos los departamentos son pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León.

6.2 Cultivo celular

Línea celular HeLa

Células de morfología epitelial, adherentes, positivas para queratina derivadas del adenocarcinoma de cérvix humano con identificación ATCC: CCL-2, provenientes de una mujer de 31 años. Además, contiene secuencias del VPH 18 (Pepescu et al., 1987), así como una baja expresión de P53 (May et al., 1991) y niveles normales de pRB (Chávez et al., 2020). Anteriormente se ha reportado una sobre expresión de receptores cannabinoides (Contassot et al., 2004), así como diversos mecanismos estimulados por dianas moleculares con afinidad al CBD (Razlog et al., 2023).

Línea celular MDA-MB-231

Células de adenocarcinoma de glándula mamaria (ATCC: HTB-26), adherentes, con morfología epitelial, provenientes del derrame pleural de un individuo femenino de 51 años (Martínez et al., 2003), receptor de estrógeno negativo (Cailleau, et al., 1978), receptor de progesterona negativo, receptor HER2 negativo (Neve et al., 2006), expresa wnt7b (Huguet et al., 1994), además presenta mutaciones en KRas y p53 (Chavez et al., 2010), expresa altos niveles de GPR55 (Kisková et al., 2019). Investigaciones previas mencionan que se

puede inducir un efecto citotóxico independiente de los receptores cannabinoides en esta línea (Shrivastava et al., 2011).

Línea celular Caco-2

Células de adenocarcinoma de colon humano (ATCC: HTB-37), son adherentes, con morfología epitelial, derivadas del colon de un individuo masculino de 72 años, posee mutaciones de los genes APC y β -catenina (Leoni et al., 2012), así como la sobreexpresión del gen COX2 (Kutchera et al., 1996), tiene el fenotipo metilador de isla CpG CIMP 1, así como mutaciones de p53 (Ahmed et al., 2013), presenta inestabilidad cromosómica (Thompson y Compton, 2008). Además, expresa receptores cannabinoides (Aviello et al., 2012; Borrelli et al., 2014).

Línea celular HaCaT

Los queratinocitos son células adherentes con morfología epitelial derivados de la piel periférica de un melanoma distante, provenientes de la espalda de un individuo masculino de 62 años, inmortalizadas de manera espontánea *in vitro*, negativas para el antígeno del SV-40 y para VPH, no son tumorigénicas y se consideran similares a las células del prepucio humano adulto (Boukamp et al., 1988). Además, poseen mutaciones en p53 (Lehman et al., 1993) y se ha reportado mayor proliferación celular al usar CBD (Petrosino et al., 2018).

Cada línea celular se mantuvo en medio DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de penicilina y estreptomina. Se conservaron a una temperatura de 37° C con una atmosfera al 5% de CO₂. Cada 2 días realizamos lavados con 3 ml de solución PBS al 1X y cambios de medio, hasta que se observó una confluencia del 80% para posteriormente, seguir con los ensayos de citotoxicidad.

6.3 Citotoxicidad

Para medir la citotoxicidad a través de la actividad metabólica celular, se realizó el ensayo MTT, consiste en el metabolismo intracelular de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), una sal de monotetrazolio la cual

es reducida mediante enzimas oxidorreductasa y deshidrogenasas, generando una molécula hidrofílica de color azul violeta conocido como formazán, compuesto que se puede disolver al añadir un disolvente, para posteriormente analizarse en el espectrofotómetro Epoch de la marca Biotek, a una longitud de onda de 540 nm (Ghasemi et al., 2021).

En base a la metodología de diferentes estudios (Delgado et al., 2020; Becerra et al., 2021; Garza et al., 2021; Guillén et al., 2021) donde nuestro equipo de trabajo ha participado, llevamos a cabo lo siguiente. Cultivamos 1×10^4 células en cada pozo ($n=6$), en placas de 96 pozos y dejamos incubar durante 24 h para permitir su adherencia. Después aplicamos los estímulos, CBD a 5, 10 y 20, μM . Además, se incluyeron células sin tratamiento como control negativo, vincristina a 1 μM como control positivo y el vehículo (metanol). La placa se incubó durante 24, 48, 72 y 96 h para su posterior análisis.

Para observar los cambios morfológicos celulares ocasionados por los tratamientos, 2 h previas al término de los lapsos de exposición, con un microscopio invertido de la marca ZEISS de modelo primovert, tomamos 6 fotomicrografías representativas, a un aumento total de 40X, por cada tiempo de incubación. Para el análisis de los cambios morfológicos y determinar la citotoxicidad seguimos las indicaciones de la ISO-10993-5-2009, para considerar un efecto citotóxico se debe reducir hasta un 30 % la viabilidad celular, las características son mostradas y resumidas en la tabla 5.

Tabla 5. Adaptado de la ISO-10993-5-2009, www.iso.org. Graduación morfológica cualitativa de la citotoxicidad de los extractos.

Grado	Reactividad	Condiciones del cultivo
0	Ninguna	Gránulos intracitoplasmáticos discretos, sin lisis celular, sin reducción del crecimiento celular

1	Ligero	No más del 20 % de las células son redondas, sueltas y sin gránulos intracitoplasmáticos, o muestran cambios en la morfología; ocasionalmente hay células lisadas presentes; solo se observa una ligera inhibición del crecimiento.
2	Medio	No más del 50 % de las células son redondas, desprovistas de gránulos intracitoplasmáticos, no hay lisis celular extensa; no más del 50 % de inhibición del crecimiento observable.
3	Moderado	No más del 70 % de las capas celulares contienen células redondeadas o se lisan; las capas celulares no están completamente destruidas, pero se observa más del 50 % de inhibición del crecimiento.
4	Severo	Destrucción casi completa o completa de las capas celulares.

Una vez concluida la incubación, en total oscuridad, aplicamos 50 µl de MTT con una concentración de 1 mg/ml y 50 µl de medio DMEM sin rojo fenol a cada pozo para incubarse durante 2 h en las condiciones de cultivo ya mencionadas. Posteriormente se retiró el medio y añadimos 100 µl de DMSO en cada pozo e incubamos a temperatura ambiente, para ser analizado mediante absorbancia en equipo Epoch de la marca BIOTEK con una longitud de 540 nm. Las lecturas de absorbancia se interpretaron como la actividad metabólica celular (Ghasemi et al., 2021). Además, estos datos se analizaron a través del software GraphPad Prism 9, para la determinación de la IC₅₀ mediante una función logarítmica.

6.4 Ensayo de fragmentación nuclear

Para cuantificar el % de viabilidad celular, se utilizó como marcador fluorescente el 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), su unión al ADN en las regiones AT

incrementan su intensidad de fluorescencia. Esto permite estimar la intensidad de fluorescencia en base a la adherencia de las células viables. Para la realización de este ensayo se procedió a sembrar las líneas celulares con la misma densidad celular utilizada en el ensayo de MTT, se expusieron a las mismas condiciones y tratamientos ($n = 6$). Una vez que concluyeron los periodos de exposición se procedió a remover el contenido de cada pozo, posteriormente realizamos lavados con solución PBS al 1X y fijamos las células con una proporción 1:1 de metanol y acetona, a una temperatura de 4° C en un lapso de 20 minutos. Para realizar la marcación nuclear se aplicaron 100 μ l de DAPI (100 ng/ml), a cada pozo e incubamos 15 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Por último, removimos el excedente de DAPI y analizamos en un lector de microplacas Sinergy™ HTX (BioTek, VT, EE. UU.). Utilizamos un filtro de excitación 360/40 y un filtro de emisión 460/40 para su lectura, los datos obtenidos se interpretaron como el porcentaje de la intensidad de fluorescencia emitida. Además, se tomaron fotomicrografías representativas con microscopia de fluorescencia con un microscopio de la marca Leica, modelo DM1000.

6.5 Ensayo de viabilidad celular

Para evaluar el tipo de muerte celular provocada por el CBD, utilizamos el kit (Abcam, cat. ab176749) para detección de apoptosis/necrosis (azul, verde, rojo). La apoptosis se detecta mediante un sensor de fosfatidilserina (apoxin green), después de haber un movimiento de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, indicador universal de apoptosis en etapa inicial e intermedia, detectable antes de que ocurran cambios morfológicos (Kay & Grinstein, 2011). Las células en apoptosis tardía y necrosis son detectadas con 7-amino-actinomycin D (7-AAD) un derivado fluorescente de la actinomicina D con selectividad a regiones GC en el ADN, la aplicación de dicho reactivo tiene como fundamento la pérdida de la integridad de la membrana celular en células apoptóticas tardías y necróticas (Zembruski et al., 2012).

Con la finalidad de evaluar el tipo de muerte estimulado por CBD se llevó a cabo el siguiente protocolo, sembramos 2×10^5 células en placas de 24 pozos para ser

incubadas durante 24 h, posteriormente se aplicaron los tratamientos con 5 y 10 μM de CBD. Además, se incluyeron como control negativo (células sin tratamiento), un control positivo (vincristina 1 μM) y el vehículo (metanol). Posteriormente se incubaron durante 24 h. Al término del tiempo de incubación se recolectó el medio de cada pozo en eppendorf de 1.5 ml, previamente identificados, después se aplicó tripsina al 0.5 % en cada pozo para su recolección y colocarlo junto con su respectivo sobrenadante. Posteriormente centrifugamos todas las muestras a 500 g, por 5 minutos y retiramos el excedente. A continuación, suspendimos cada muestra en 203 μl de una mezcla de tampón de ensayo con apoxin green y 7-AAD, para incubarse durante 30 min a TA y añadimos 300 μl medio de cultivo sin rojo fenol. El análisis de las muestras se realizó en un citómetro de flujo de la marca BD Accuri C6 Plus. Se cuantificó la unión del apoxin green utilizando el canal FL1 (Ex/Em = 490/525 nm), el 7-AAD con el canal FL3 (Ex/Em = 550/650 nm).

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se analizaron las variables cuantitativas a través del cálculo de la media y como medida de dispersión la desviación estándar (DE) Además, se realizó un análisis de varianza, la comparación de medias por el método de Bonferroni y la generación de gráficos a través del software Graphpad Prism 9.

7. RESULTADOS

7.1 El CBD induce cambios morfológicos en las células cancerígenas.

Con la finalidad de analizar el efecto citotóxico del CBD y evaluar los cambios morfológicos en las líneas celulares HaCaT, HeLa, MDA-MB-231 y Caco-2, se hicieron observaciones con microscopía óptica después de la aplicación de los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, además de los controles durante 24, 48, 72 y 96 h. Las fotomicrografías se exponen por tiempo y línea celular en las siguientes figuras.

La figura 1, expone células HaCaT tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Podemos observar los siguientes cambios, desde los 5 μM exponen disminución de la confluencia celular, con la presencia de cambios en su estructura como redondeo, encogimiento y pérdida de la adherencia celular, con 10 y 20 μM muestran una menor confluencia celular que con la anterior concentración, además notamos cambios morfológicos relacionados con estrés y muerte celular, cabe mencionar que en todas las concentraciones de CBD se observan células con su forma típica, a diferencia de su exposición con vincristina donde vemos cambios en todas las células con un redondeo, encogimiento y disminución de la adherencia celular.

En la figura 2 se muestran células HaCaT tratadas durante 48 h con las diferentes concentraciones de CBD y controles, podemos observar los siguientes cambios, desde los 5, 10 y 20 μM es muy evidente el efecto citotóxico con cambios morfológicos relacionados con estrés y muerte celular, a diferencia de su exposición con vincristina donde se evidencia un encogimiento, redondeo, escasa adherencia y algunas células en suspensión.

En la figura 3 las células HaCaT expuestas durante 72 h con las diferentes concentraciones de CBD y vincristina podemos observar una pérdida de la adherencia celular, relacionado con muerte celular.

En la figura 4 podemos observar células HaCaT tratadas durante 96 h con todas las concentraciones de CBD y vincristina, se evidencian los mismos efectos desde las 72 h.

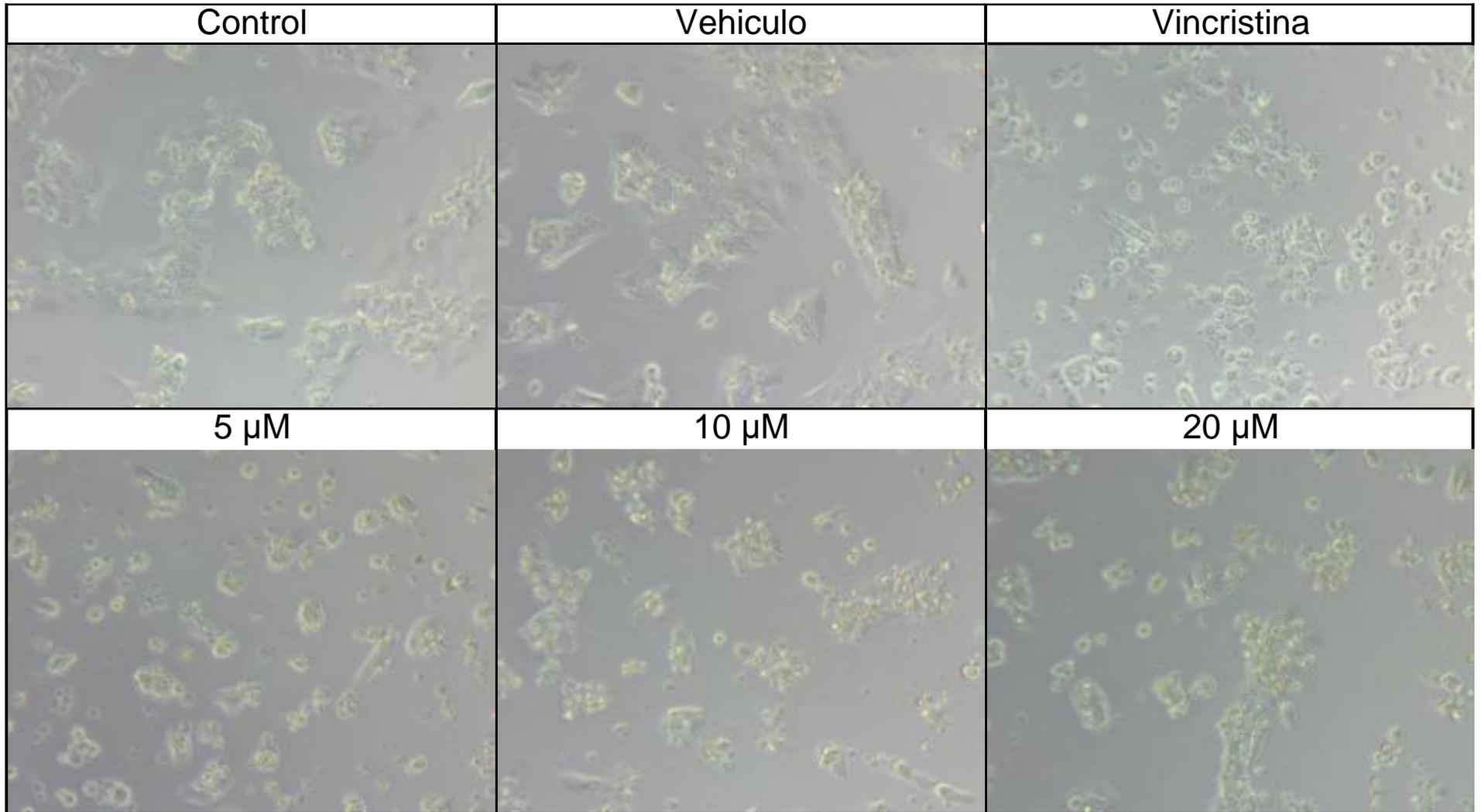


Figura 1. Células HaCaT tratadas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

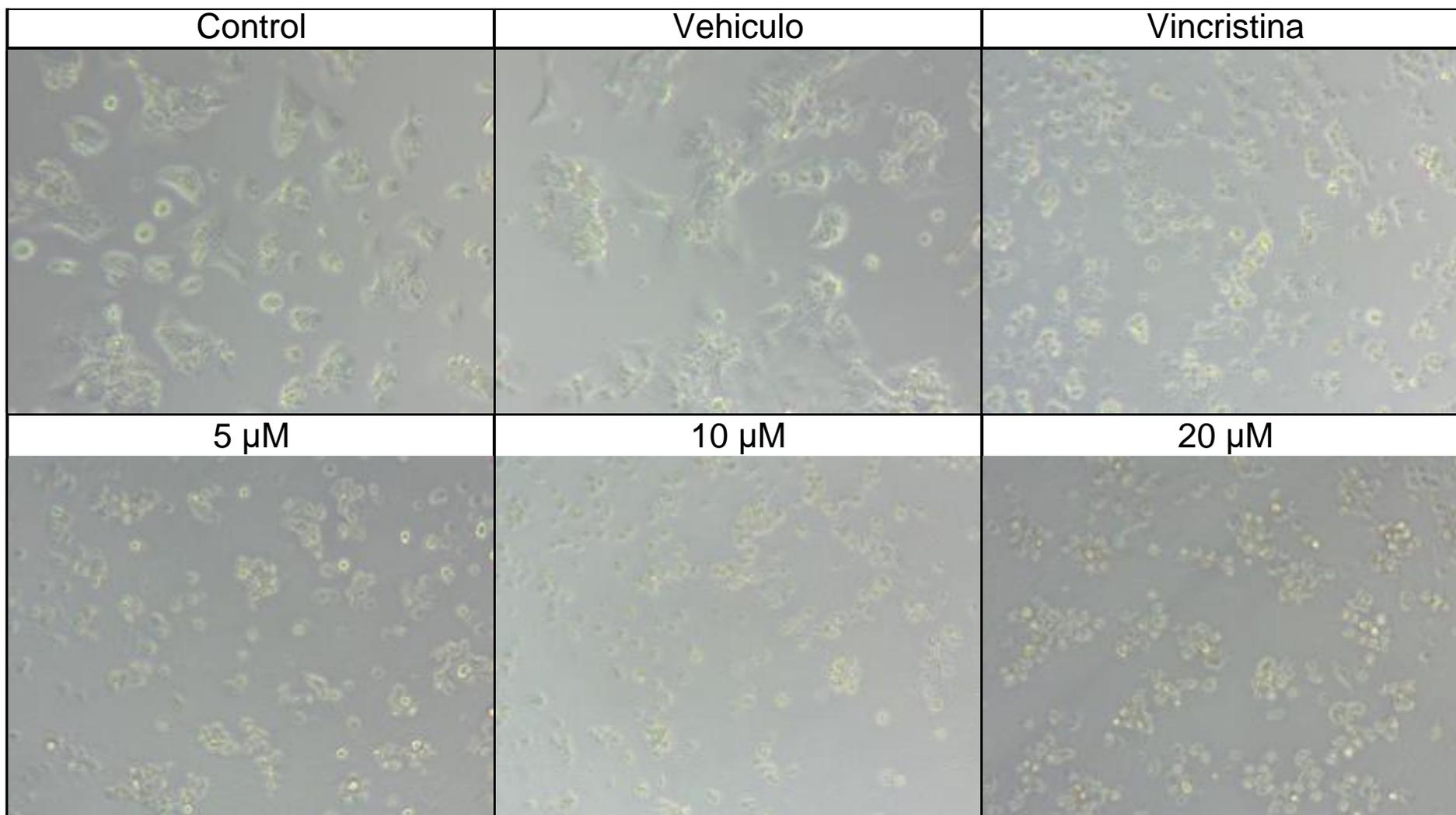


Figura 2. Células HaCaT tratadas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μM .

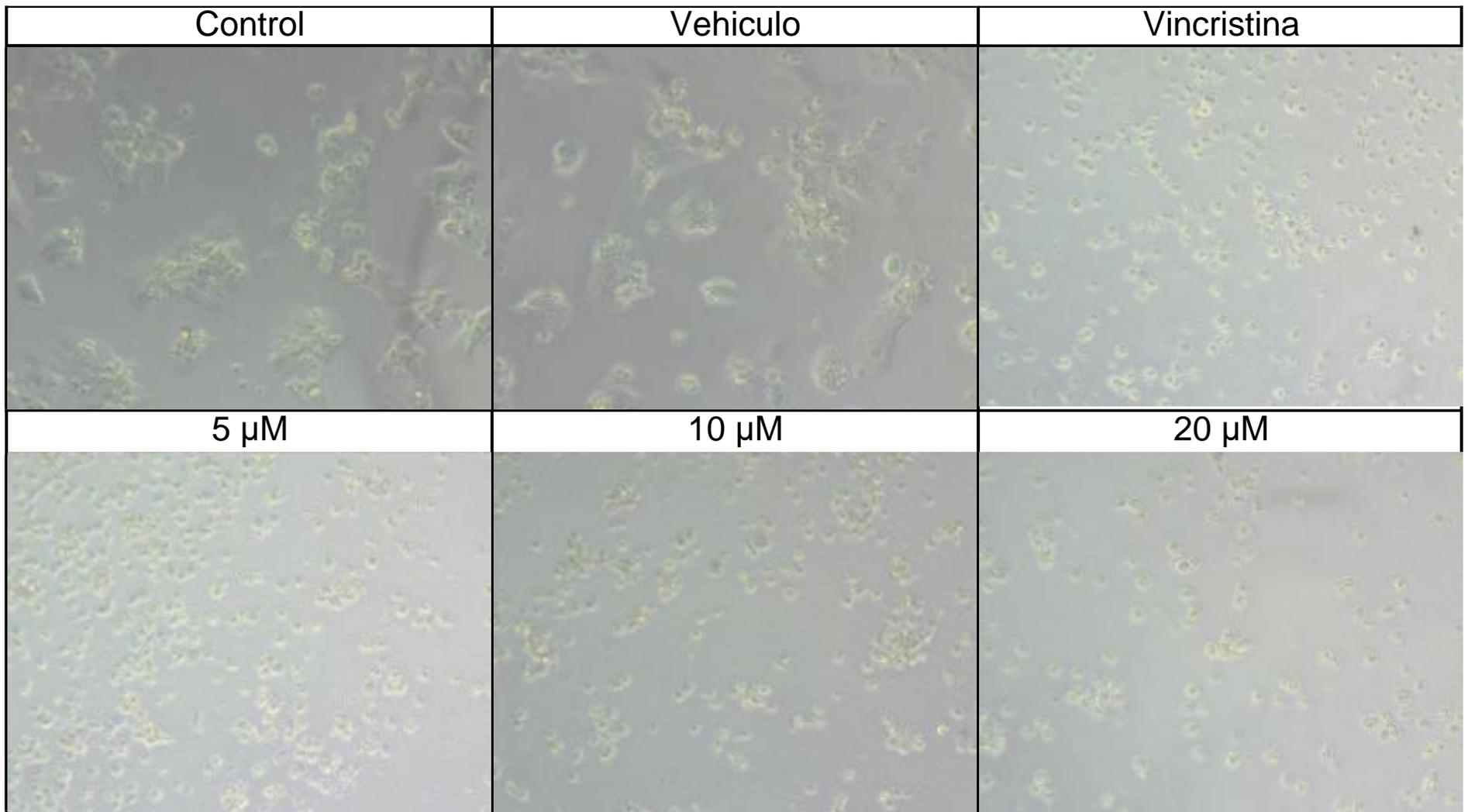


Figura 3. Células HaCaT tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μ

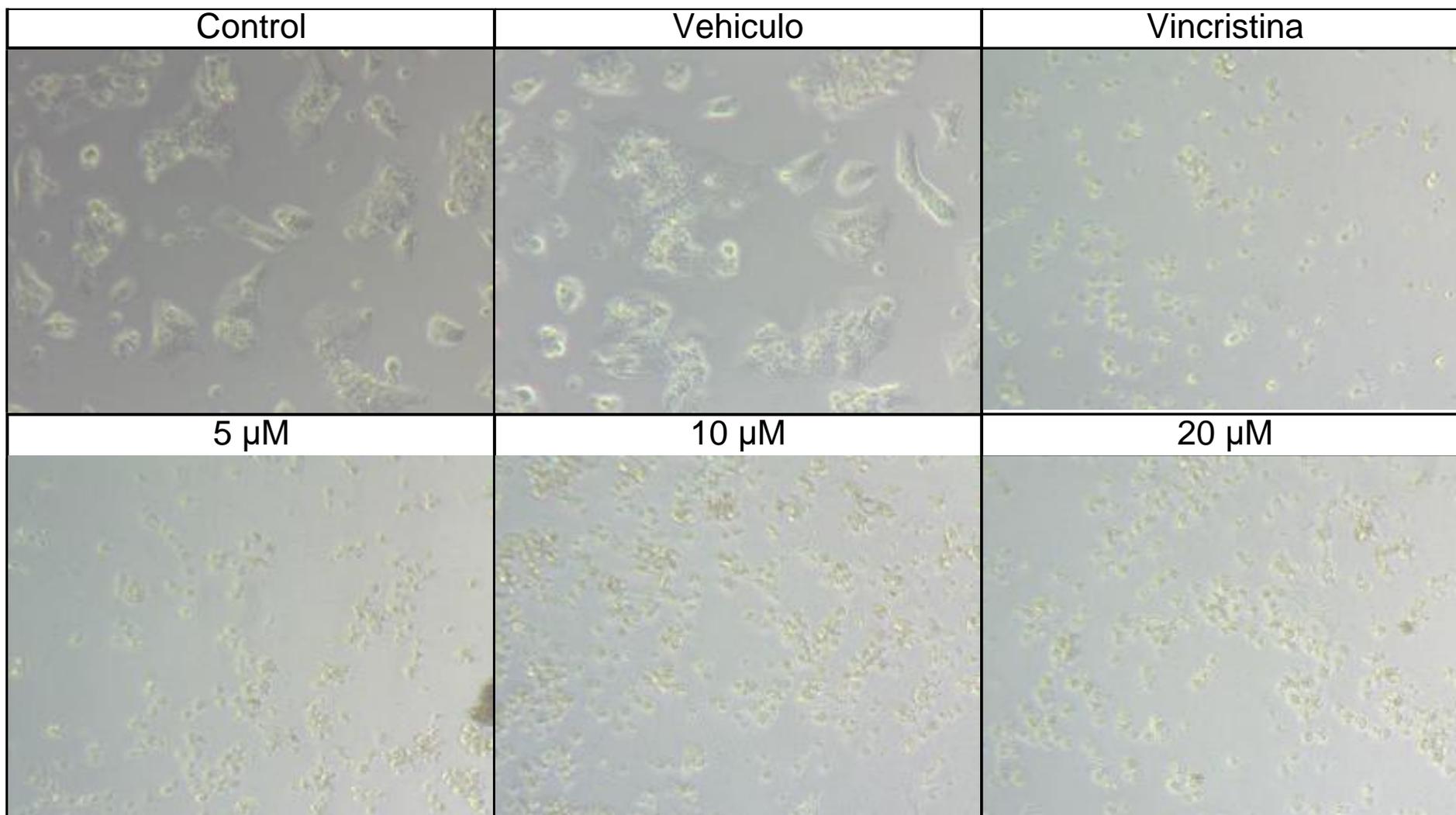


Figura 4. Células HaCaT tratadas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μM .

En la figura 5, las células HeLa tratadas durante 24 h con una dosis de 5 μM demostraron una disminución de la confluencia celular, además se observaron cambios morfológicos como encogimiento, redondeo y pérdida de la adhesión celular. Las concentraciones de 10 y 20 μM disminuyeron la confluencia celular y expusieron cambios morfológicos relacionados con estrés y muerte celular. Por otra parte, la exposición a vincristina demostró una disminución de la confluencia, pérdida de la adherencia celular y la formación de cúmulos.

La figura 6, muestra células HeLa después de ser estimuladas durante 48 h con 5 μM , se aprecia la disminución de la confluencia celular, además se observaron cambios morfológicos como encogimiento, redondeo y pérdida de la adhesión celular, aunque se observan células que conservan su forma normal. Las concentraciones de 10 y 20 μM demostraron tener un efecto citotóxico desde las 24 horas con la presencia sólo de células en suspensión. De igual manera la vincristina disminuye la confluencia y causa la pérdida de la adherencia celular.

En la figura 7, las células HeLa tratadas durante 72 h con una dosis de 5 μM demostraron una disminución de la confluencia celular, además se observaron cambios morfológicos como encogimiento, redondeo, disminución de la adherencia celular con la formación de cúmulos, aunque se observan células que conservan su forma normal. Las concentraciones de 10, 20 μM de CBD y vincristina demostraron tener un efecto citotóxico desde las 24 horas, se observan sólo células en suspensión.

En la figura 8, las células HeLa tratadas durante 96 h con una concentración de 5 μM demostró resistencia con la presencia de células sin cambios morfológicos y la disminución de la confluencia celular. Las concentraciones de 10, 20 μM de CBD y vincristina demostraron tener un efecto citotóxico desde las 24 horas.

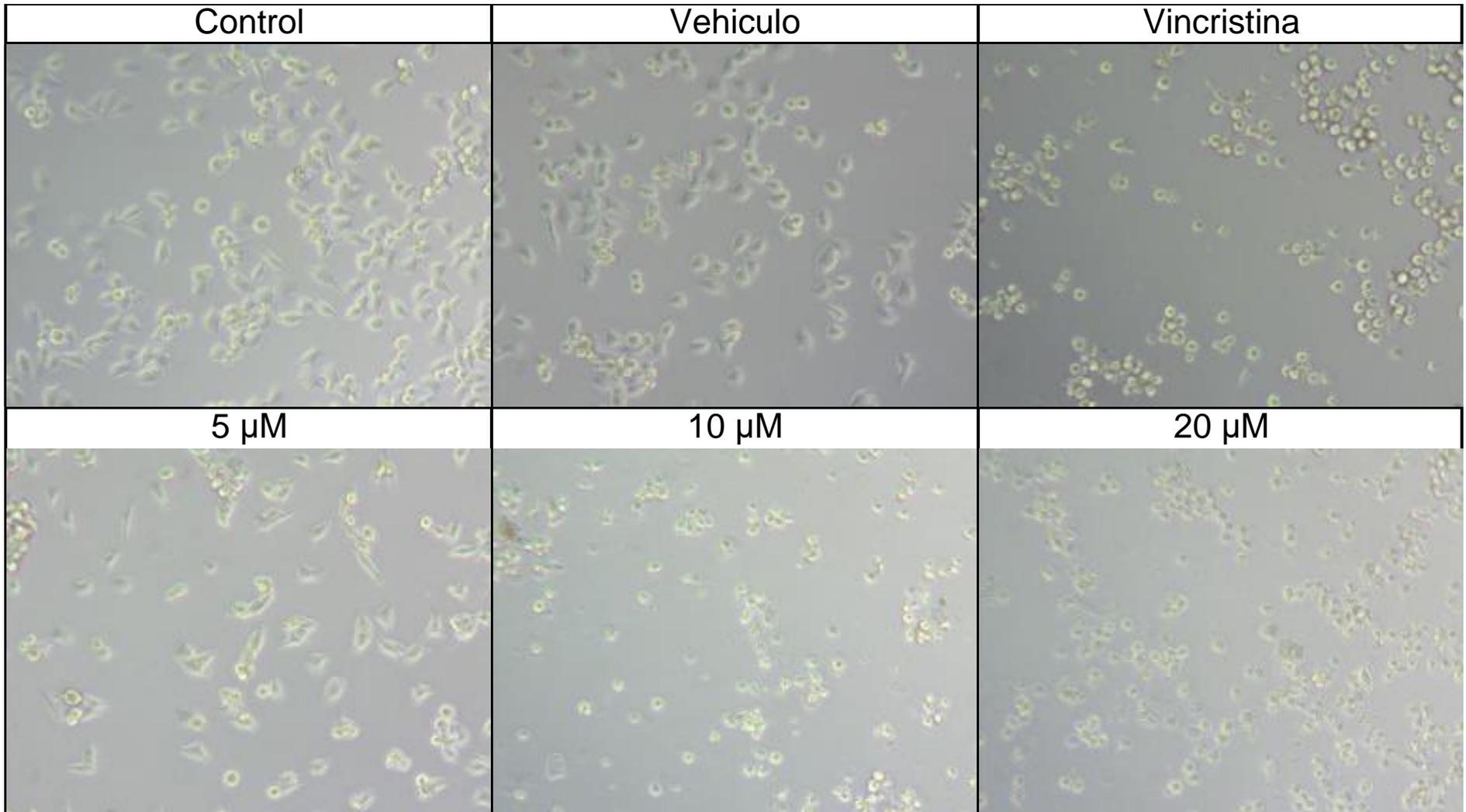


Figura 5. Células HeLa estimuladas durante 24 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control), Barra de escala 300 μm .

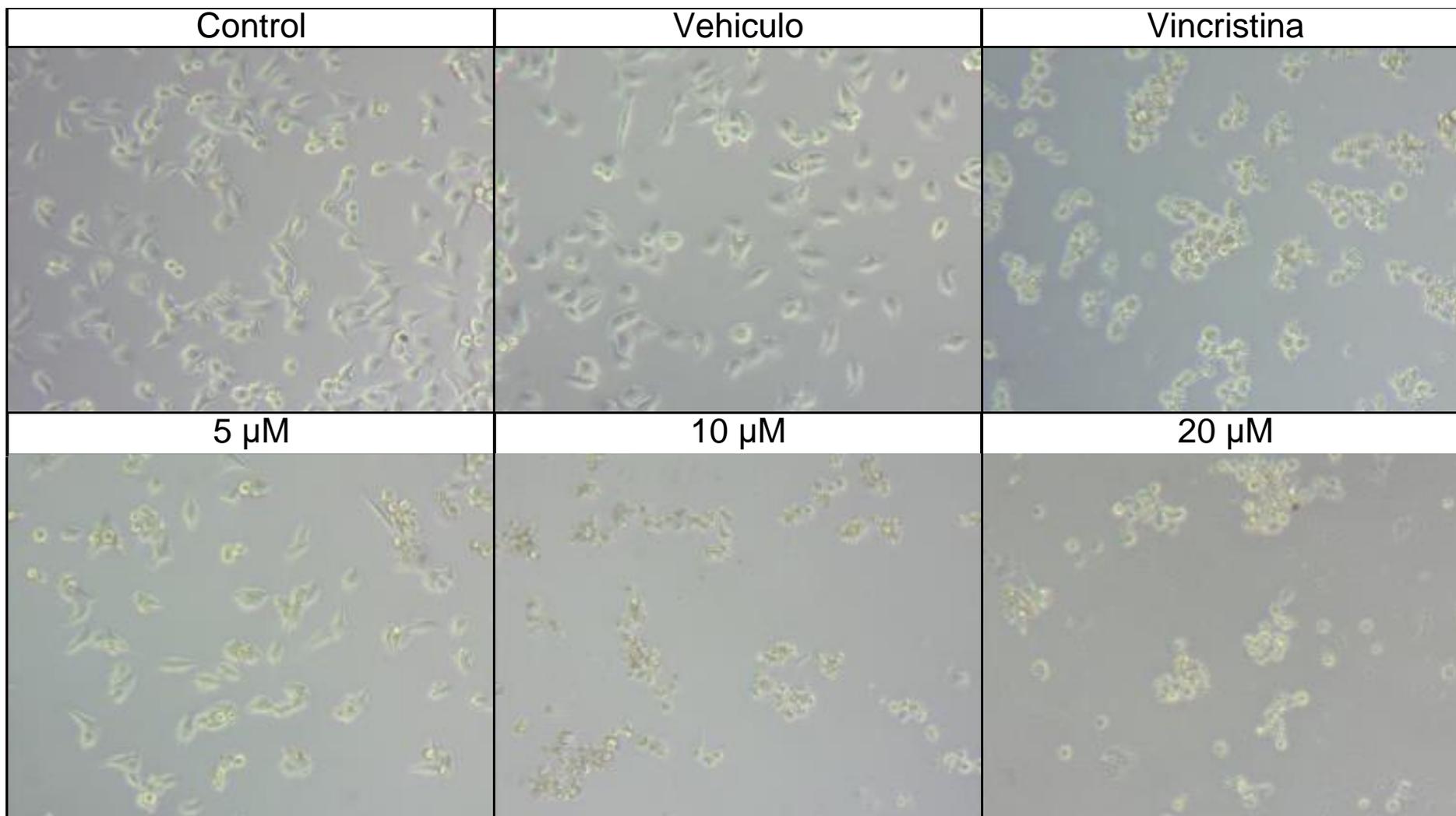


Figura 6. Células HeLa estimuladas durante 48 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm.

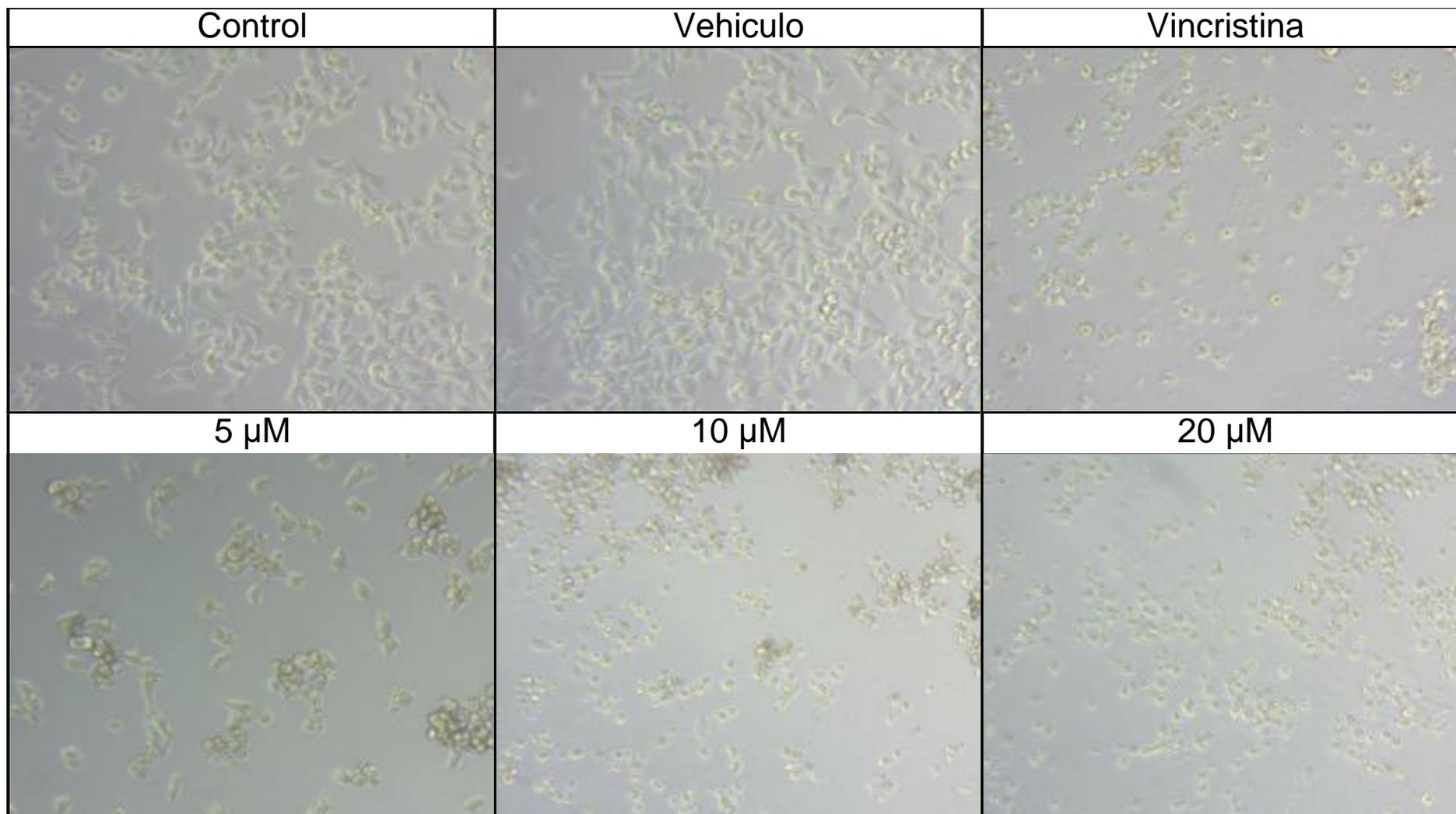


Figura 7. Células HeLa estimuladas durante 72 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

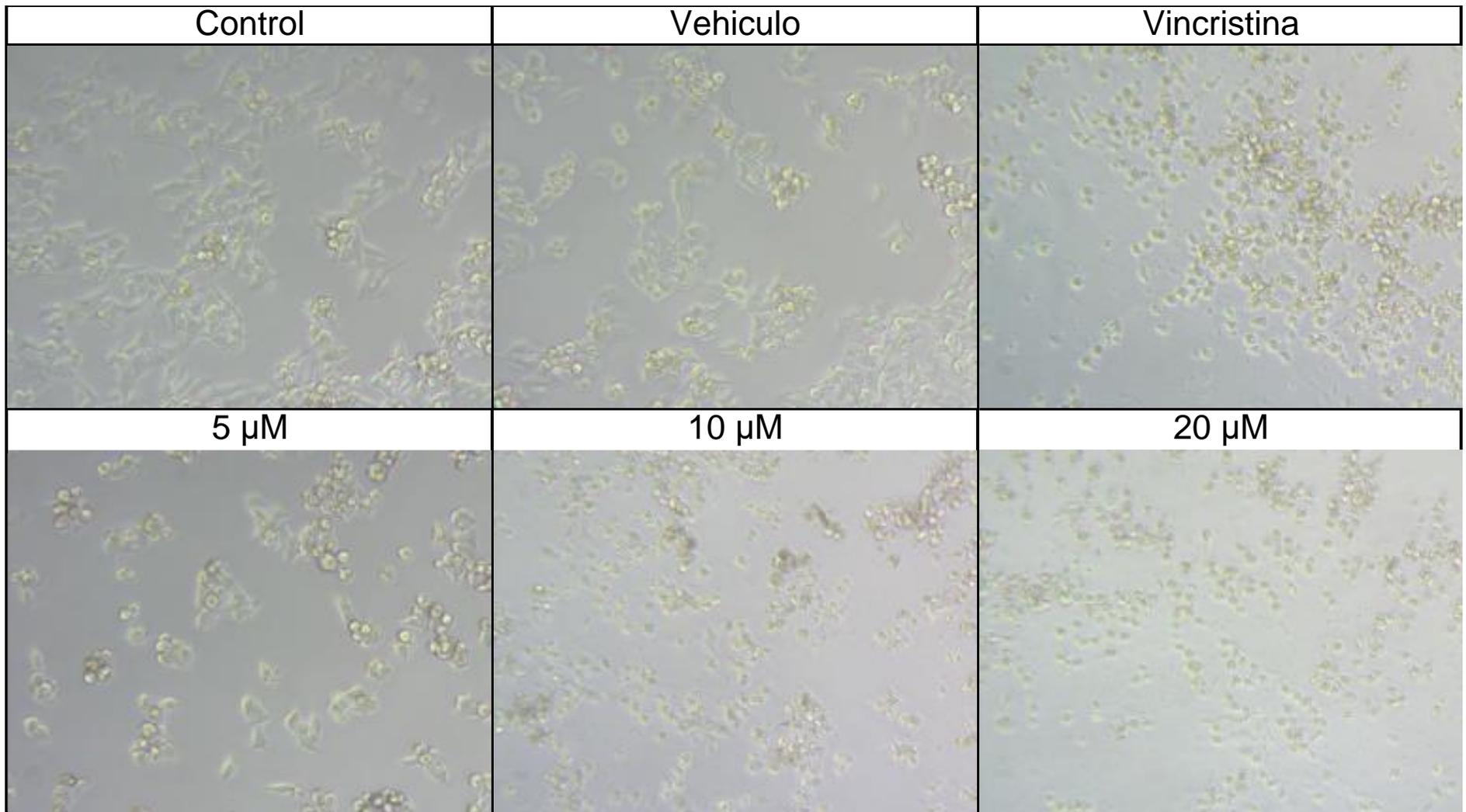


Figura 8. Células HeLa estimuladas durante 96 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

La figura 9, muestra células MDA-MB-231 tratadas durante 24 h con 5 μM demostraron cambios morfológicos como encogimiento, redondeo, pérdida de la adherencia celular y un incremento en el número de células en suspensión, pero además se observan células que conservan su forma normal. Se observó un efecto muy similar con 10 μM , pero con un aumento de células en suspensión. Por otra parte, la exposición a 20 μM y vincristina demostraron cambios muy similares, se observa un encogimiento, redondeo celular y la formación de agrupaciones con un aumento del contacto celular relacionado con estrés y muerte.

En la figura 10, la línea MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h con 5 μM evidenciaron cambios morfológicos como encogimiento, redondeo, formación de agrupaciones con aumento del contacto celular, pérdida de la adherencia y un incremento de células en suspensión, pero, además se observan células sin cambios. Se observó un efecto similar con 10 μM . Por otra parte, con 20 μM , se observó un efecto similar a la exposición durante 24 h, respecto al tratamiento con vincristina las células manifestaron una disminución de la confluencia y un aumento de células en suspensión.

En la figura 11, las células MDA-MB-231 tratadas durante 72 h con 5 y 10 μM , demostraron resistencia con una disminución de la confluencia celular y además se observan células con morfología normal. A diferencia de 20 μM y vincristina donde solo se observan células redondas, agrupadas y en suspensión.

En la figura 12, después de la exposición durante 96 h con las concentraciones y controles en la línea MDA-MB-231, las concentraciones de 5 y 10 μM demostraron la disminución de la confluencia celular con la presencia de cambios relacionados a estrés y muerte celular, aunque aún se observaron escasas células con morfología típica. Por otra parte 20 μM y vincristina mostraron un efecto similar a su exposición durante 72 h.

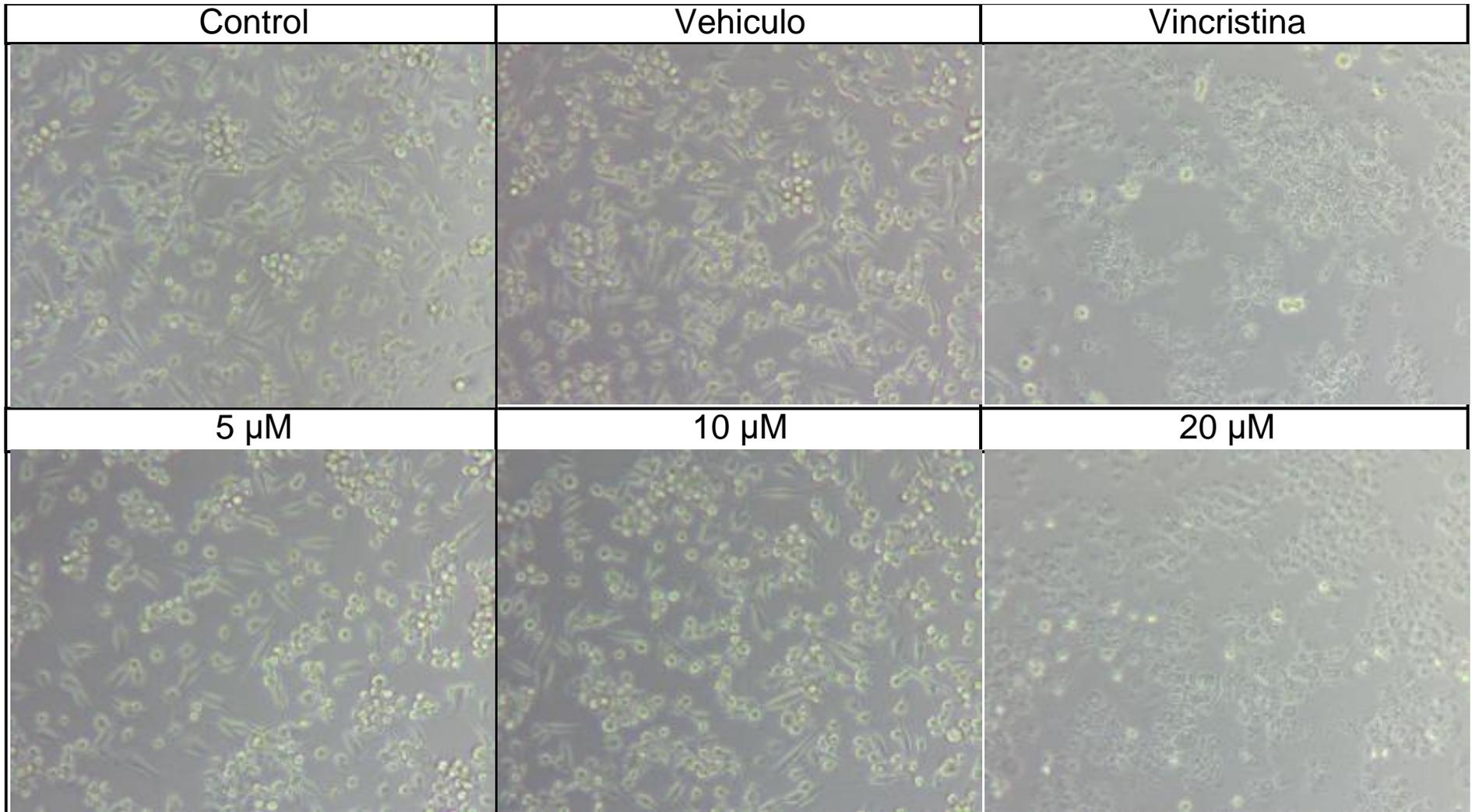


Figura 9. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 24 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

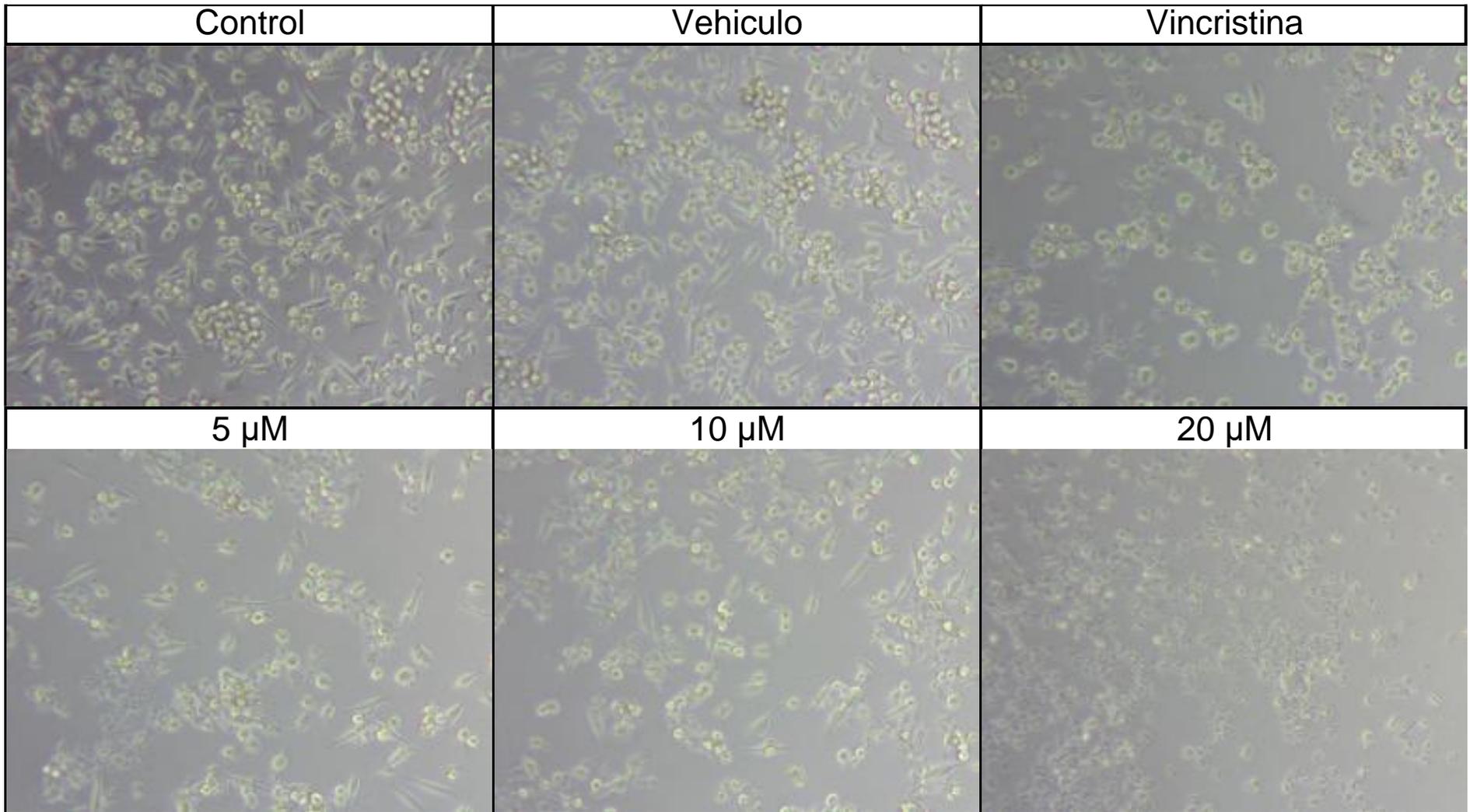


Figura 10. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μM .

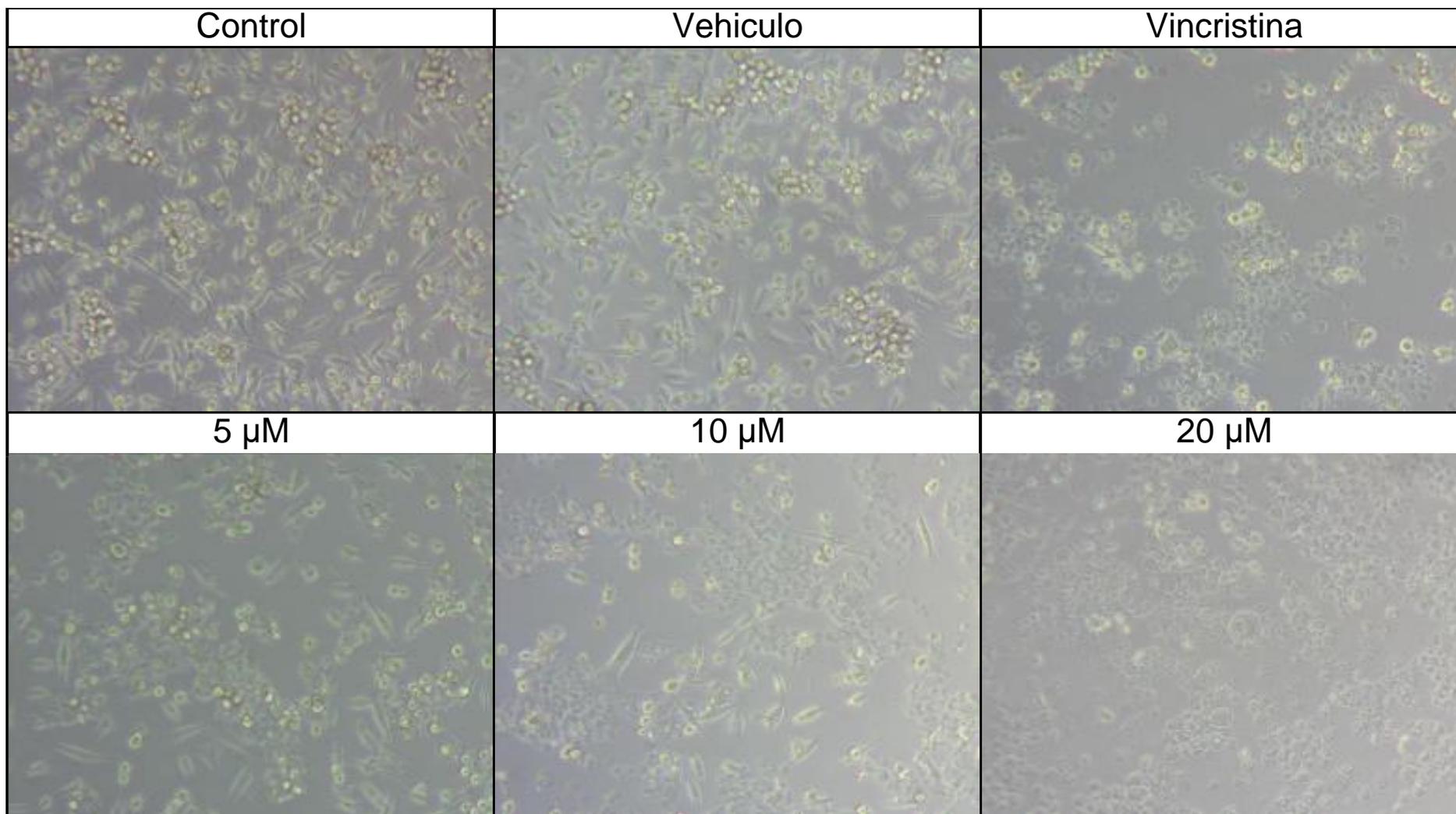


Figura 11. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 72 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μ M de CBD, 1 μ M de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μ m.

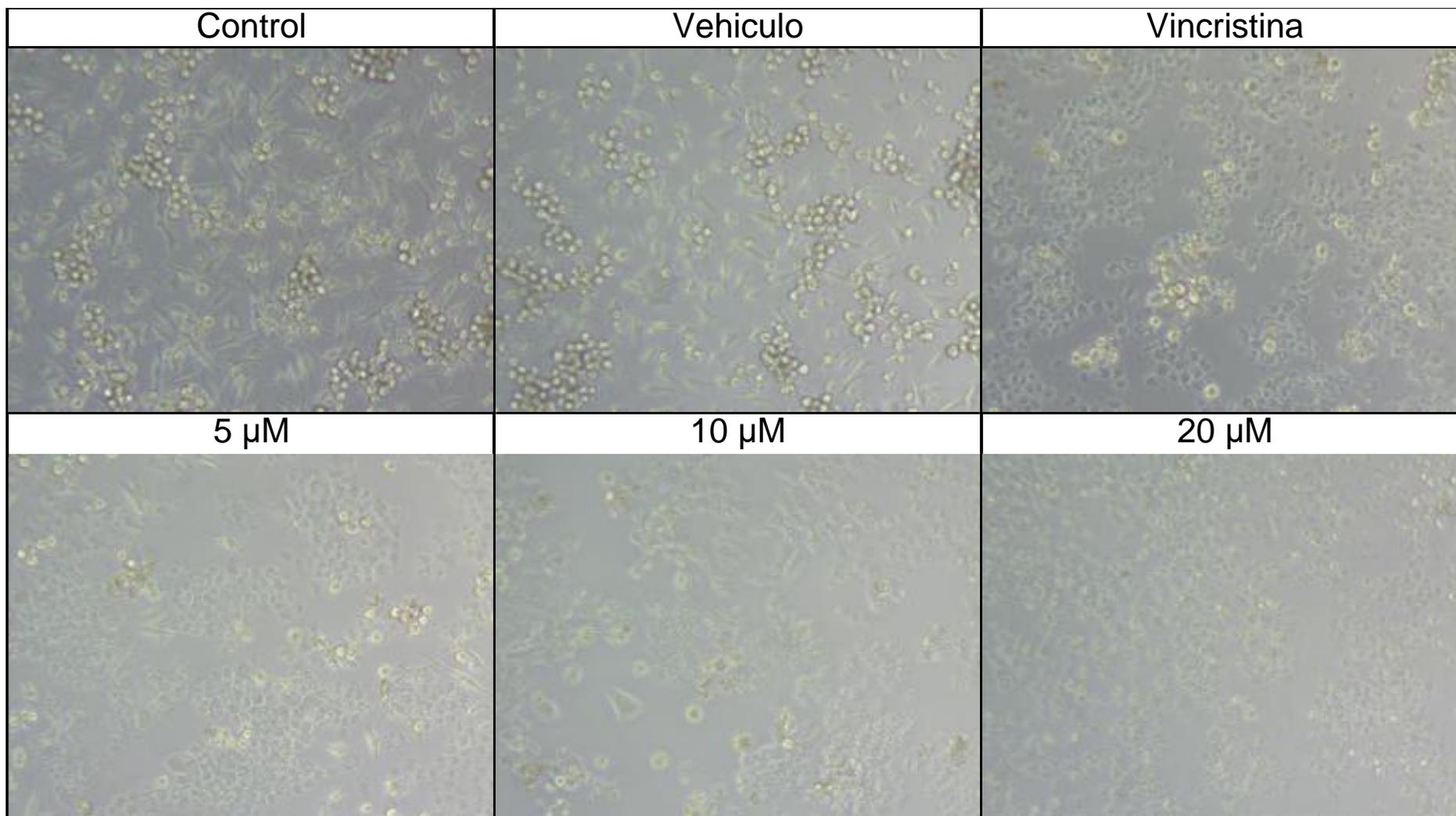


Figura 12. Células MDA-MB-231 estimuladas durante 96 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

En la figura 13, los cultivos de Caco-2 expuestos a diferentes concentraciones de CBD durante 24 h, solo mostraron disminución de la confluencia y cambios morfológicos con 10 y 20 μM de CBD y vincristina. A 10 μM podemos observar la formación de vesículas intracitoplasmáticas adyacentes al núcleo, sin la pérdida de su forma celular típica. Por otra parte, la exposición a 20 μM nos muestra un encogimiento celular tomando una forma redondeada relacionada con la disminución de la adherencia celular, características indicativas de estrés y muerte celular. Con la vincristina podemos apreciar desde células muertas que se encuentran en suspensión y refringentes a la luz, hasta células con su forma normal.

En la figura 14, los cultivos de células Caco-2 expuestos a diferentes concentraciones de CBD durante 48 h, mostraron una disminución de la confluencia celular y cambios morfológicos desde los 5 μM , exponiendo la formación de vesículas intracitoplasmáticas, a los 10 μM podemos observar en algunas células un aumento en el tamaño de las vesículas intracitoplasmáticas, formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación nuclear. Aunque también se puede observar encogimiento del tamaño celular, con la adquisición de una forma redondeada, pérdida de la adherencia celular y formación de cuerpos apoptóticos. A diferencia de las otras concentraciones a 20 μM la disminución de la confluencia celular era muy evidente, así como los detritus celulares que se observan en suspensión. En las células expuestas a vincristina se aprecia una disminución de las uniones celulares, cambios morfológicos relacionados con estrés celular y escasos detritus celulares en suspensión.

En la figura 15, los cultivos de células Caco-2 expuestos durante 72 h, a una concentración de 5 μM recuperaron su morfología normal, con 10 y 20 μM observamos resultados similares con cambios morfológicos como encogimiento, redondeo y pérdida de la adherencia celular. Por otra parte, las células que se trataron con vincristina presentan cambios morfológicos más aberrantes, pero conservan la adherencia celular y en algunos casos se observa el encogimiento y redondeo celular.

En la figura 16 se observan células Caco-2 tratadas durante 96 h con 5 μM de CBD donde se aprecia la conservación de su morfología evidenciando resistencia. A diferencia de 10 y 20 μM que hacen muy notorio el efecto citotóxico. Al exponerlas a vincristina observamos que alrededor del 60 % de las células presentan cambios morfológicos sugerentes de estrés y muerte celular.

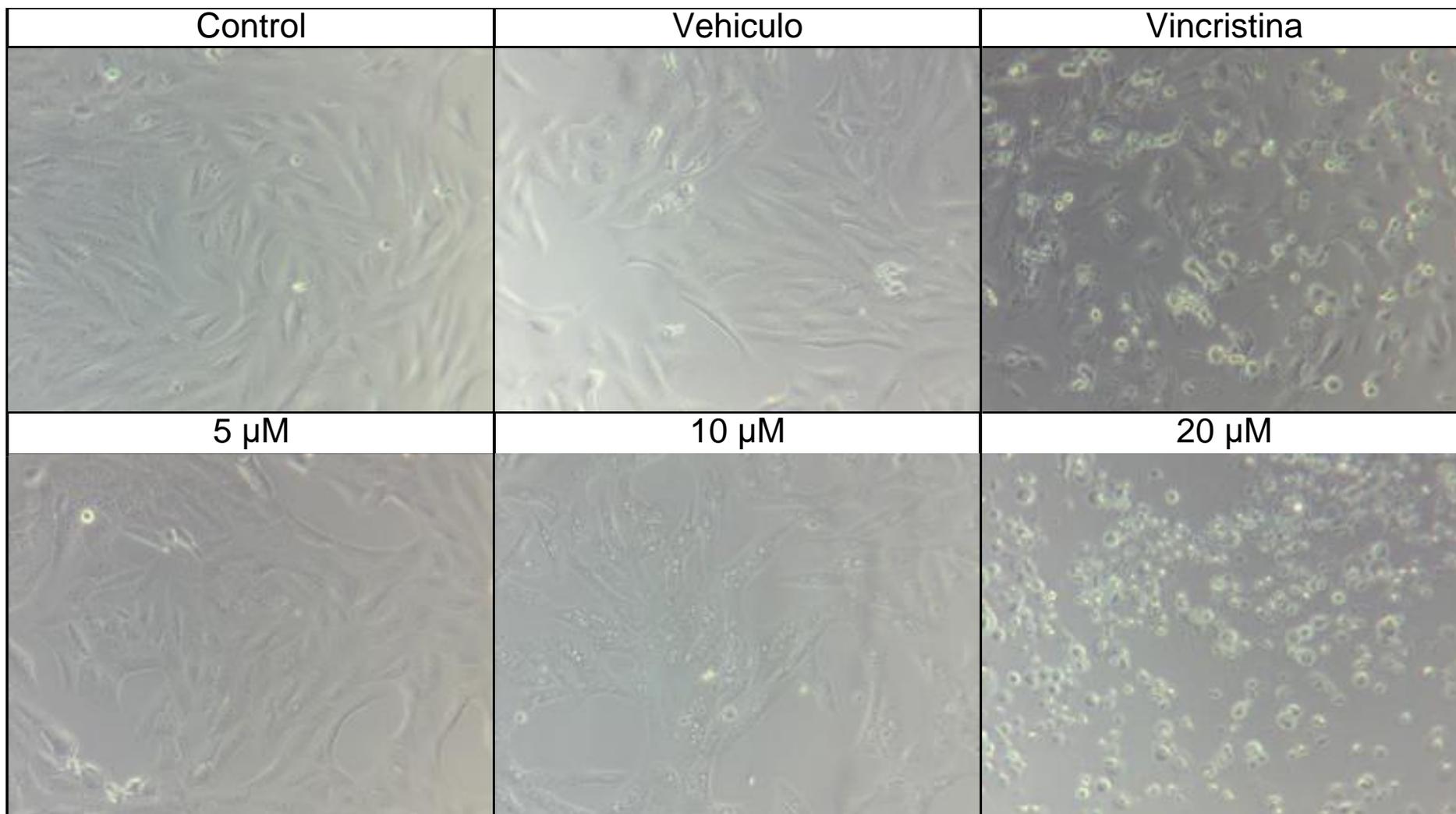


Figura 13. Células Caco-2 estimuladas durante 24 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

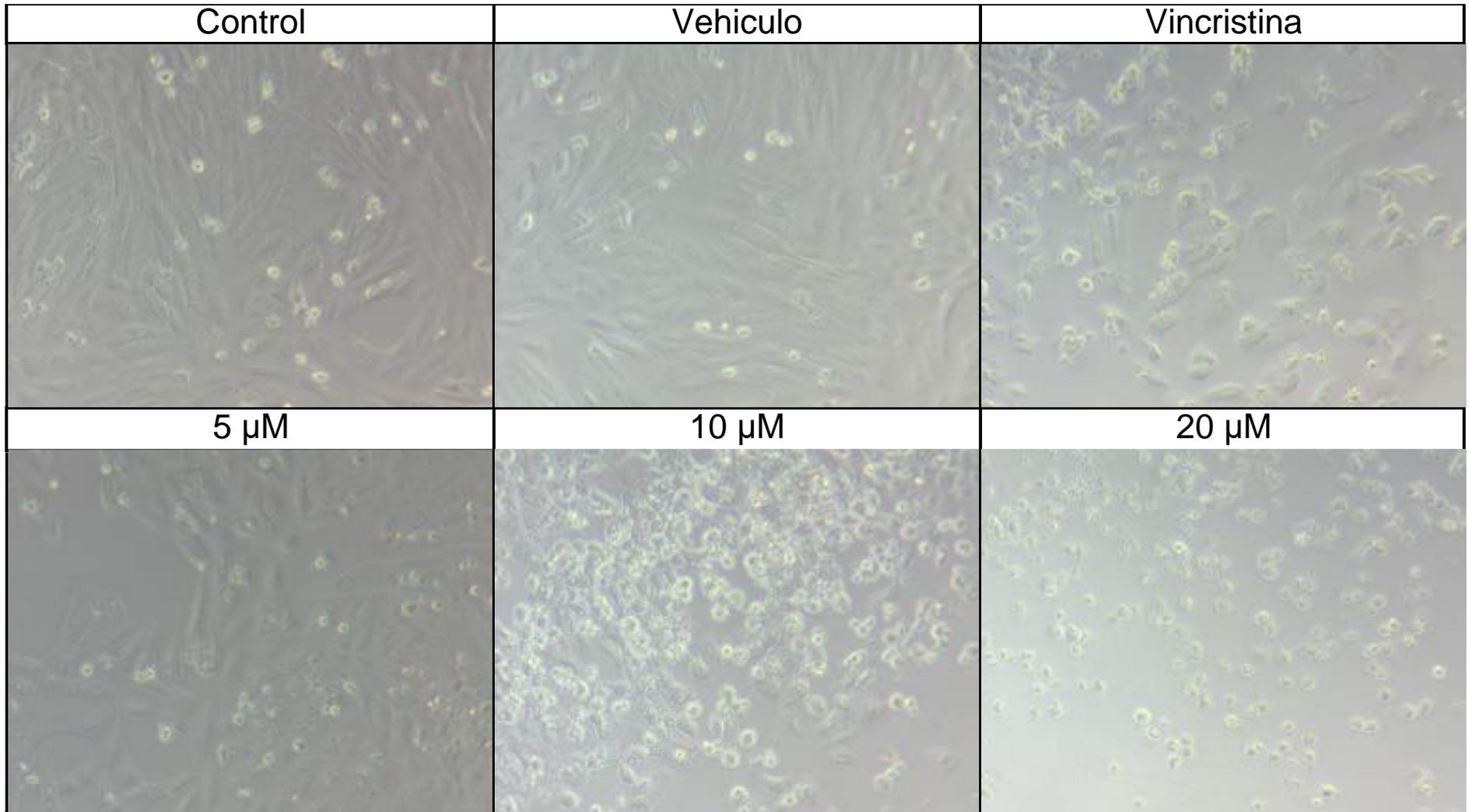


Figura 14. Células Caco-2 estimuladas durante 48 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

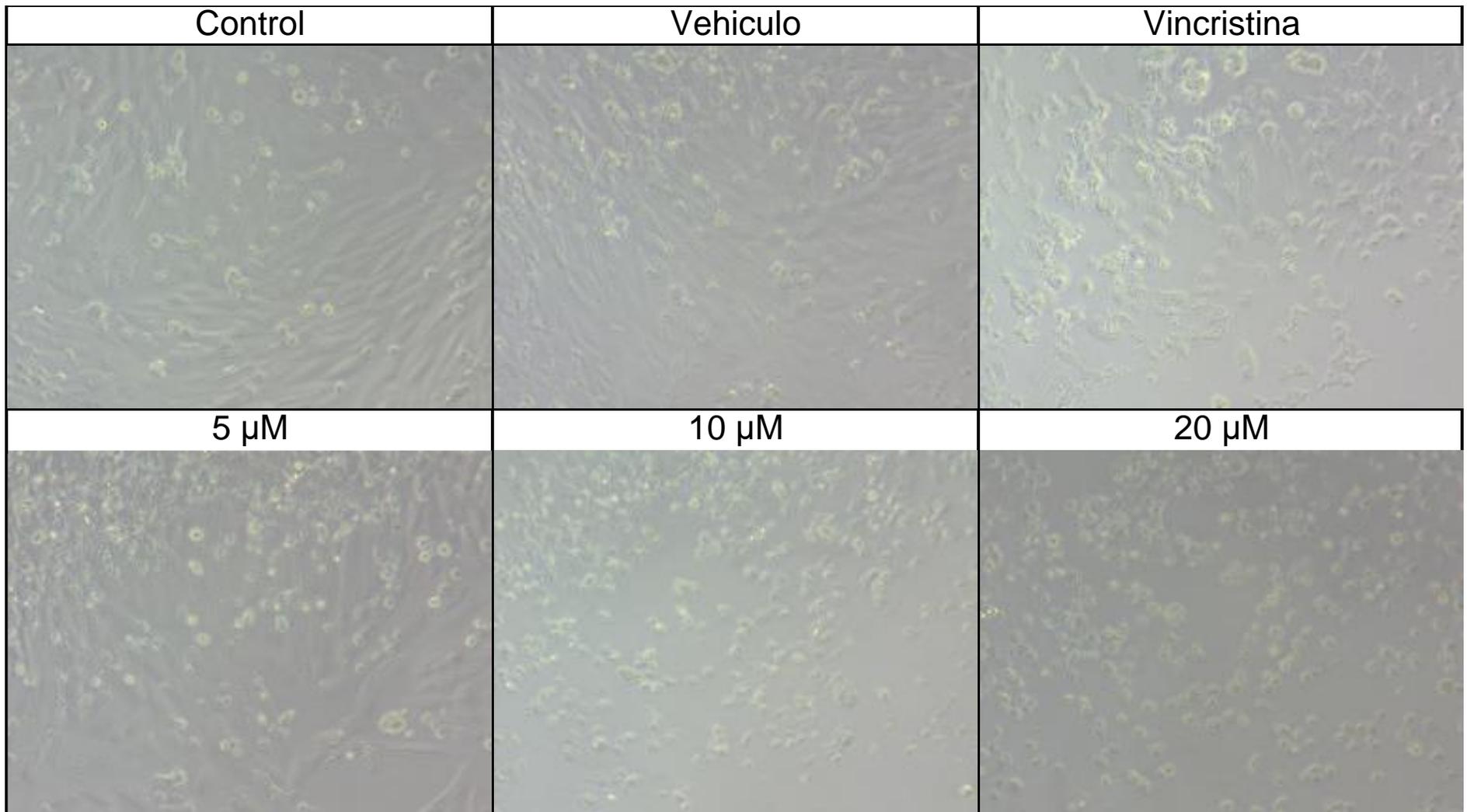


Figura 15. Células Caco-2 estimuladas durante 72 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

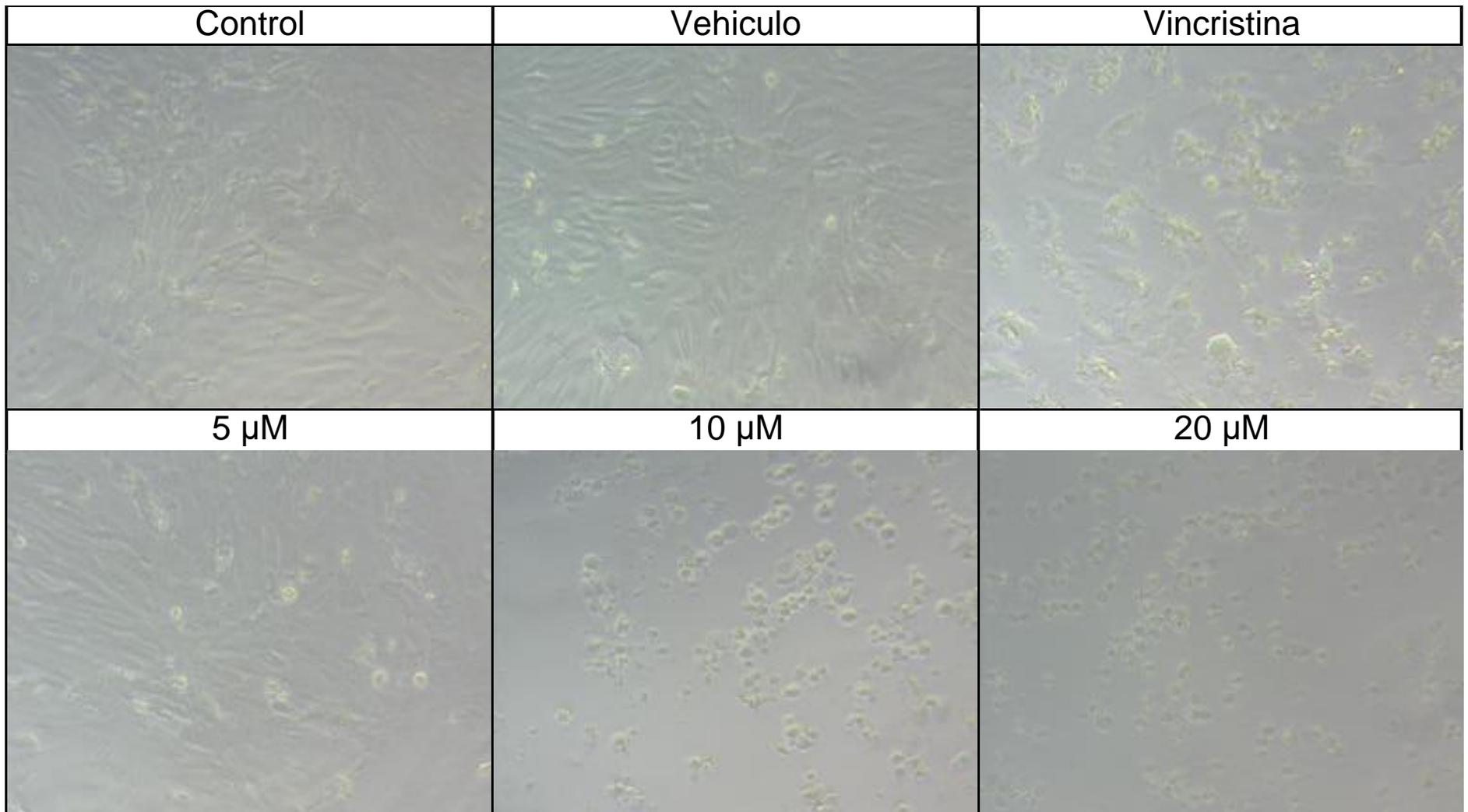


Figura 16. Células Caco-2 estimuladas durante 96 h a diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 300 μm .

7.2 El CBD disminuye la intensidad de fluorescencia nuclear de las células cancerígenas.

Para determinar la viabilidad celular, en células estimuladas con CBD, medimos la fluorescencia emitida de las células adheridas, teñidas con el marcador nuclear DAPI, con la finalidad relacionar los resultados obtenidos en el ensayo de MTT.

La línea celular HaCaT expuesta a los tratamientos durante 24 horas, teñida con el colorante DAPI, se expone en la figura 17. La exposición durante 48 horas se muestra en la figura 18. La exposición durante 72 horas se evidencia en la figura 19 y el periodo de 96 horas en la figura 20.

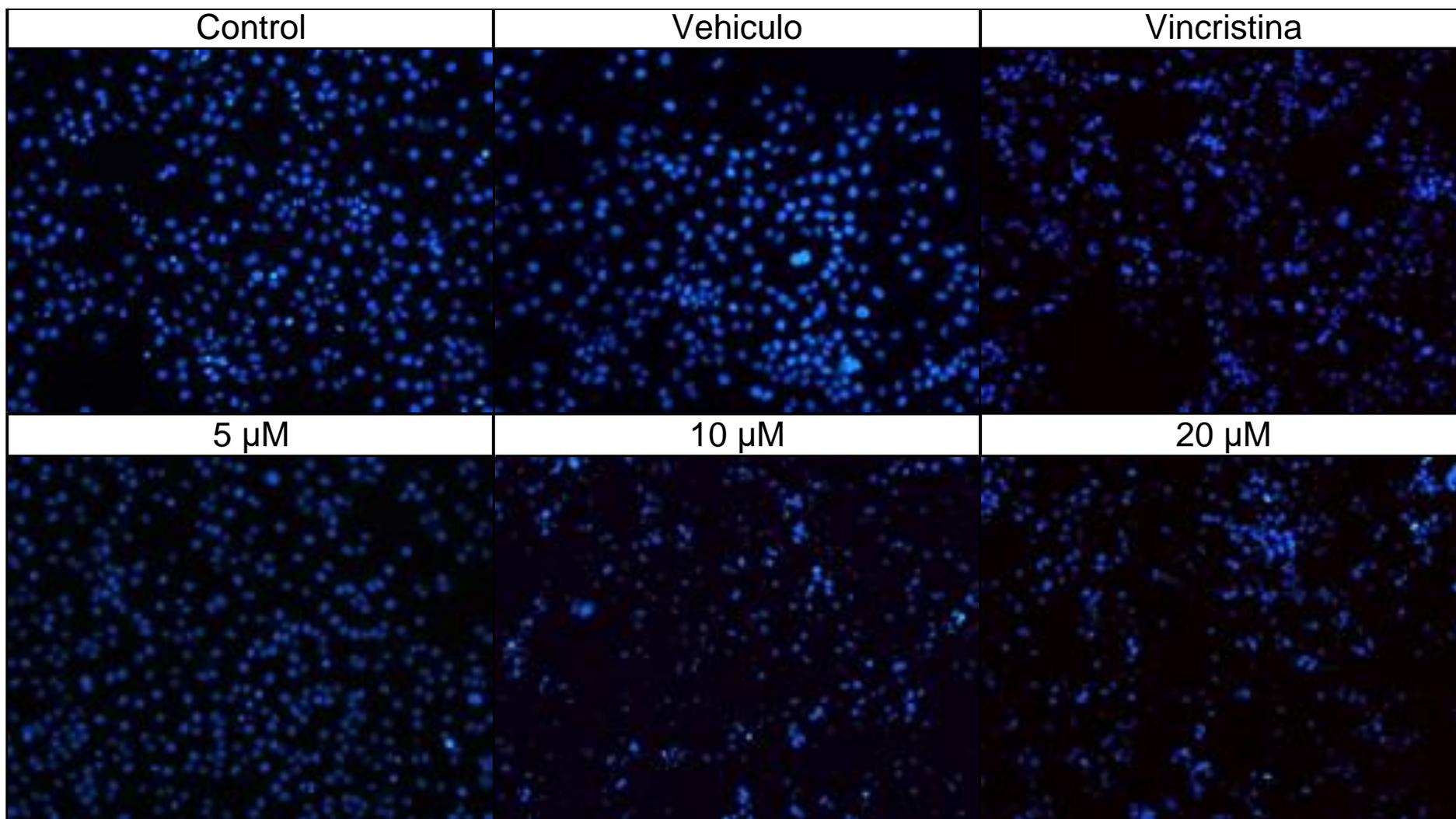


Figura 17. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

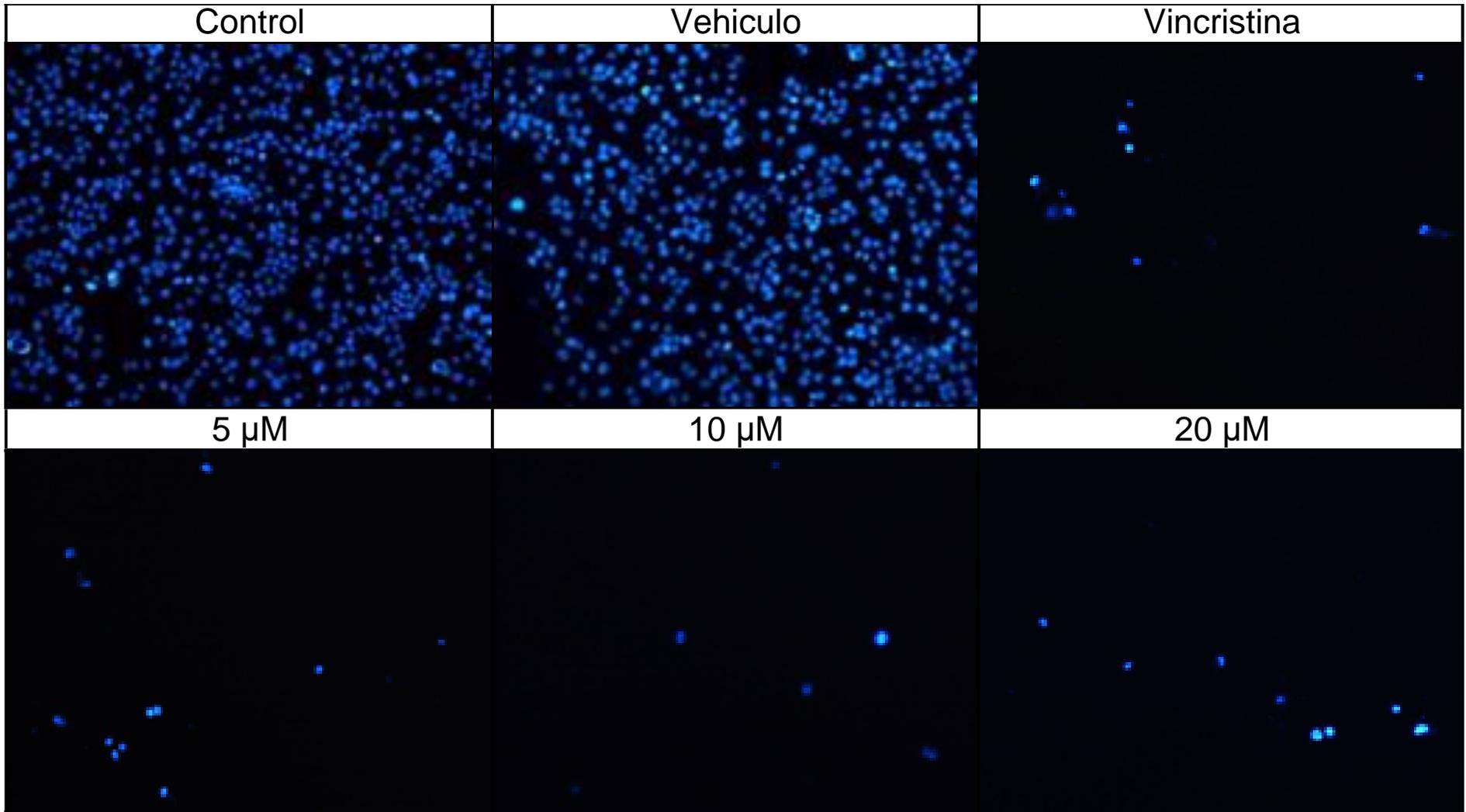


Figura 18. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

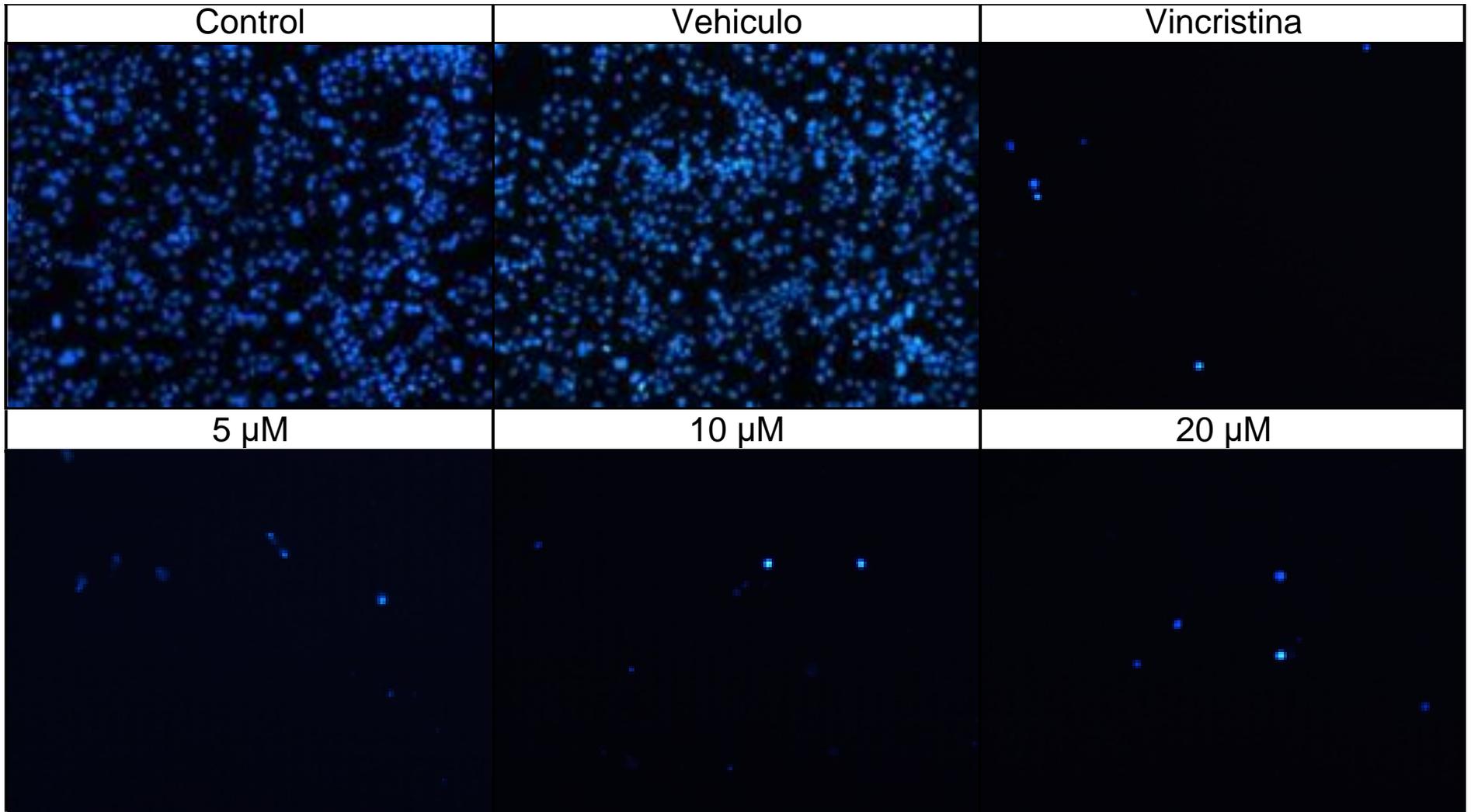


Figura 19. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

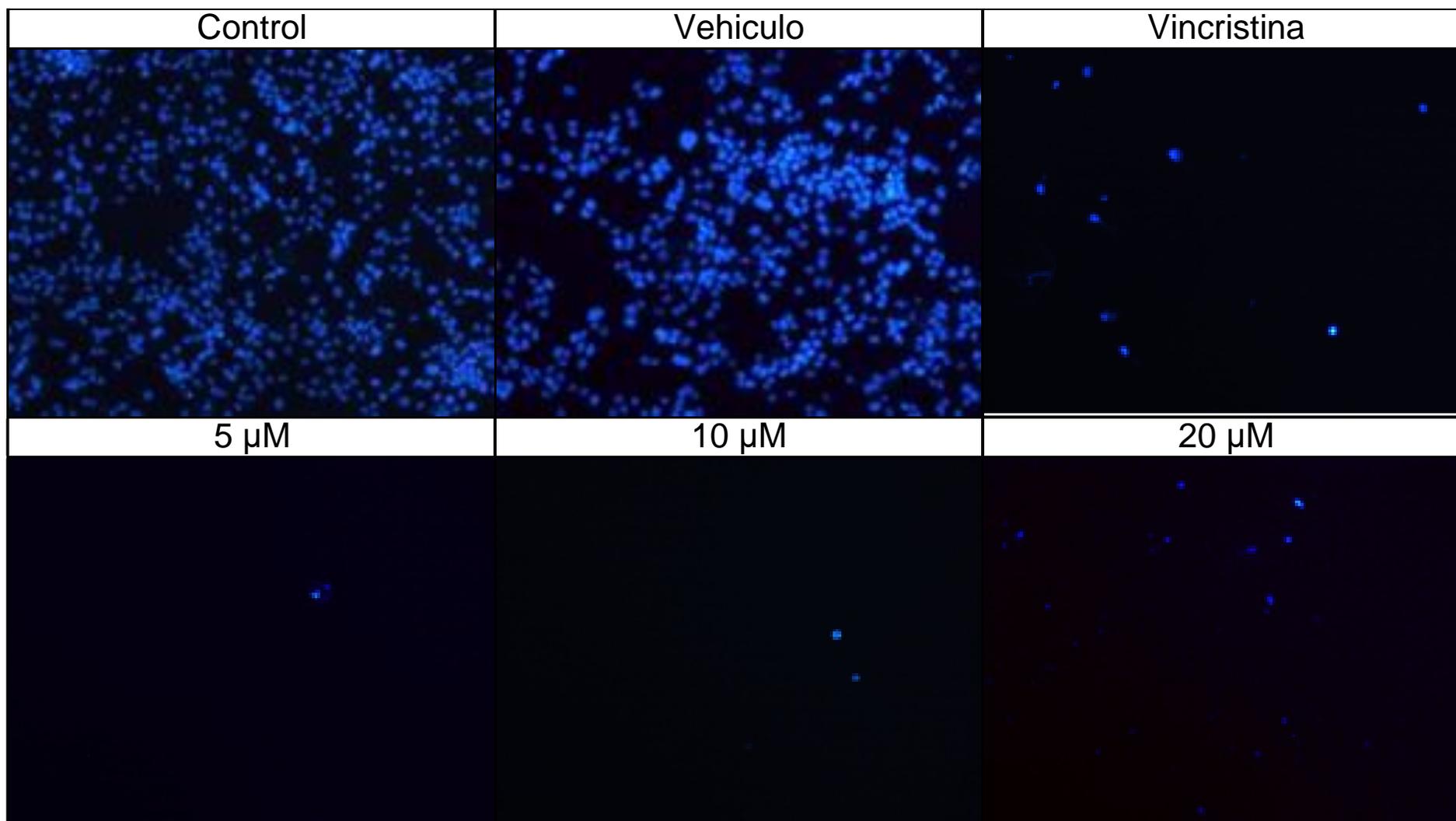


Figura 20. Fluorescencia nuclear con DAPI en HaCaT estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

La línea celular HeLa expuesta a los tratamientos durante 24 horas, teñida con el colorante DAPI, se muestra en la figura 21, la estimulación durante 48 horas se expresa en la figura 22, la exposición durante 72 horas en la figura 23 y durante 96 horas en la figura 24.

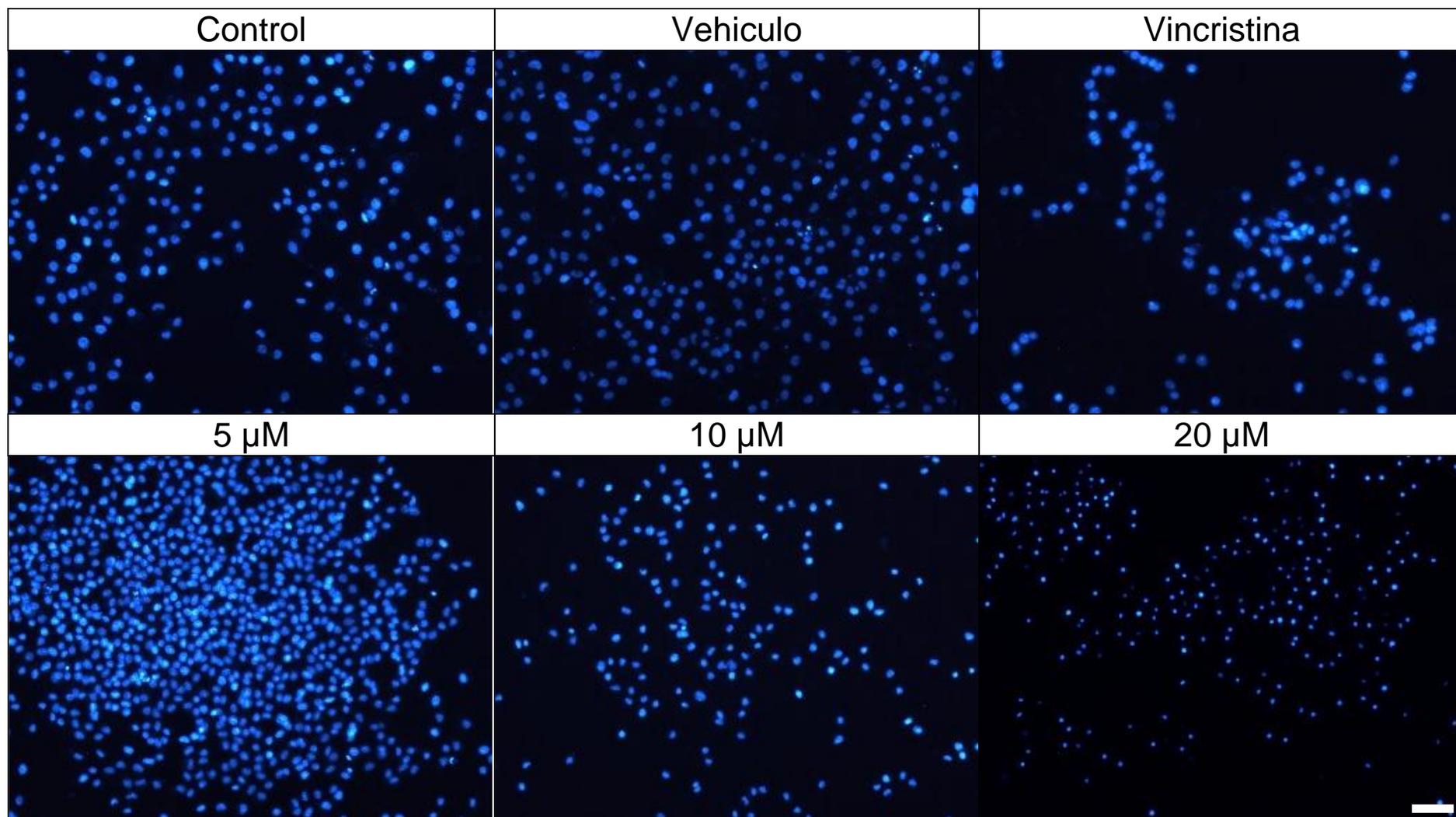


Figura 21. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

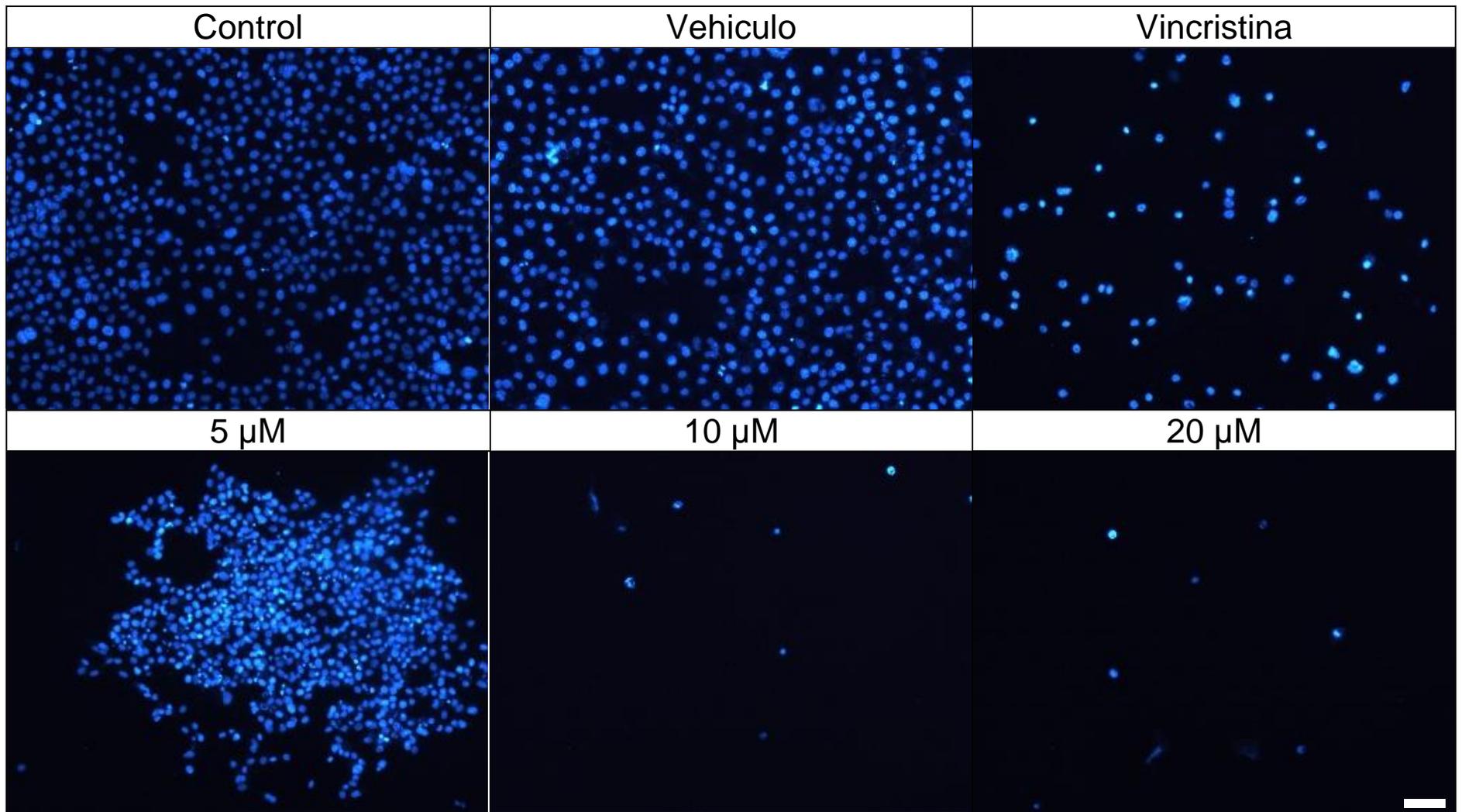


Figura 22. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

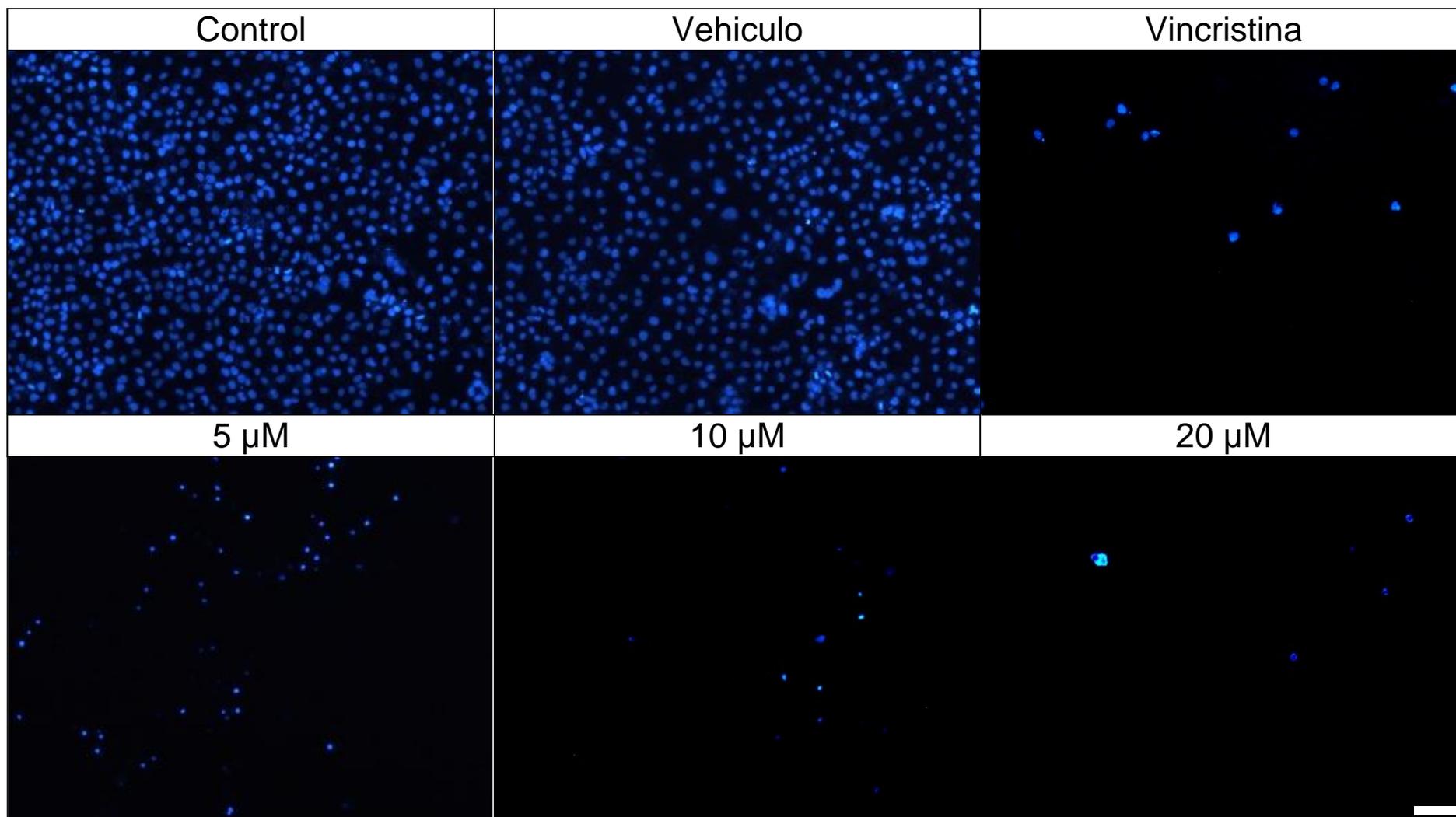


Figura 23. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

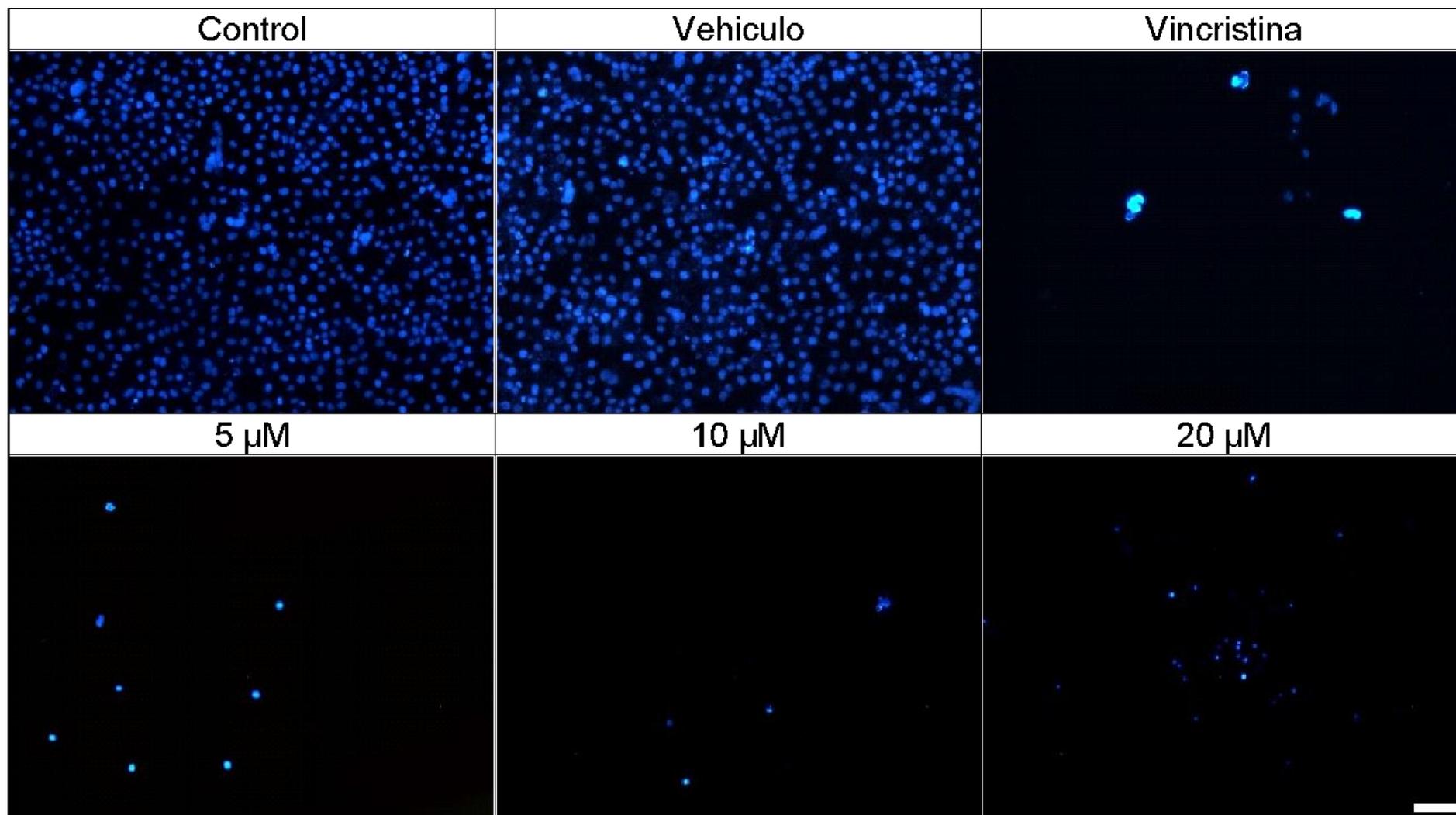


Figura 24. Fluorescencia nuclear con DAPI en HeLa estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

La línea celular MDA-MB-231 expuesta a los tratamientos durante 24 horas, teñida con el colorante DAPI, se expresa en la figura 25, estimuladas en un lapso de 48 horas en la figura 26, estimuladas durante 72 h en la figura 27 y estimuladas durante 96 horas en la figura 28.

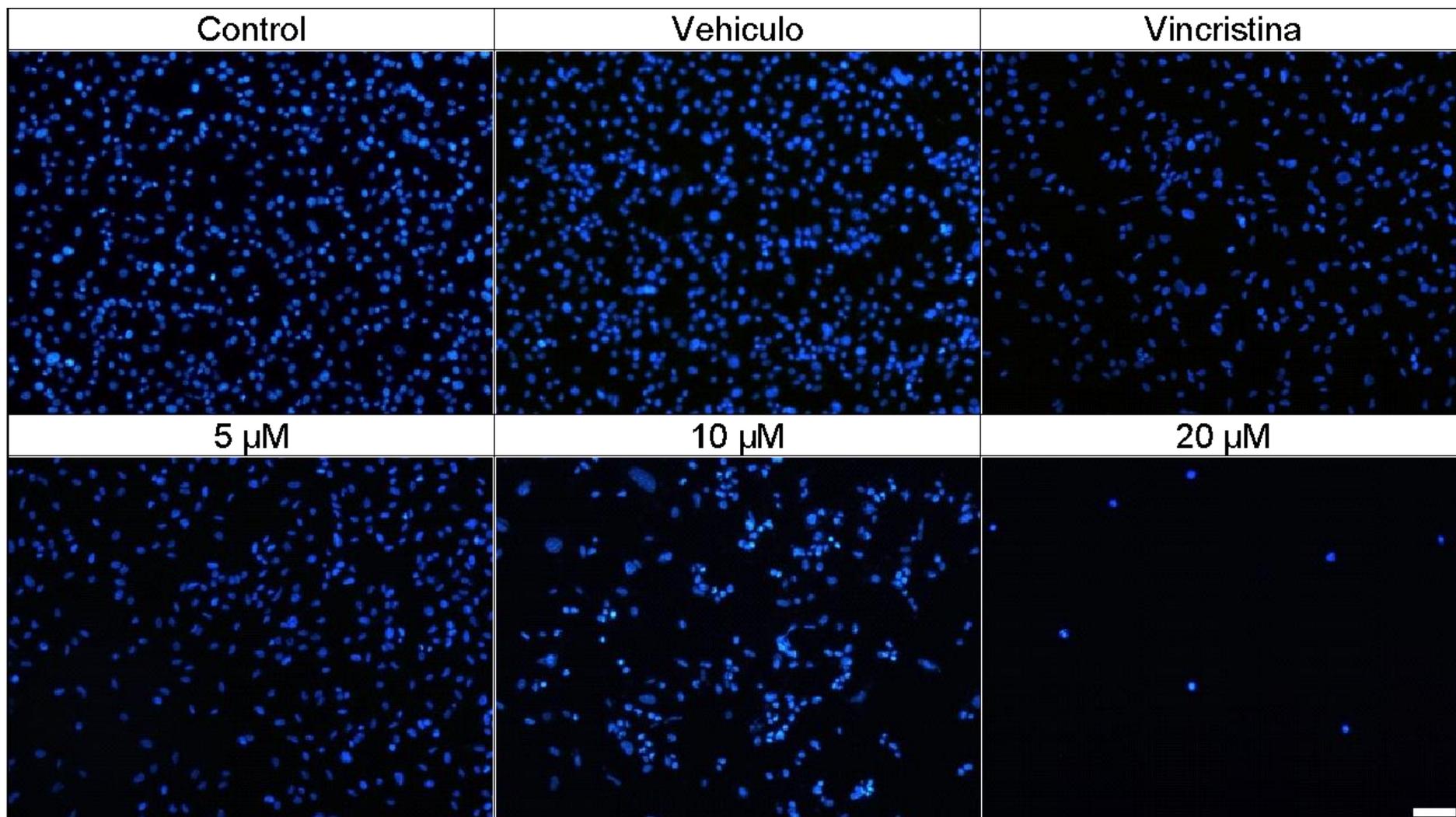


Figura 25. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

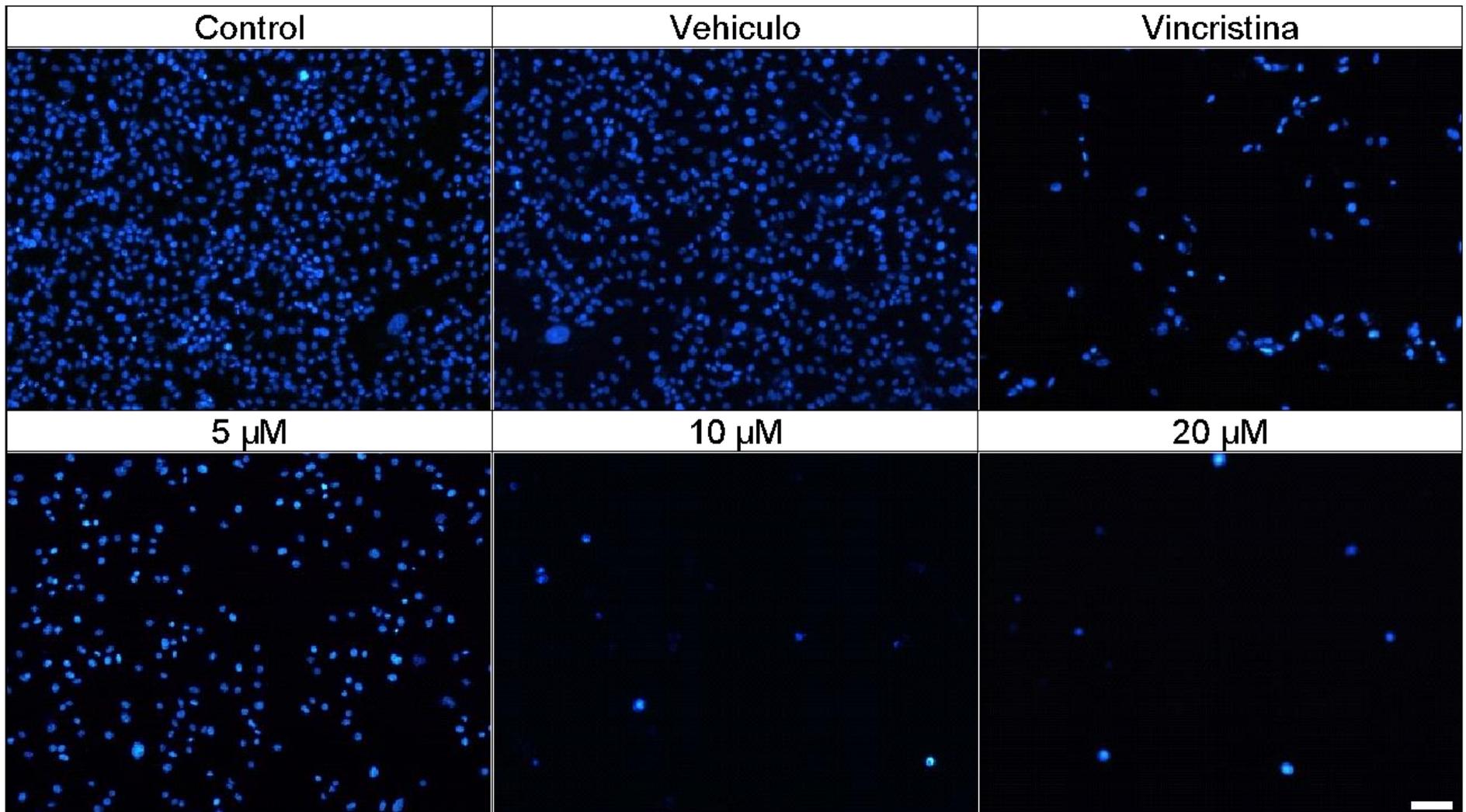


Figura 26. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

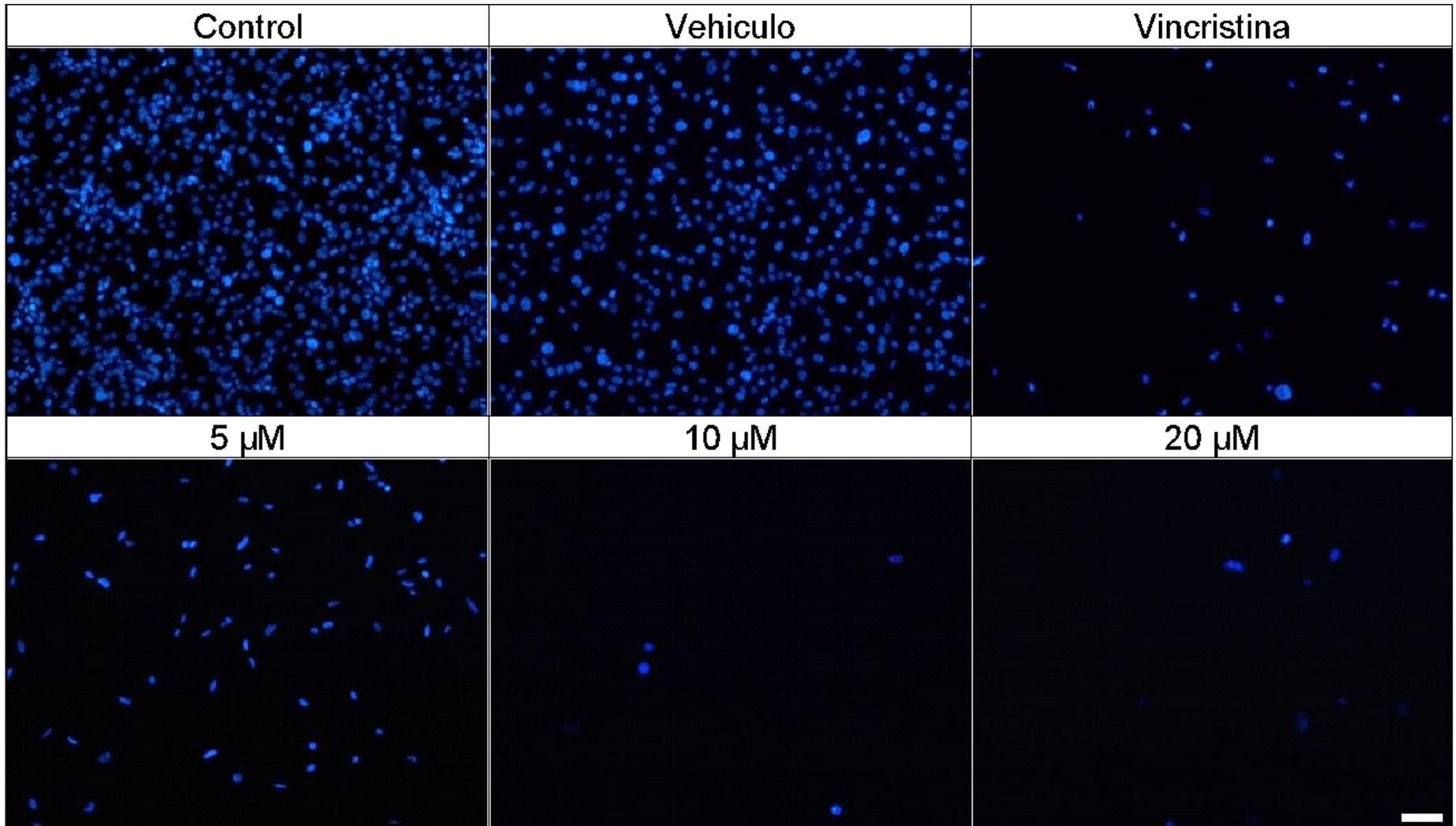


Figura 27. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

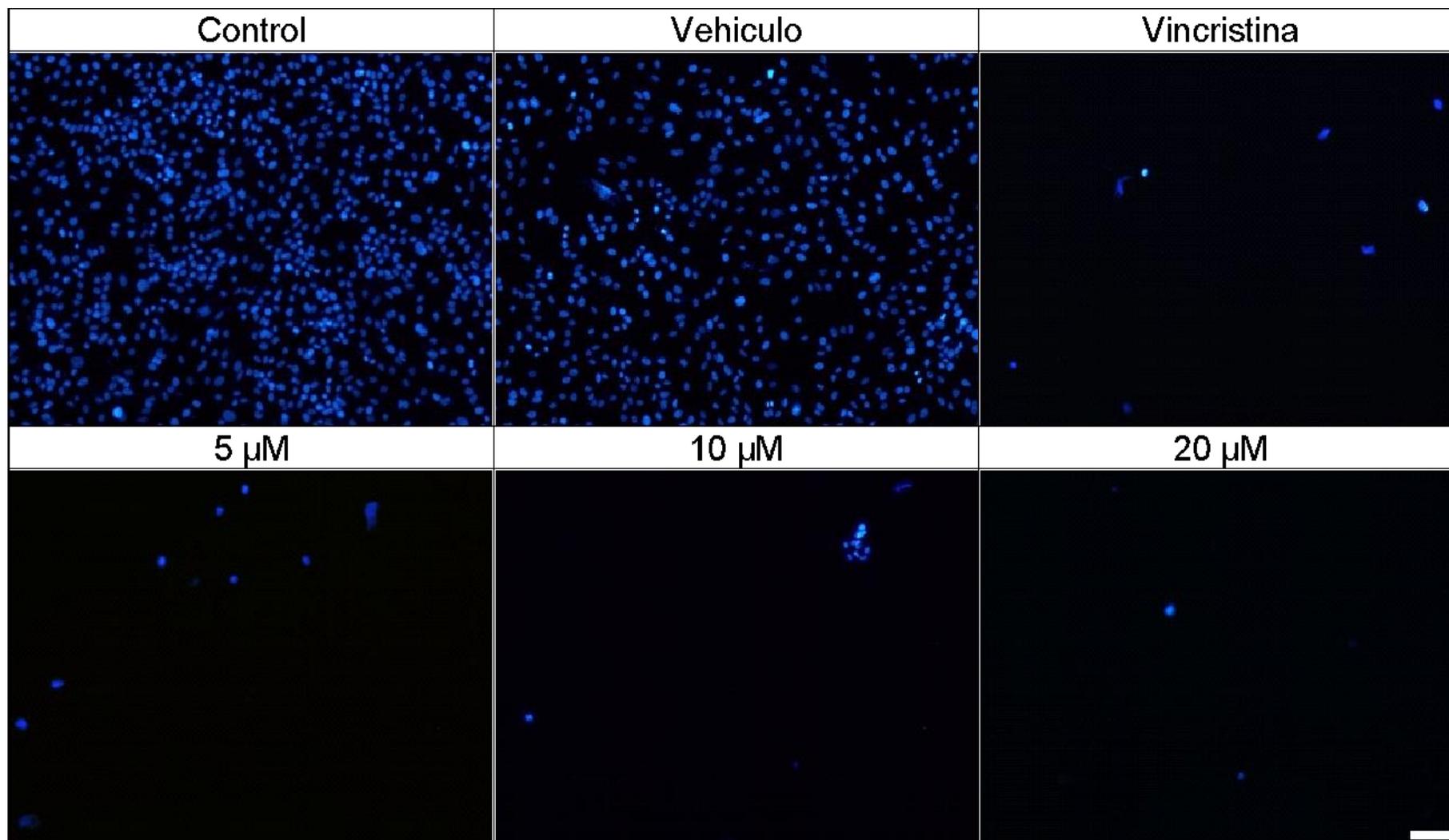


Figura 28. Fluorescencia nuclear con DAPI en MDA-MB-231 estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

Las células Caco-2 expuesta a los tratamientos durante 24 horas, teñida con el colorante DAPI, se muestran en la figura 29, estimuladas durante 48 horas en la figura 30, estimuladas durante 72 horas en la figura 31, estimuladas durante 96 horas en la figura 32.

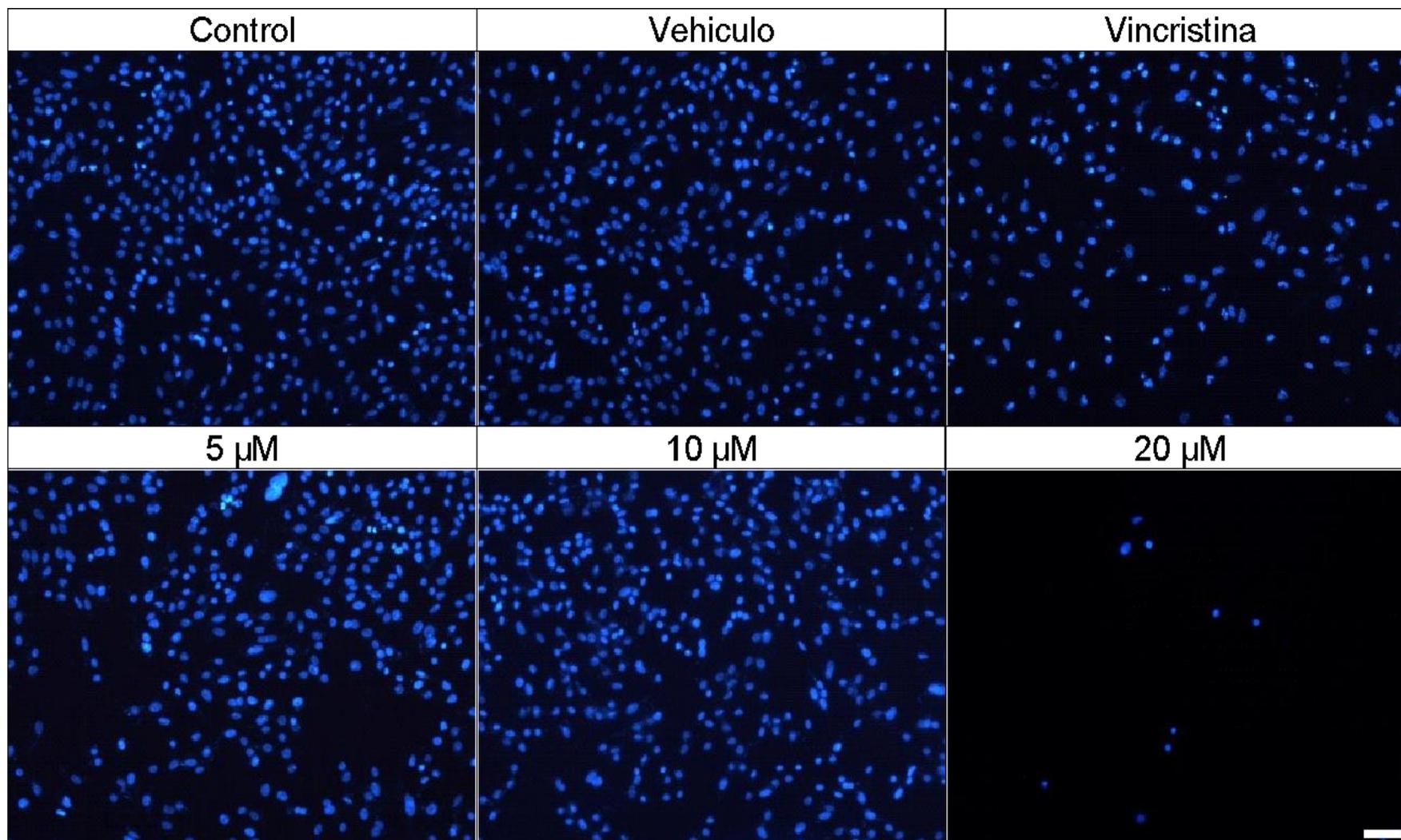


Figura 29. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 24 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm.

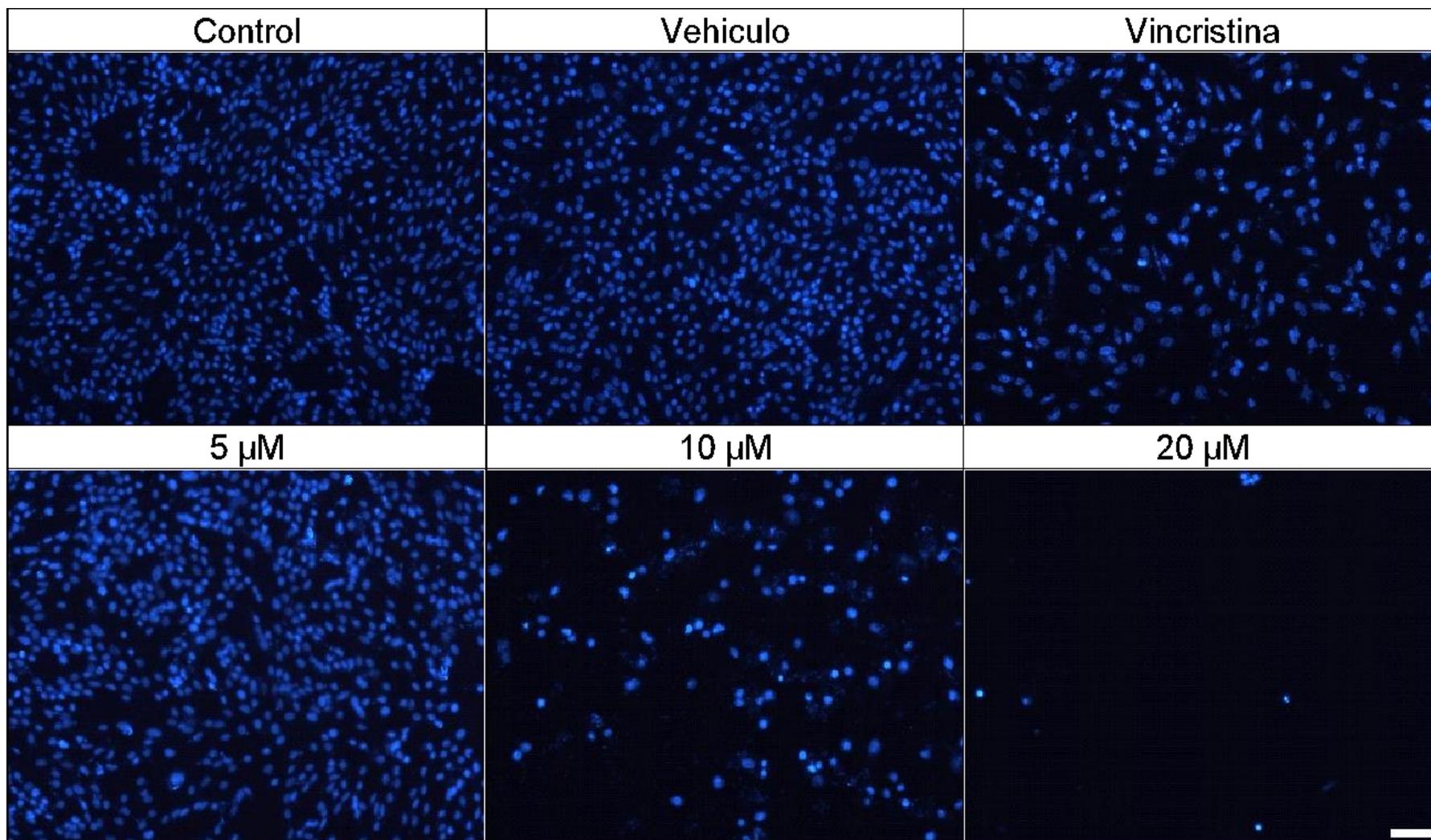


Figura 30. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 48 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

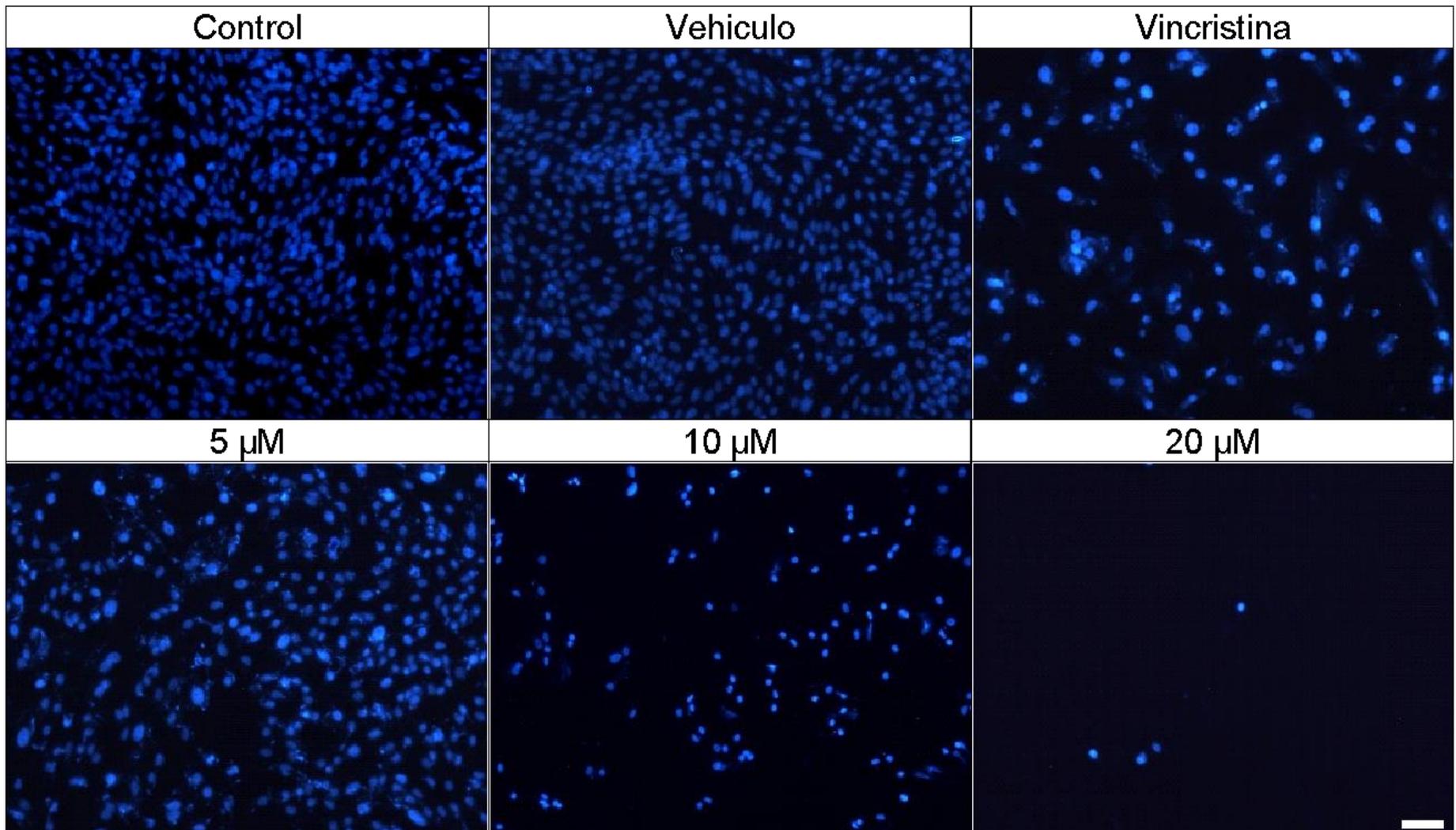


Figura 31. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 72 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

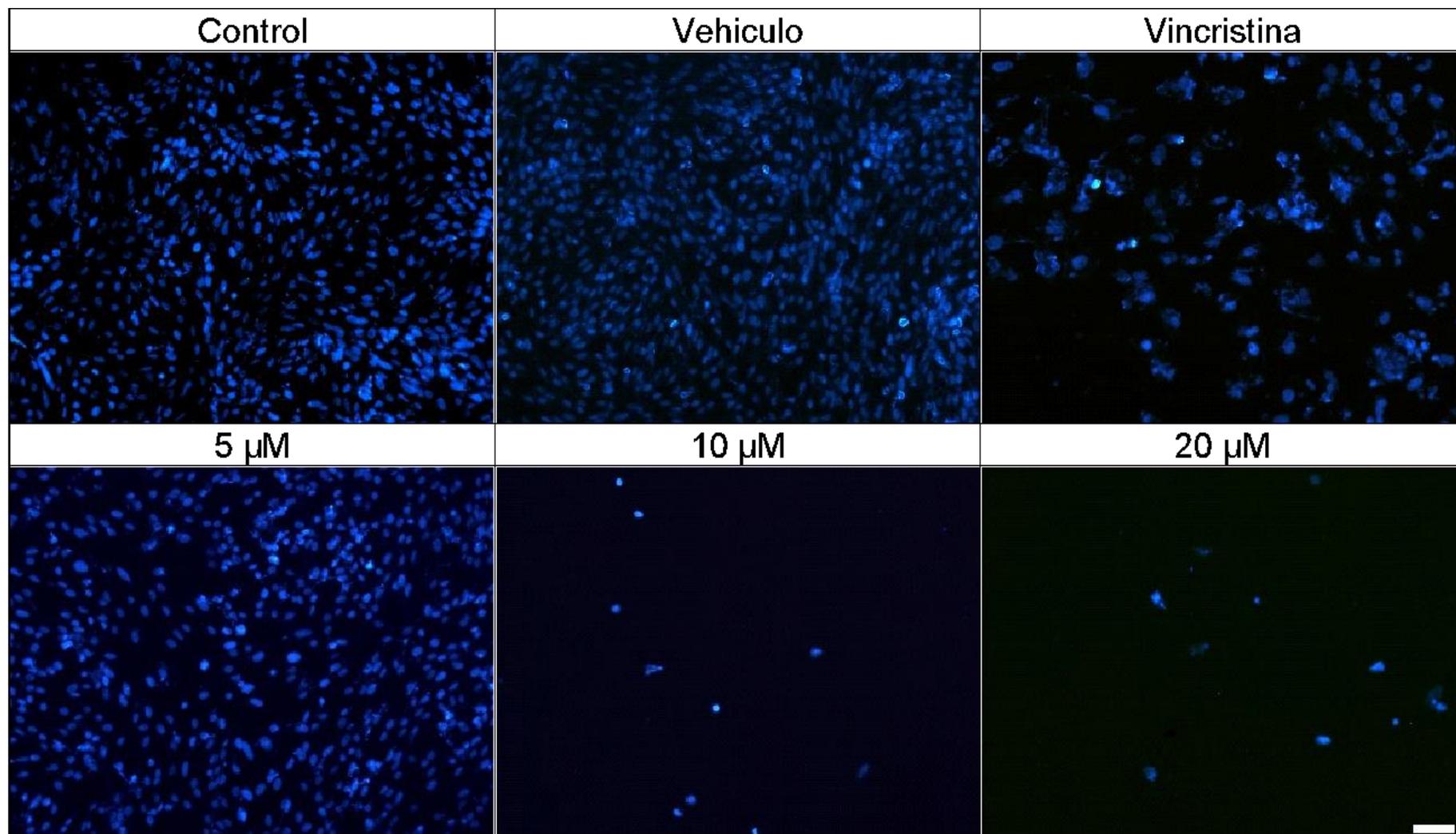


Figura 32. Fluorescencia nuclear con DAPI en Caco-2 estimuladas durante 96 h con diferentes concentraciones de CBD y controles. Se aplicaron los tratamientos con 5, 10 y 20 μM de CBD, 1 μM de vincristina, metanol (vehículo) y medio de cultivo (control). Barra de escala 50 μm .

La comparación de la intensidad de fluorescencia emitido por núcleos marcados con DAPI en células cancerígenas expuestas a concentraciones de CBD y controles en los tiempos de exposición determinados 24, 48, 72 y 96 h, son mostrados en la figura 33.

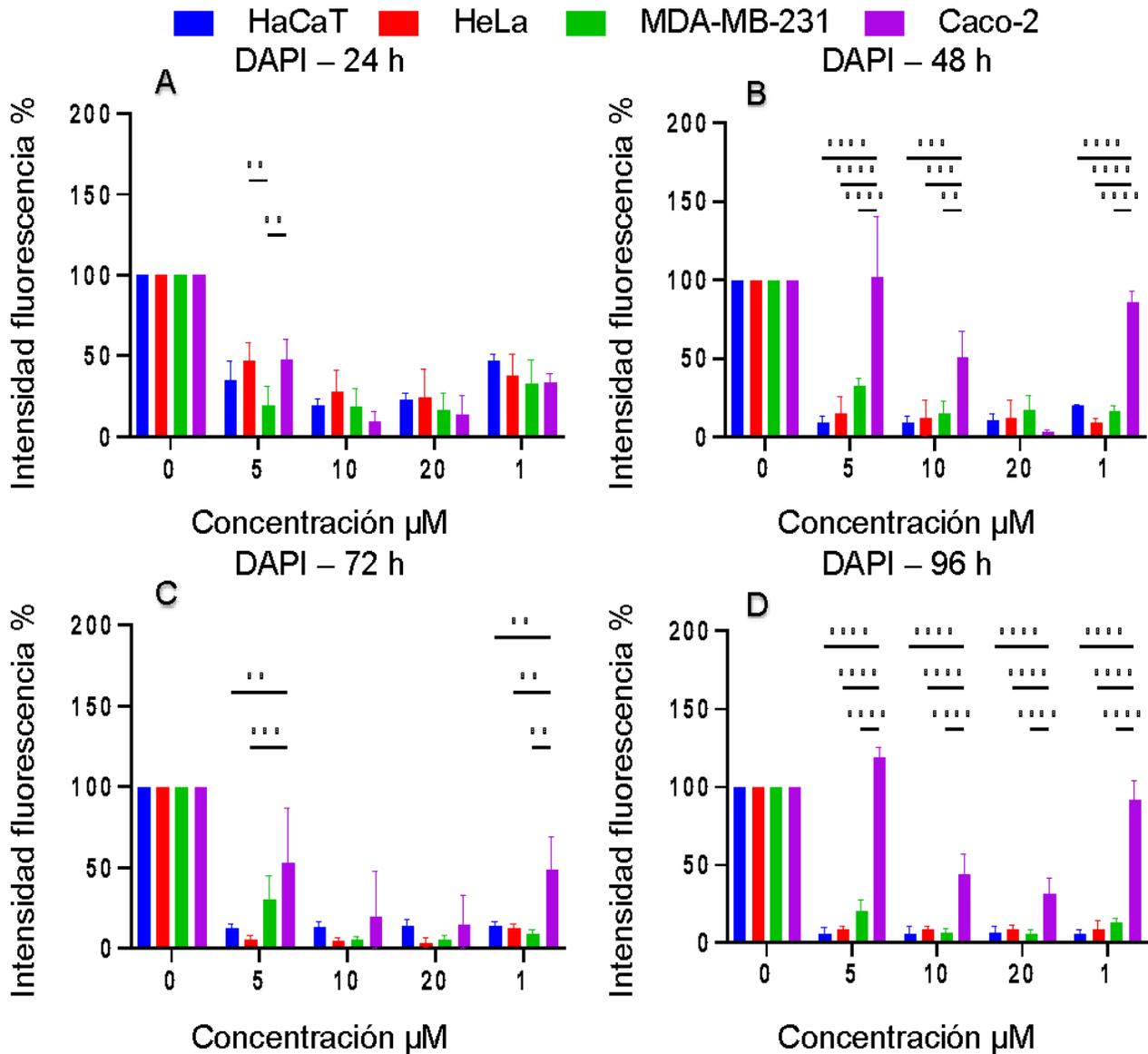


Figura 33. Análisis cuantitativo a través del marcaje de núcleos con DAPI en células expuestas a concentraciones de CBD en diferentes tiempos. Se exponen los porcentajes de intensidad de fluorescencia emitida en HaCaT, HeLa, MDA-MB-231 y Caco-2 tratadas con 5, 10 y 20 uM de CBD, 1 uM de vincristina (control positivo) y medio (control negativo). 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) y 96 h (D). n = 5. *P < 0.05, Prueba de comparación múltiple de Tukey.

El comportamiento por línea celular tras su exposición a las concentraciones de CBD y controles, durante 24, 48, 72 y 96 h, se muestra en la figura 34.

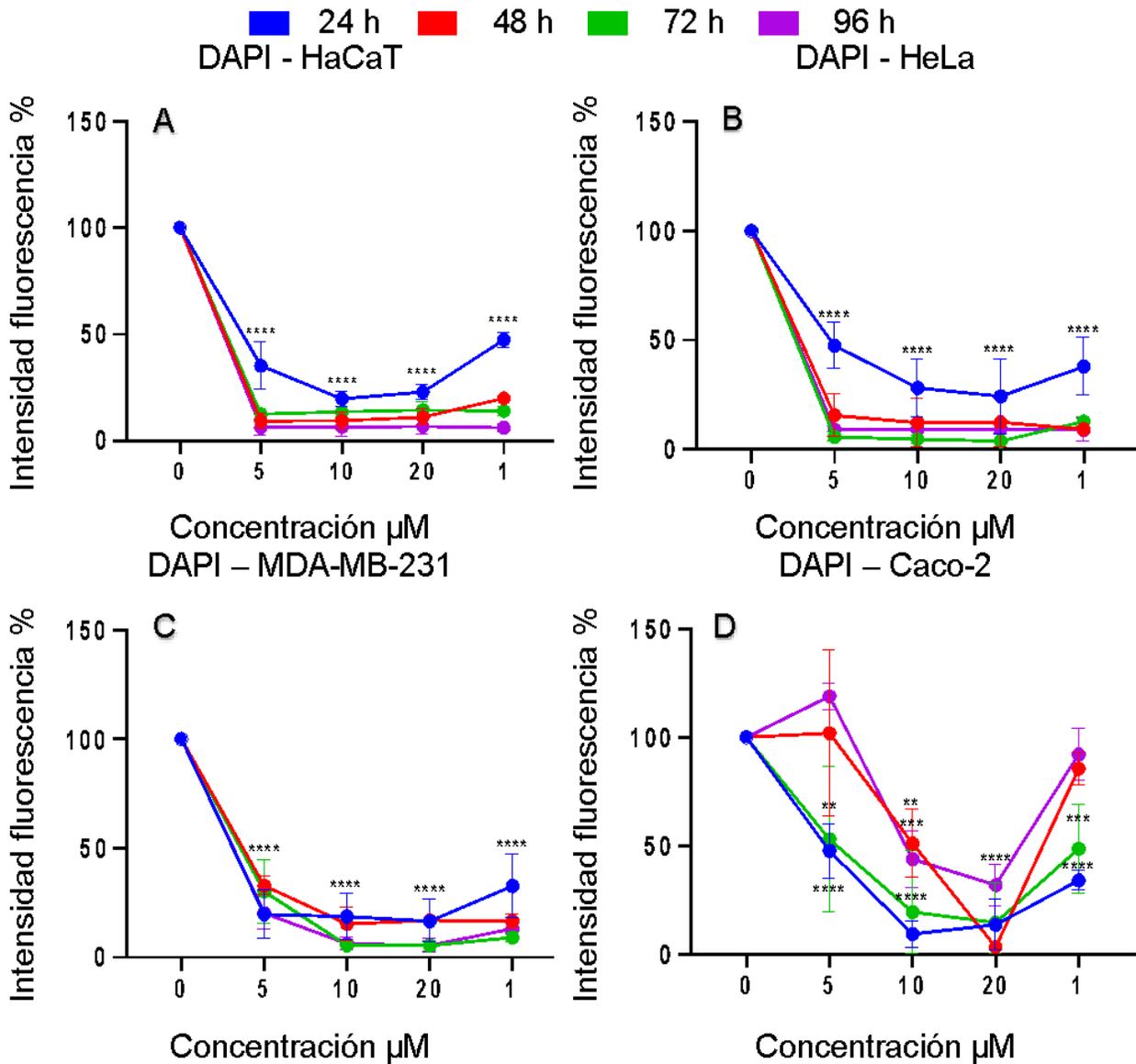


Figura 34. Análisis por línea celular expuestas a diferentes concentraciones de CBD y controles, a través del marcaje nuclear con DAPI. Se muestra el comportamiento de HaCaT (A), HeLa (B), MDA-MB-231 (C) y Caco-2 (D), después de su exposición a las concentraciones de 5, 10 y 20 µM de CBD, 1 µM de vincristina (control positivo), medio (control negativo), a las 24 h (azul), 48 h (rojo), 72 h (verde) y 96 h (rosa). *p < 0.05, Prueba de comparación múltiple de Tukey por línea celular vs control negativo.

7.3 El CBD induce una alteración del metabolismo en las células cancerígenas.

El ensayo de MTT nos permitió obtener los siguientes resultados (Figura 5): 24 horas (A) las células HeLa demostraron diferencias significativas desde los 10 μM , a diferencia, MDA-MB-231 indico sensibilidad a los 20 μM y las células Caco-2 fueron significativamente más sensibles a todas las concentraciones de CBD. Los efectos durante 48 horas (B) indicaron que las células HeLa resultaron más sensibles en todas las concentraciones excepto a 5 μM , además, MDA-MB-231 mostró efecto dependiente de concentración, en cambio Caco-2 expuso resistencia a todas las concentraciones. A 72 horas (C) las células HeLa indicaron un efecto similar a los tiempos anteriores, de igual forma las células MDA-MB-231 solo indicaron sensibilidad a 20 μM , además las células Caco-2 mostraron resistencia en todas las concentraciones y las células HaCaT se mostraron sensibles a partir de este lapso. A 96 horas (D) la línea HeLa presento efectos similares a los anteriores, aunque MDA-MB-231 demostró diferencias desde los 10 μM , en cambio las células Caco-2 mostraron resistencia y las células HaCaT mostraron sensibilidad a todas las concentraciones.

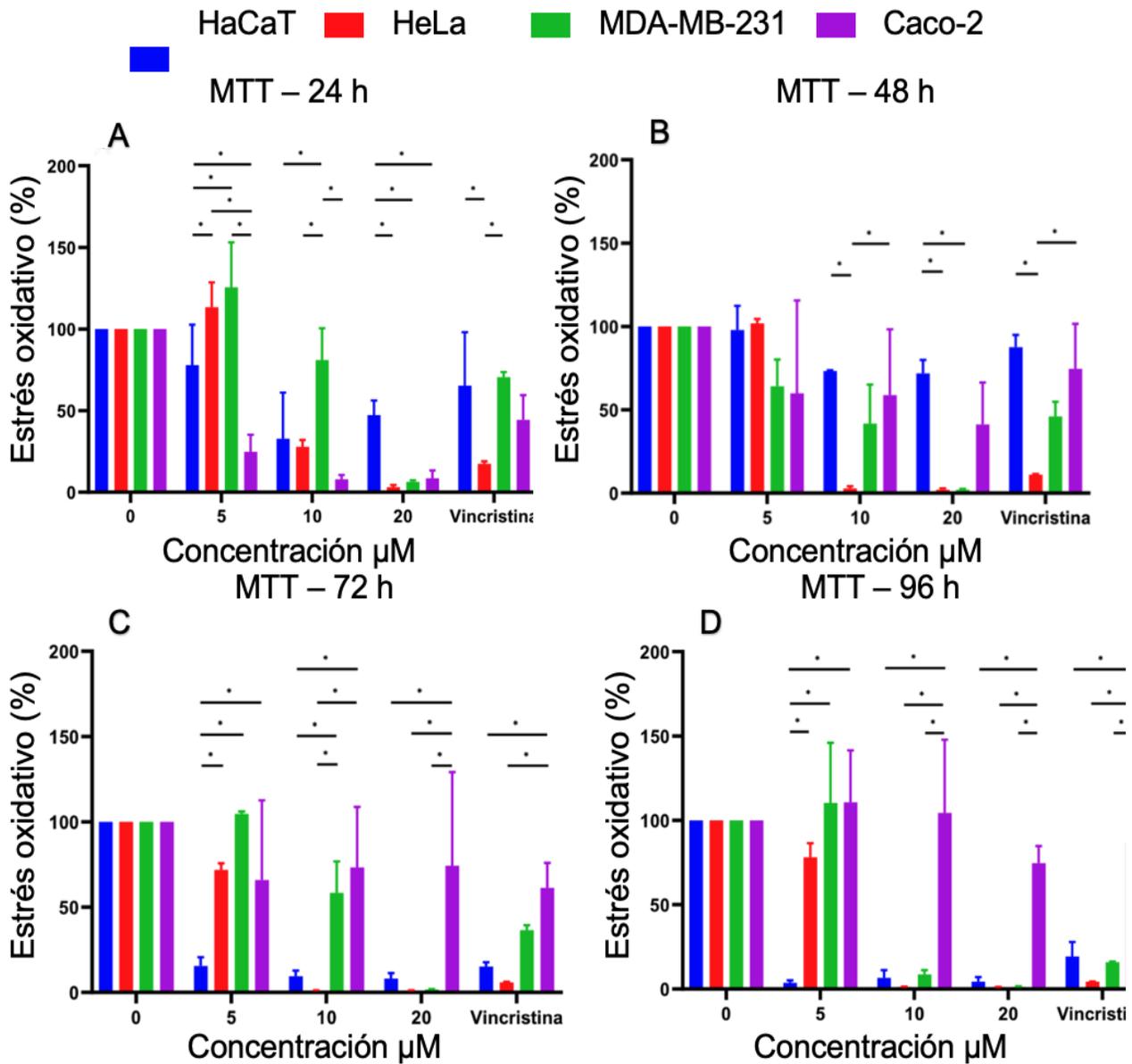


Figura 35. Análisis de citotoxicidad mediante ensayo MTT en células estimuladas durante 24, 48, 72 y 96 horas con diferentes concentraciones de CBD. Los porcentajes relativos de viabilidad celular se muestran para las líneas HaCaT, HeLa, MDA-MB-231 y Caco-2. Las líneas expuestas a concentraciones de 0, 5, 10 y 20 μM de CBD y 1 μM de vincristina (control positivo) durante 24 h (A), 48 h (B), 72 h (C) y 96 h (D), $n = 5$. * $p < 0.05$, la prueba de comparación múltiple de Tukey frente a las células HaCaT.

7.4 El CBD disminuye la viabilidad celular en las células cancerígenas.

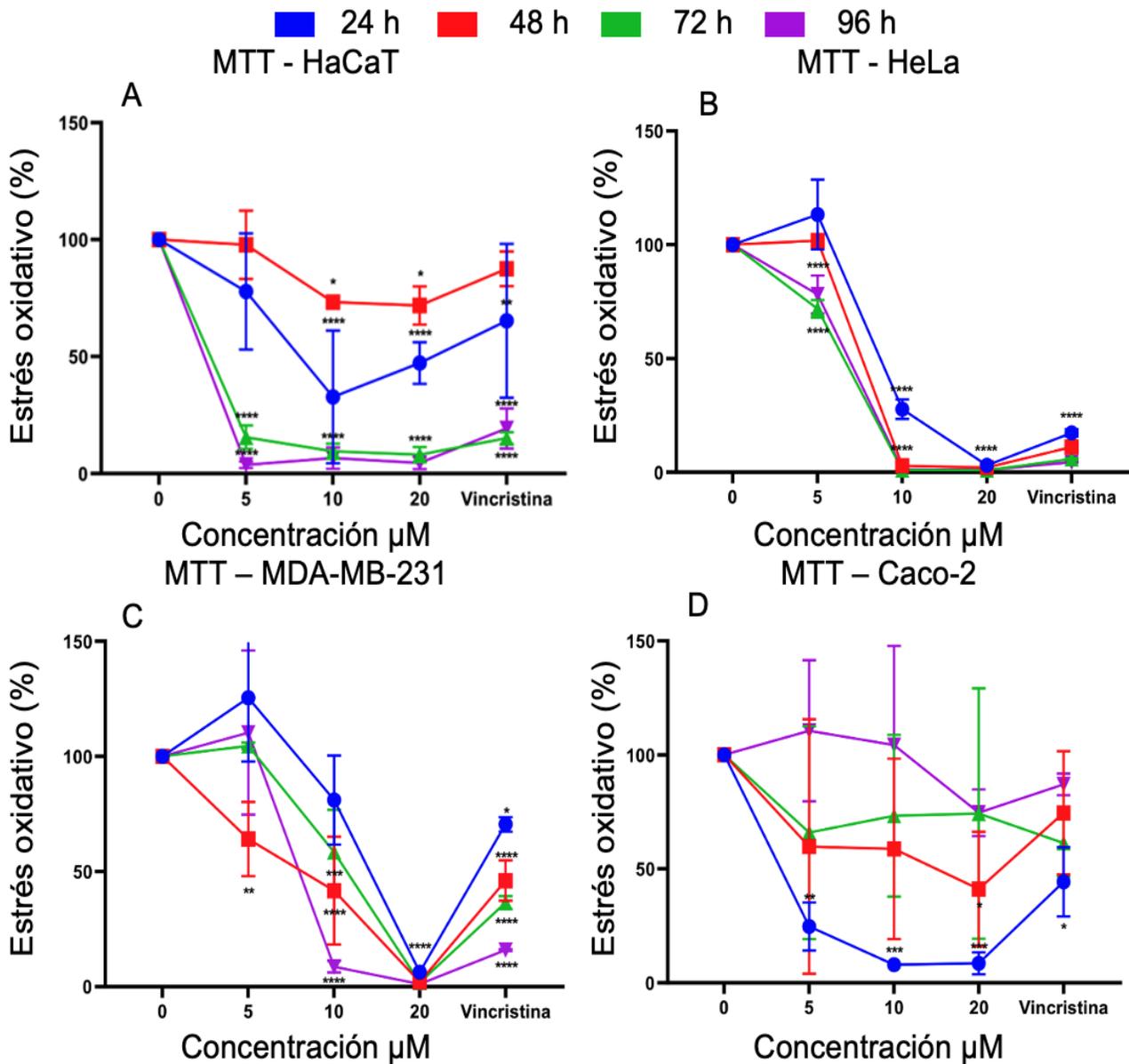


Figura 36. Comportamiento celular contra diferentes concentraciones de CBD mediante el ensayo MTT. Se presentan comparaciones de los efectos de CBD en las líneas celulares: HaCaT (A), HeLa (B), MDA-MB-231 (C), Caco-2 (D) después de la exposición a CBD durante 24 h (azul), 48 h (rojo), 72 h (verde) y 96 h (rosa). Los gráficos muestran el % de área en función de las concentraciones de CBD. *p < 0.05, prueba de comparación múltiple de Tukey frente a células tratadas con vehículo.

7.5 Determinación de la dosis media inhibitoria (IC₅₀) de CBD en las líneas celulares cancerígenas.

A través de los resultados obtenidos por el ensayo de MTT se demostró en las cuatro líneas celulares que el CBD redujo la viabilidad celular, permitiéndonos calcular las concentraciones de IC₅₀ de cada línea celular en los diferentes tiempos, las cuales se exponen en la figura 7 y se resumen en la tabla 6.

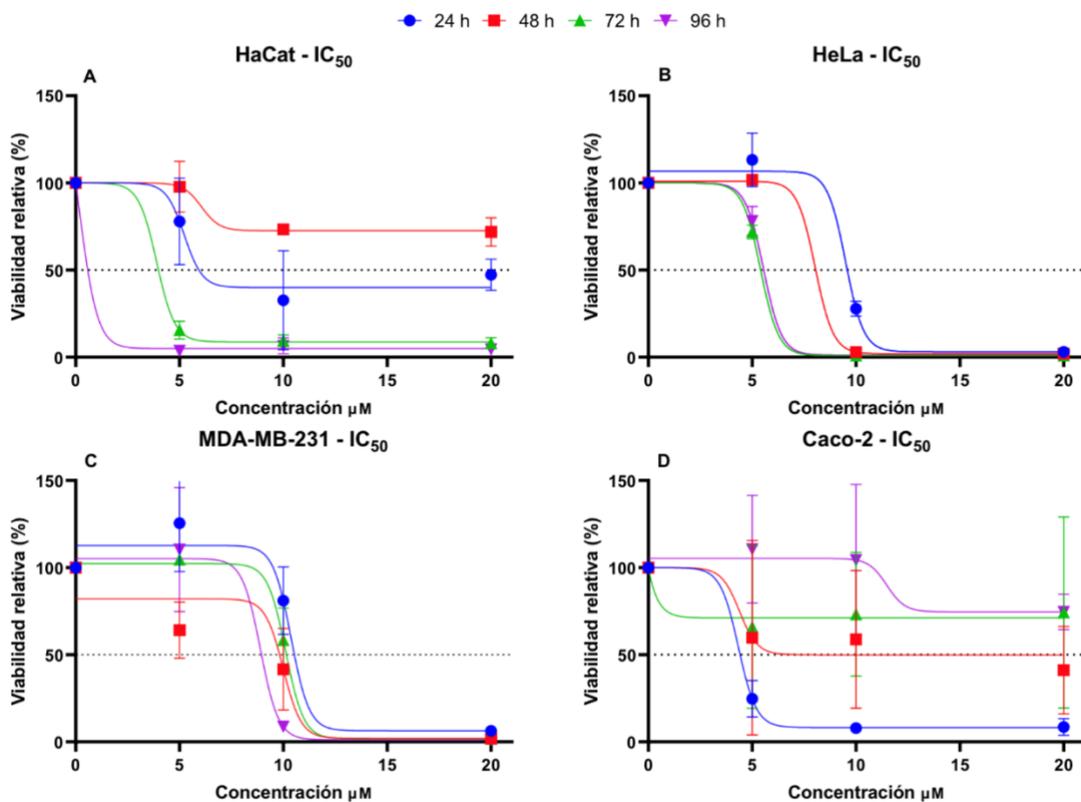


Figura 37. El cannabidiol (CBD) reduce la viabilidad de las células cancerígenas. Respuestas a la dosis de viabilidad celular medidas por el ensayo MTT (eje y) y diferentes concentraciones de CBD que aumentan en el rango de 0 a 20 μM (eje x). Se presentan las IC₅₀ de las dosis respuesta de los efectos de CBD en las líneas celulares: HaCaT (A), HeLa (B), MDA-MB-231 (C), Caco-2 (D) después de la exposición a CBD durante 24 h (línea azul), 48 h (línea roja), 72 h (línea verde) y 96 h (línea rosa). Los datos se expresan como media ± SEM (n = 3 experimentos biológicos independientes, cada uno con triplicados).

Tabla 6. Determinación de dosis media inhibitoria IC₅₀ por línea celular.

Línea celular	Tiempo	IC₅₀	SEM
HaCaT	24 h	5.233	0.417
	72 h	3.903	0.157
	96 h	0.183	1.525
HeLa	24 h	9.495	0.157
	48 h	8.034	0.555
	72 h	5.400	0.029
	96 h	5.547	0.074
MDA-MB-231	24 h	10.373	0.248
	48 h	9.993	0.292
	72 h	10.110	0.105
	96 h	8.893	0.848
Caco-2	24 h	4.340	0.122
	48 h	4.389	1.299

7.6 TIPO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR CBD.

Con la finalidad de analizar el tipo de muerte celular que induce el CBD en las líneas celulares HaCaT, HeLa, MDA-MB-231 y Caco-2, al utilizar el kit comercial (Abcam, cat. ab176749) para detección de apoptosis/necrosis mediante el análisis por citometría de flujo, se obtuvieron los siguientes resultados. Las figuras 38, 39, 40 y 41 muestran los gráficos de puntos representativos de las líneas celulares HaCaT, HeLa, MDA-MB-231 y Caco-2 respectivamente.

En la figura 38 se muestran los gráficos de puntos obtenidos mediante citometría de flujo de la línea celular HaCaT.

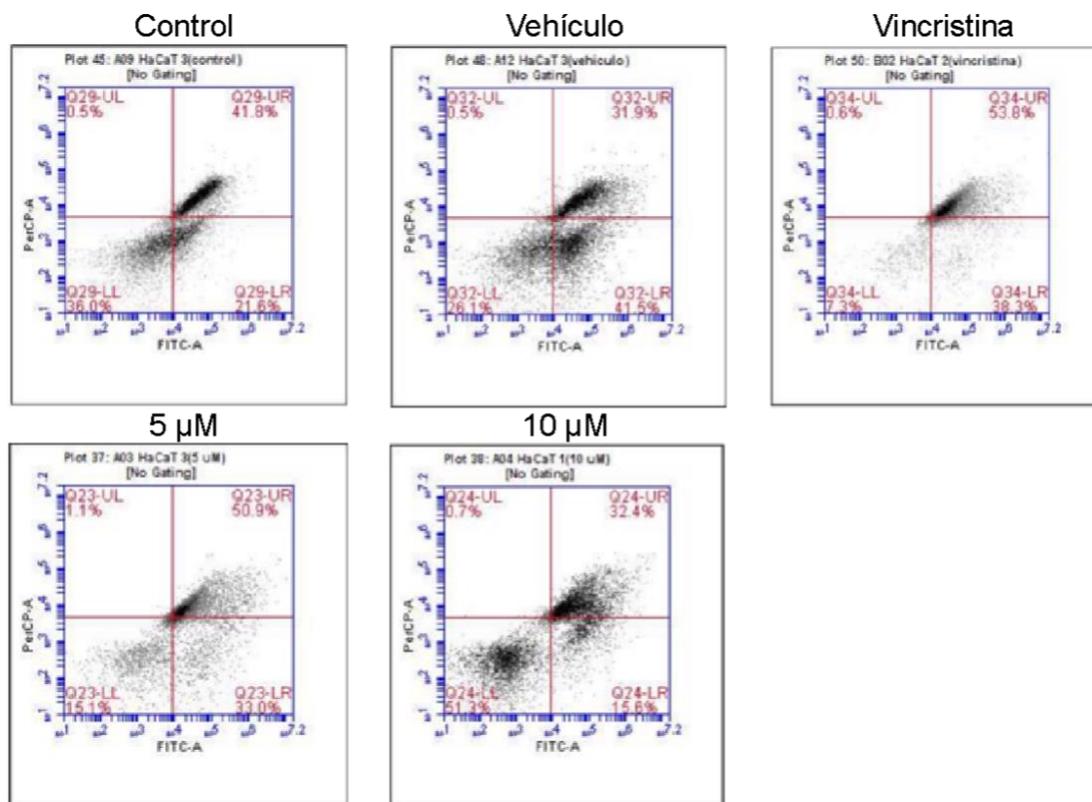


Figura 38. Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apopxin green mediante citometría de flujo en células HaCaT estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. El cuadrante inferior izquierdo muestra las células viables, el cuadrante inferior derecho muestra las células en apoptosis, el cuadrante superior derecho muestra las células en apoptosis tardía y el cuadrante superior izquierdo muestra las células en necrosis.

Los gráficos de puntos obtenidos mediante citometría de flujo con la línea celular HeLa, se exponen en la figura 39.

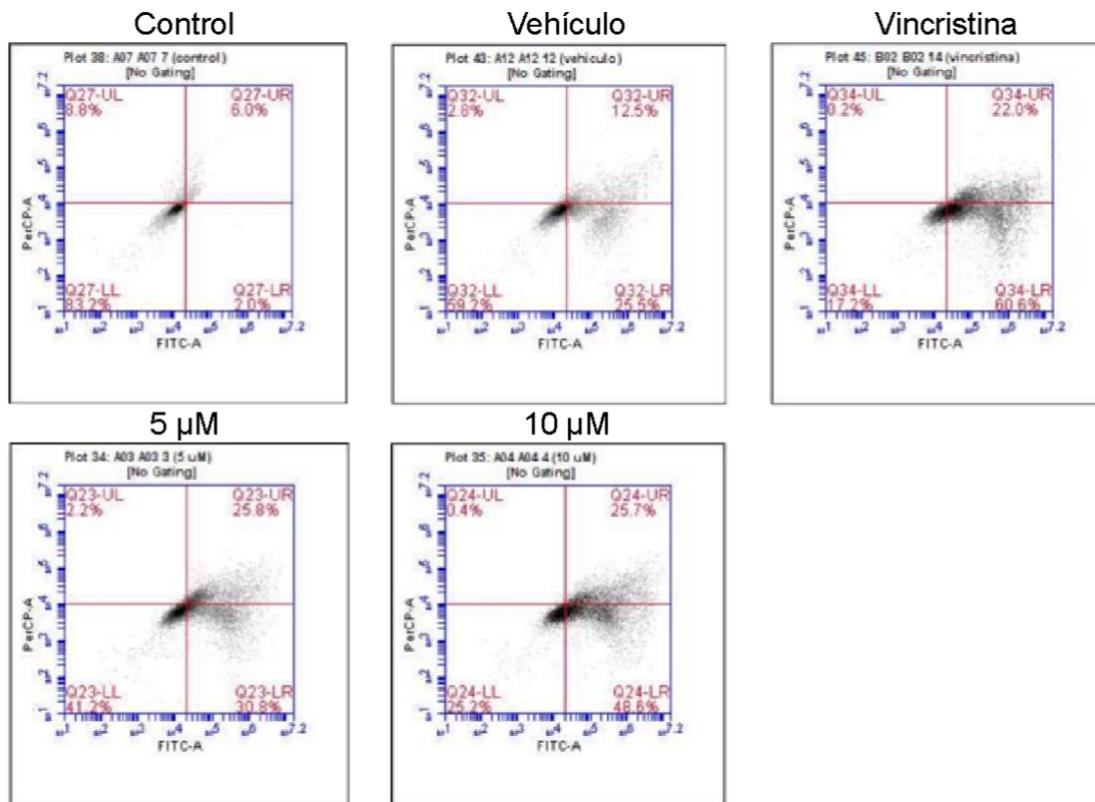


Figura 39. Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apoxin green mediante citometría de flujo en células HeLa estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. El cuadrante inferior izquierdo muestra las células viables, el cuadrante inferior derecho muestra las células en apoptosis, el cuadrante superior derecho muestra las células en apoptosis tardía y el cuadrante superior izquierdo muestra las células en necrosis.

Los gráficos de puntos obtenidos mediante citometría de flujo de la línea celular MDA-MB-231, es exponen en la figura 40.

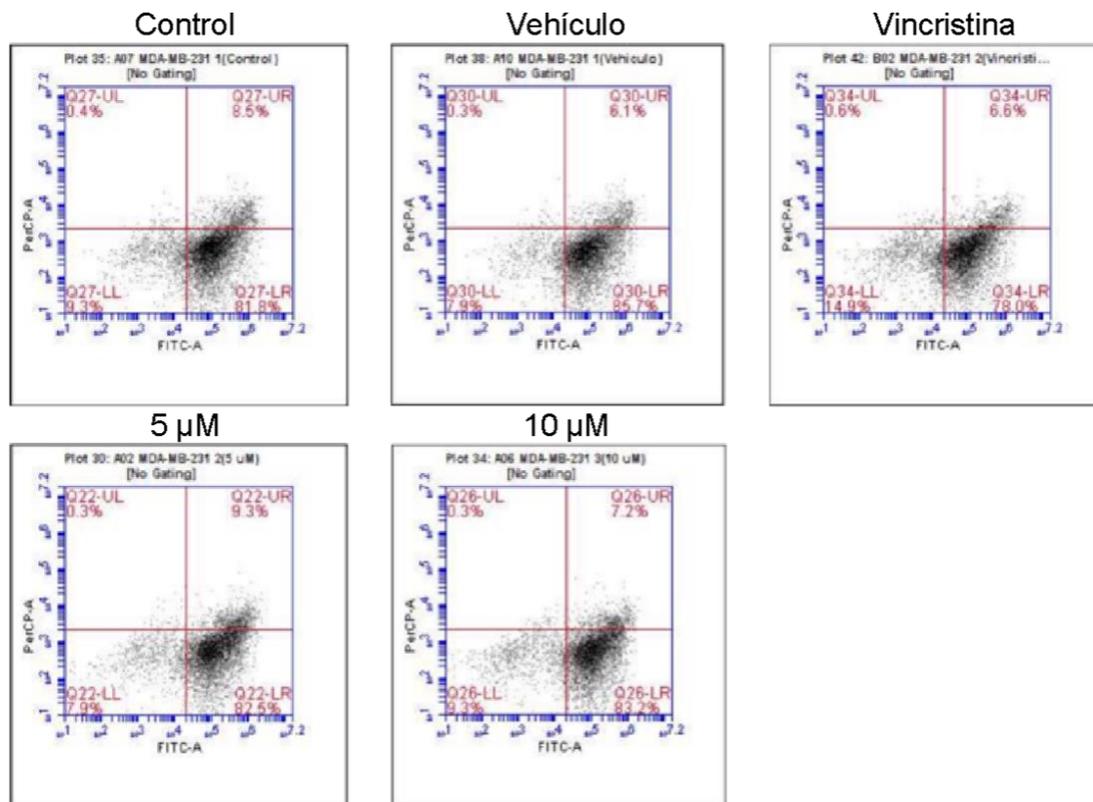


Figura 40. Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apoxin green mediante citometría de flujo en células MDA-MB-231 estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. El cuadrante inferior izquierdo muestra las células viables, el cuadrante inferior derecho muestra las células en apoptosis, el cuadrante superior derecho muestra las células en apoptosis tardía y el cuadrante superior izquierdo muestra las células en necrosis.

Los gráficos de puntos obtenidos mediante citometría de flujo de la línea celular Caco-2, se exponen en la figura 41.

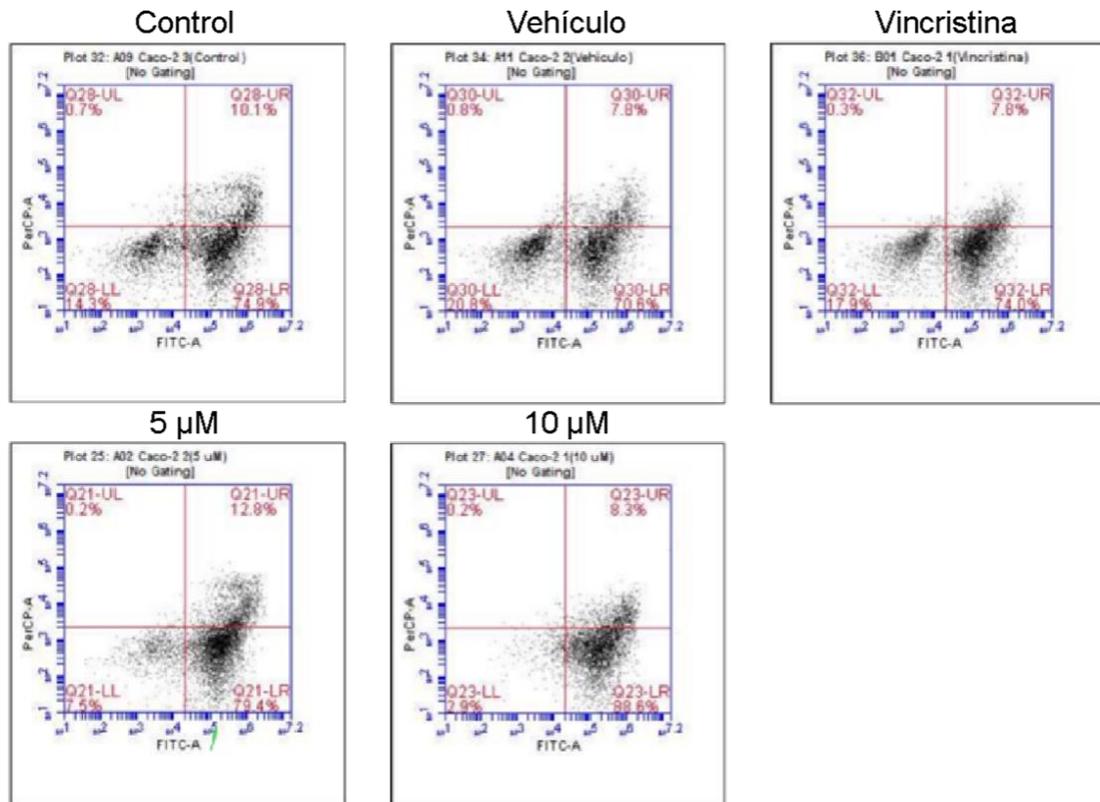


Figura 41. Análisis del tipo de muerte celular con 7-AAD y apoxin green mediante citometría de flujo en células Caco-2 estimuladas con concentraciones de CBD y controles durante 24 horas. El cuadrante inferior izquierdo muestra las células viables, el cuadrante inferior derecho muestra las células en apoptosis, el cuadrante superior derecho muestra las células en apoptosis tardía y el cuadrante superior izquierdo muestra las células en necrosis.

Se muestran los porcentajes del ensayo apoptosis necrosis, obtenidos del análisis por citometría de flujo en la tabla 7.

Tabla 7. Tipo de muerte celular inducido por la administración de 5 y 10 μM de CBD y controles, a las 24 horas en las líneas celulares.

Citometría					
	Concentración	Viable	Apoptosis	Tardía	Necrosis
HaCaT	Control	38.87%	18.16%	42.28%	0.68%
	Vehículo	26.42%	35.38%	37.68%	0.51%
	5 μM	17.91%	29.54%	51.05%	1.49%
	10 μM	48.07%	22.30%	28.79%	0.85%
	Control positivo	7.53%	41.56%	50.35%	0.56%
HeLa	Control	80.99%	4.20%	7.11%	7.70%
	Vehículo	60.66%	22.86%	13.30%	3.18%
	5 μM	45.23%	28.01%	24.52%	2.24%
	10 μM	24.37%	52.87%	22.38%	0.38%
	Control positivo	22.10%	56.47%	20.90%	0.53%
MDA-MB-231	Control	9.40%	79.70%	10.48%	0.41%
	Vehículo	8.87%	82.71%	7.98%	0.44%
	5 μM	7.41%	82.68%	9.53%	0.38%
	10 μM	8.24%	81.78%	9.68%	0.31%
	Control positivo	12.56%	80.74%	6.23%	0.48%
Caco-2	Control	14.62%	75.26%	9.67%	0.45%
	vehículo	20.42%	70.36%	8.48%	0.75%
	5 μM	7.60%	79.19%	12.90%	0.32%
	10 μM	3.05%	87.36%	9.26%	0.33%
	Control positivo	15.26%	75.63%	8.81%	0.30%

8. DISCUSIÓN

Al observar a microscopía óptica los cambios morfológicos en las líneas cancerígenas después de la aplicación del CBD y los controles, notamos una contracción de la membrana, ocasionando una forma redondeada, relacionado con una disminución de la adherencia celular, seguido de la formación de ampollas en membrana, proyecciones equinoides de superficie delgada, formación de vesículas y pérdida de la adherencia celular, previamente descritos por Collins y colaboradores en 1997, eventos relacionados con estrés y muerte celular por apoptosis. Estos cambios morfológicos también se reportaron en otras investigaciones, utilizando CBD como estímulo, en células HeLa (Ramer et al., 2010), en la línea MDA-MB-231 (Sultan et al., 2018), a diferencia de las investigaciones anteriores, en las células Caco-2 (Aviello et al., 2012; Borrelli et al., 2014), no expusieron los cambios morfológicos en fotomicroscopias, pero sí demostraron el efecto citotóxico del CBD en la línea Caco-2. A diferencia de las líneas cancerígenas, las células HaCaT también demostraron cambios morfológicos relacionados con estrés, muerte celular y algunas células conservan su morfología normal, en investigaciones anteriores no se observó este efecto (Petrosino et al., 2018; Sangiovanni et al., 2019; Li et al., 2022).

El análisis del efecto citotóxico en las células cancerígenas se evaluó mediante la actividad metabólica celular por la reducción del reactivo MTT (Ghasemi et al., 2021). Tras exponer las células HeLa a las diferentes concentraciones de CBD durante 24 h, pudimos calcular una IC_{50} de 9.49 μM , esta concentración es similar a la que reportaron Luckele y Motadi en 2016 quienes obtuvieron una IC_{50} de 10 μM de CBD en células HeLa tratadas durante 24 h, lo anterior proporciona más evidencia del efecto citotóxico y consistencia en la IC_{50} calculada en esta línea celular. Por otra parte, con la línea MDA-MB-231 determinamos una IC_{50} de 10.37 μM de CBD, a diferencia de Sultan y colaboradores en 2018, que reportaron una IC_{50} 2.2 μM de CBD, lo que nos sugiere un efecto citotóxico utilizando concentraciones menores a la IC_{50} calculada en células MDA-MB-231.

Los resultados obtenidos con células Caco-2 se pueden discutir con los mencionados por Aviello et al. (2012) expusieron una citotoxicidad significativa en la línea Caco-2, al tratarlas con 10 μM de CBD durante 24 h, pero no observaron efectos significativos a menor concentración, nosotros obtuvimos diferencias estadísticamente significativas utilizando 5, 10 y 20 μM de CBD, además pudimos calcular una IC_{50} de 4.34 μM . Por otra parte, Borrelli et al. (2014) demostraron un efecto citotóxico utilizando 10 y 30 μM , además hay que destacar que a 3 μM no observaron este efecto. Lo anterior nos sugiere que la concentración citotóxica de CBD no debe ser menor a nuestra IC_{50} calculada de 4.34 μM en células Caco-2. En cuanto a la línea HaCaT, no observamos diferencias al utilizar 5 μM de CBD a las 24 y 48 h, pero con las concentraciones de 10 y 20 μM demostraron un efecto citotóxico estadísticamente significativo, lo que nos permitió calcular una IC_{50} de 5.23 μM a las 24 h. Estos resultados son similares a los reportados por Sangiovanni et al. (2019); No observó un efecto citotóxico utilizando concentraciones de 0.05 – 5 μM de CBD. Nuestros resultados difieren con lo mencionado por Petrocino et al. (2018), ya que menciona no haber observado un efecto citotóxico al utilizar 10 y 20 μM durante 24 horas. Lo anterior nos sugiere un efecto citoprotector al utilizar concentraciones bajas de CBD en un lapso de 24 h.

Con la finalidad de observar los cambios morfológicos nucleares relacionados con muerte celular, se realizó el marcaje nuclear con el colorante fluorescente DAPI. Observamos una intensificación de la señal de fluorescencia en núcleos con cromatina condensada, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, estas características se relacionan con apoptosis. Además, se observó una disminución de la señal de fluorescencia, relacionado con la baja viabilidad celular (Collins et al., 1997; Crowley et al., 2016). Dichos cambios morfológicos también se reportaron en células HeLa (Lukhele & Motadi, 2016), en MDA-MB-231 (D'Aloia et al., 2022) y en células Caco-2 (Williams Nkune et al., 2022). Con respecto a la línea HaCaT no se han documentado cambios

morfológicos nucleares utilizando como estímulo CBD (Petrosino et al., 2018; Sangiovanni et al., 2019; Li et al., 2022).

Al analizar los resultados obtenidos en el ensayo apoptosis/necrosis con las líneas celulares podemos discutir lo siguiente, obtuvimos un 52.8 % de apoptosis temprana después de exponer a las células HeLa durante 24 horas a una concentración de 10 μM de CBD, resultados similares a los reportados por Lukhele y Motadi en 2016 quienes obtuvieron un 43.3% de apoptosis con la misma concentración y línea celular. Lo anterior sugiere que el tipo de muerte celular que induce el CBD en células HeLa es apoptosis. Además, con una concentración de 5 μM obtuvimos un 28.0 % de apoptosis temprana, 24.5 % de apoptosis tardía y 2.24 % de necrosis, estos resultados los podemos discutir con la investigación de Razlog et al. (2023), reportaron que al utilizar 0.5 μM obtuvieron un 10.0 % de apoptosis temprana, 38.0 % de apoptosis tardía y 6% de necrosis, estos hallazgos nos sugieren que a mayor concentración de CBD hay una mayor inducción de apoptosis temprana y se disminuye la necrosis.

En cuanto a los resultados obtenidos con la línea MDA-MB-231 tras exponerlas durante 24 h a la concentración de 5 μM de CBD, conseguimos un 82.6 % de apoptosis y con 10 μM de CBD un 81.7 % de apoptosis, estos resultados se pueden comparar con los conseguidos por Shrivastava y colaboradores en 2011, ellos reportaron que al utilizar una concentración de 5 μM de CBD se provoca un 40 % de apoptosis y con 10 μM de CBD un 90 % de apoptosis. Lo anterior sugiere que el CBD en esta línea celular causa un mayor porcentaje de apoptosis, sin un efecto dosis dependiente, esto se puede deber a los diferentes mecanismos que induce el CBD en la muerte celular, como la autofagia (Shrivastava et al., 2011) o la muerte burbujeante, un proceso irreversible, en el cual la apoptosis se detiene, para comenzar con la formación de óxido nítrico en el núcleo, provocando una burbuja de gas nuclear la cual incrementa su tamaño y se libera a la superficie celular provocando la muerte de la célula (D'Aloia et al., 2022).

Referente a los resultados obtenidos con la línea Caco-2, al tratarlas con 5 μM de CBD se indujo un 79.1 % de apoptosis y con 10 μM un 87.0% de apoptosis. Estos resultados los podemos discutir con los reportados por NKune et al. (2022), quienes utilizaron 1 μM de CBD durante 24 h en células Caco-2 induciendo 44% de apoptosis. Esto nos sugiere que a mayor concentración hay una mayor inducción de apoptosis y demuestra la actividad citotóxica desde concentraciones mucho menores.

En contraste con las líneas cancerígenas, las células HaCaT con la concentración de 5 μM de CBD se obtuvo 29.5 % de apoptosis y 51.0 % de apoptosis tardía, además con 10 μM se registró 22.3 % de apoptosis y 28.7 % de apoptosis tardía, los datos anteriores son diferentes a lo que reporta Sangiovanni et al. (2019), en su investigación irradiaron las células con luz ultravioleta y posteriormente trataron con 8 μM de CBD durante 24 h, reportaron una inducción de apoptosis de 3.38 % y apoptosis tardía de 8.3 %. Lo mencionado anteriormente sugiere un efecto contrario al que nosotros observamos, hasta la fecha no hay estudios con condiciones y concentraciones con las que podamos comparar nuestro trabajo. Cabe mencionar que se debería analizar este efecto en un lapso de 48 horas debido al efecto observado en el ensayo de MTT y evaluar si hay diferencias en los porcentajes de inducción de apoptosis. Los mecanismos por los cuales actúa el CBD en la línea HaCaT aún no están definidos, debido a que solo se han estudiado sus mecanismos proliferativos (Sangiovanni et al., 2019; Casares et al., 2020), el CBD aumenta los niveles de calcio citosólico mediante TRPV1 (Almeida y Devi, 2020), además se menciona un aumento de la anandamida al estimular células HaCaT con CBD (Petrosino et al., 2018), altas concentraciones de anandamida pueden activar TRPV1 (Diniz et al., 2019), el calcio citosólico puede ser utilizado por el receptor VDCA1 el cual se encuentra en las mitocondrias y también se reportó su expresión en células HaCaT (Arif et al., 2014), se menciona un efecto de señalización del CBD mediante VDCA1, el cual causa el aumento del calcio al espacio intermembrana de la mitocondria, al alcanzar cierta concentración micromolar se activa el

uniportador de calcio mitocondrial, provocando la sobrecarga de calcio en la matriz mitocondrial, posteriormente se genera la formación del poro de transición mitocondrial generando la despolarización de la membrana mitocondrial interna, disfunción mitocondrial y muerte celular (Olivas et al., 2019).

9. CONCLUSIONES

Los cambios morfológicos observados en las fotos microscópicas de contraste de fase, así como los cambios nucleares observados en las líneas celulares cancerígenas indican que el CBD ejerce un efecto citotóxico.

Al mismo tiempo, el tipo de muerte celular que induce el CBD con concentraciones de 5 y 10 μM en líneas celulares cancerígenas expuestas durante 24 h es apoptosis, mientras que en células normales causó apoptosis tardía.

En la línea celular HeLa y Caco-2 podemos observar un efecto que depende de la dosis del CBD. Por otra parte, la línea MDA-MB-231 no mostró esta respuesta.

10. PERSPECTIVA

En base a todo el trabajo realizado se podría continuar con la investigación, realizando ensayos de hemólisis para determinar si las concentraciones que utilizamos de CBD no causan la lisis de los eritrocitos, se debería evaluar el efecto citotóxico en células de riñón humano, cardiomiocitos y hepatocitos como controles normales, evaluar sus efectos en modelos murinos por vía oral o directamente en el tumor, así como su aplicación intravenosa en ratas. Por otra parte, también se podrían analizar las concentraciones de calcio intracitoplasmáticas y mitocondriales, después de estimular las líneas celulares con CBD. Además, se podría hacer uso de antagonistas de los receptores que se sospechan son las causantes de provocar los mecanismos de muerte celular para así aclarar las vías de señalización. Queda por mencionar que se debería analizar el efecto citotóxico en líneas celulares de perro ya que actualmente se menciona como modelo ideal para el estudio del cáncer.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, C. F., Teixeira, N., Correia-Da-silva, G., & Amaral, C. (2022). Cannabinoids in breast cancer: Differential susceptibility according to subtype. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27010156>
- Antonio Martínez-Carpio, P., Ángel, M., & Moreno, N. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama REVISIONES INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR: ASPECTOS TÉCNICOS Y CONCEPTUALES. In *Rev Oncol* (Vol. 5, Issue 4).
- Arif, T., Vasilkovsky, L., Refaely, Y., Konson, A., & Shoshan-Barmatz, V. (2014). Silencing VDAC1 expression by siRNA inhibits cancer cell proliferation and tumor growth in vivo. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 3, e159. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.9>
- Atalay, S., Jarocka-karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2020). Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. In *Antioxidants* (Vol. 9, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>
- Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Di Marzo, V., & Izzo, A. A. (2012). Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 90(8), 925–934. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0856-x>
- Baswan, S. M., Klosner, A. E., Glynn, K., Rajgopal, A., Malik, K., Yim, S., & Stern, N. (2020). Therapeutic potential of cannabidiol (CBD) for skin health and disorders. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 13, 927–942. <https://doi.org/10.2147/CCID.S286411>
- Becerra, N. A., Espinosa-Bustos, C., Vázquez, K., Rivera, G., Paulino, M., Cantero, J., Noguera, B., Chacón-Vargas, F., Castillo-Velazquez, U., Rodríguez, A. F. E., Toledo, S., Moreno-Rodríguez, A., Aranda, M., & Salas, C. O. (2021). Expanding

the chemical space of aryloxy-naphthoquinones as potential anti-Chagasic agents: synthesis and trypanosomicidal activity. *Medicinal Chemistry Research*, 30(12), 2256–2265. <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02809-3>

Ben-Ami Shor, D., Hochman, I., Gluck, N., Shibolet, O., & Scapa, E. (2022). The Cytotoxic Effect of Isolated Cannabinoid Extracts on Polypoid Colorectal Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911366>

Borrelli, F., Pagano, E., Romano, B., Panzera, S., Maiello, F., Coppola, D., De Petrocellis, L., Buono, L., Orlando, P., & Izzo, A. A. (2014). Colon carcinogenesis is inhibited by the TRPM8 antagonist cannabigerol, a Cannabis-derived non-psychoactive cannabinoid. *Carcinogenesis*, 35(12), 2787–2797. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu205>

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. <http://rupress.org/jcb/article-pdf/106/3/761/1461052/761.pdf>

Britch, S. C., Babalonis, S., & Walsh, S. L. (2021). Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. In *Psychopharmacology* (Vol. 238, Issue 1, pp. 9–28). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05712-8>

Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. J. (1978). LONG-TERM HUMAN BREAST CARCINOMA CELL LINES OF METASTATIC ORIGIN: PRELIMINARY CHARACTERIZATION. In *IN VITRO* (Vol. 14, Issue 11)

Casares, L., García, V., Garrido-Rodríguez, M., Millán, E., Collado, J. A., García-Martín, A., Peñarando, J., Calzado, M. A., de la Vega, L., & Muñoz, E. (2020). Cannabidiol induces antioxidant pathways in keratinocytes by targeting BACH1. *Redox Biology*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101321>

- Centro de prensa. (2017). OMS Cáncer. Recuperado de 23 de marzo del 2023 de <https://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Centros para el control y la prevención de enfermedades. (2023). ¿Qué es el cáncer de mama?. Recuperado el 3 de septiembre del 2023, de https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm
- Chavez, K. J., Garimella, S. V., & Lipkowitz, S. (2010). Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*, 32(1–2), 35–48. <https://doi.org/10.3233/BD-2010-0307>
- Chávez-lópez, M. de G., Zúñiga-garcía, V., Castro-magdonel, B. E., Vera, E., Garrido, E., Sánchez-ramos, J., Ponce-castañeda, M. V., Cabrera-muñoz, M. de L., Escobar, Y., Ortiz, C. S., Hernández-gallegos, E., Avalos-fuentes, A., & Camacho, J. (2020). Eag1 gene and protein expression in human retinoblastoma tumors and its regulation by pRb in HeLa cells. *Genes*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/genes11020119>
- Cherkasova, V., Wang, B., Gerasymchuk, M., Fiselier, A., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2022). Use of Cannabis and Cannabinoids for Treatment of Cancer. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14205142>
- ChemDraw. ChemDraw Ultra 12.0. PerkinElmer Inc. 2010. Recuperado de <https://revvitysignals.com/products/research/chemdraw>
- Collins, J. A., Schandl, C. A., Young, K. K., Vesely, J., & Willingham, M. C. (1997). Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. In *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* (Vol. 45, Issue 7).
- Contassot, E., Tenan, M., Schnüriger, V., Pelte, M. F., & Dietrich, P. Y. (2004). Arachidonyl ethanolamide induces apoptosis of uterine cervix cancer cells via aberrantly expressed vanilloid receptor-1. *Gynecologic Oncology*, 93(1), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2003.12.040>

- Crowley, L., Marfell, B., & Waterhouse, N. (2016). *Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- D'Aloia, A., Ceriani, M., Tisi, R., Stucchi, S., Sacco, E., & Costa, B. (2022). Cannabidiol Antiproliferative Effect in Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Is Modulated by Its Physical State and by IGF-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/ijms23137145>
- Dass, S. A., Tan, K. L., Rajan, R. S., Mokhtar, N. F., Adzmi, E. R. M., Rahman, W. F. W. A., Din, T. A. D. A. A. T., & Balakrishnan, V. (2021). Triple negative breast cancer: A review of present and future diagnostic modalities. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 57, Issue 1, pp. 1–18). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina57010062>
- Delgado, A. J. M., Velázquez, U. C., González, J. G. B., Montes, A. C., Villarreal, S. M. L., García, L. E. V., Casas, R. M. S., & Luis, O. E. R. (2020). Evaluation of the Essential Oil of *Citrus paradisi* as an Alternative Treatment against *Candida albicans*; *Open Journal of Stomatology*, 10(09), 258–270. <https://doi.org/10.4236/ojst.2020.109025>
- Di Marzo, V., & Piscitelli, F. (2015). The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. In *Neurotherapeutics* (Vol. 12, Issue 4, pp. 692–698). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0374-6>
- Diniz, C. R. A. F., Biojone, C., Joca, S. R. L., Rantamäki, T., Castrén, E., Guimarães, F. S., & Casarotto, P. C. (2019). Dual mechanism of TRKB activation by anandamide through CB1 and TRPV1 receptors. *PeerJ*, 2019(2). <https://doi.org/10.7717/peerj.6493>
- Garza-Cervantes, J. A., Ramos-González, M., Lozano, O., Jerjes-Sánchez, C., & García-Rivas, G. (2020). Therapeutic Applications of Cannabinoids in Cardiomyopathy and Heart Failure. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/4587024>

Garza, G. R. C., Luévano, J. H. E., Rodríguez, A. F. B., Montes, A. C., Hernández, R. A. P., Delgado, A. J. M., Villarreal, S. M. L., Rodríguez, J. R., Casas, R. M. S., Velázquez, U. C., & Rodríguez Luis, O. E. (2021). Benefits of cardamom (*Elettaria cardamomum* (L.) maton) and turmeric (*curcuma longa* L.) extracts for their applications as natural anti-inflammatory adjuvants. *Plants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/plants10091908>

Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

Globocan (2020) All cancers. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet-pdf> el 12 de abril del 2023.

Globocan (2020) Mexico Source. Recuperado de <https://gco.iarc.fr/today/data/facsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf> el 12 de abril del 2023.

Good, P., Haywood, A., Gogna, G., Martin, J., Yates, P., Greer, R., & Hardy, J. (2019). Oral medicinal cannabinoids to relieve symptom burden in the palliative care of patients with advanced cancer: A double-blind, placebo controlled, randomised clinical trial of efficacy and safety of cannabidiol (CBD). *BMC Palliative Care*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12904-019-0494-6>

Gorelick, J., Assa-Glazer, T., Zandani, G., Altberg, A., Sela, N., Nyska, A., & Madar, Z. (2022). THC and CBD affect metabolic syndrome parameters including microbiome in mice fed high fat-cholesterol diet. *Journal of Cannabis Research*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00137-w>

Gregory Editor, C. (n.d.). *Advances in Experimental Medicine and Biology 930 Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy New Perspectives and Opportunities*. <http://www.springer.com/series/5584>

- Guleria, K., Sambyal, V. (2023). Genética del cáncer: pasado, presente y futuro. En: Sobti, RC, Ganguly, NK, Kumar, R. (eds) Manual de oncobiología: de las ciencias básicas a las clínicas. Springer, Singapur. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2196-6_8-1
- Guillén-Meléndez, G. A., Villa-Cedillo, S. A., Pérez-Hernández, R. A., Castillo-Velázquez, U., Salas-Treviño, D., Saucedo-Cárdenas, O., Montes-De-oca-luna, R., Gómez-Tristán, C. A., Garza-Arredondo, A. J., Zamora-Ávila, D. E., Loera-Arias, M. de J., & Soto-Domínguez, A. (2021). Cytotoxic effect in vitro of acalypha monostachya extracts over human tumor cell lines. *Plants*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/plants10112326>
- Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. In *Trends in Plant Science* (Vol. 25, Issue 10, pp. 985–1004). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Hanselmann, R. G., & Welter, C. (2022). Origin of Cancer: Cell work is the Key to Understanding Cancer Initiation and Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.787995>
- Hu, C., Liu, T., Han, C., Xuan, Y., Jiang, D., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Xu, Y., Liu, Y., Pan, J., Wang, J., Fan, J., Che, Y., Huang, Y., Zhang, J., Ding, J., Yang, S., & Yang, K. (2022). HPV E6/E7 promotes aerobic glycolysis in cervical cancer by regulating IGF2BP2 to stabilize m6A-MYC expression. *International Journal of Biological Sciences*, 18(2), 507–521. <https://doi.org/10.7150/ijbs.67770>
- Huguet, E., McMahon, J., & McMahon, A. (1994). Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/54/10/2615>
- Jeong, S., Yun, H. K., Jeong, Y. A., Jo, M. J., Kang, S. H., Kim, J. L., Kim, D. Y., Park, S. H., Kim, B. R., Na, Y. J., Lee, S. Il, Kim, H. Do, Kim, D. H., Oh, S. C., & Lee, D. H. (2019). Cannabidiol-induced apoptosis is mediated by activation of

- Noxa in human colorectal cancer cells. *Cancer Letters*, 447, 12–23.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.011>
- Kay, J. G., & Grinstein, S. (2011). Sensing phosphatidylserine in cellular membranes. In *Sensors* (Vol. 11, Issue 2, pp. 1744–1755).
<https://doi.org/10.3390/s110201744>
- Kis, B., Ifrim, F. C., Buda, V., Avram, S., Pavel, I. Z., Antal, D., Paunescu, V., Dehelean, C. A., Ardelean, F., Diaconeasa, Z., Soica, C., & Danciu, C. (2019). Cannabidiol—from plant to human body: A promising bioactive molecule with multi-target effects in cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20235905>
- Kisková, T., Mungenast, F., Suváková, M., Jäger, W., & Thalhammer, T. (2019). Future aspects for cannabinoids in breast cancer therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20071673>
- Kutchera, W., Jones, D. A., Matsunami, N., Grodent, J., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Whitet, R. L., & Prescott, S. M. (1996). Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: Evidence for a transcriptional effect. In *Medical Sciences* (Vol. 93). <https://www.pnas.org>
- Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusenig, N., Rogan, E. M., & Harris, C. C. (1993). Accelerated paper p53 Mutations in human immortalized epithelial cell lines (Vol. 14, Issue 5).
- Leoni, B. D., Natoli, M., Nardella, M., Bucci, B., Zucco, F., D'Agnano, I., & Felsani, A. (2012). Differentiation of Caco-2 cells requires both transcriptional and post-translational down-regulation of Myc. *Differentiation*, 83(3), 116–127.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.10.005>

- Li, J., Ma, X., Chakravarti, D., Shalpour, S., & Depinho, R. A. (2021). Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. <https://doi.org/10.1101/gad.348226>
- Li, Y., Hao, D., Wei, D., Xiao, Y., Liu, L., Li, X., Wang, L., Gan, Y., Yan, W., Ke, B., & Jiang, X. (2022). Photoprotective Effects of Cannabidiol against Ultraviolet-B-Induced DNA Damage and Autophagy in Human Keratinocyte Cells and Mouse Skin Tissue. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196740>
- Luis Sanjurjo-García, J. (2011). Pólipos y cáncer de colon. In *Revista de Gastroenterología de México*. www.elsevier.es ■ Oncología
- Lukhele, S. T., & Motadi, L. R. (2016). Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1280-0>
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 74–88). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- May E, Jenkins JR, May P. Endogenous HeLa p53 proteins are easily detected in HeLa cells transfected with mouse deletion mutant p53 gene. *Oncogene*. 1991 Aug;6(8):1363-5. PMID: 1886712.
- Mechoulam, R., Fride, E., & Marzo, V. Di. (1998). Endocannabinoids. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 359).
- Mechoulam, R., y Shvo, Y. (1963). Hashish-I The structure of Cannabidiol'. In *Tetrahedron*. 1963 (Vol. 19).
- National Cancer Institute. (2022). ¿Qué es el cáncer? – Recuperado el 4 de diciembre del 2023, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

National Cancer Institute. (2022). Tipos de tratamiento del cáncer – Recuperado el 4 de diciembre del 2023, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>

National Cancer Institute. (2022). Tratamiento del cáncer de colon (PDQ) – Versión para pacientes. Recuperad el 10 de noviembre del 2023, de https://www.cancer.gov/espanol/tipos/colorrectal/paciente/tratamiento-colorrectal-pdq#_93

National Cancer Institute. (2023). ¿Qué es el cáncer de cuello uterino? – Recuperado el 8 de noviembre del 2023, de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino>

National Cancer Institute. (2024). PDQ Cannabis y cannabinoides. Bethesda, MD. – Recuperado el 4 de febrero del 2024, de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/mca/pro/cannabis-pdq>.

Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J. P., Tong, F., Speed, T., Spellman, P. T., DeVries, S., Lapuk, A., Wang, N. J., Kuo, W. L., Stilwell, J. L., Pinkel, D., Albertson, D. G., ... Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 10(6), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>

Olivas-Aguirre, M., Torres-López, L., Valle-Reyes, J. S., Hernández-Cruz, A., Pottosin, I., & Dobrovinskaya, O. (2019). Cannabidiol directly targets mitochondria and disturbs calcium homeostasis in acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death and Disease*, 10(10). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2024-0>

OMS, (2022) Temas de salud: Cáncer. Recuperado el 2 de diciembre del 2023 de <https://www.who.int/topics/cancer/es/>

- Organización Internacional de Normalización. (2009). Biological evaluation of medical devices-Tests for in vitro cytotoxicity (ISO-10993-5-2009). <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:10993:-5:ed-3:v1:en>
- Pal, A., & Kundu, R. (2020). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>
- Peng, J., Fan, M., An, C., Ni, F., Huang, W., & Luo, J. (2022). A narrative review of molecular mechanism and therapeutic effect of cannabidiol (CBD). In *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* (Vol. 130, Issue 4, pp. 439–456). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13710>
- Pepescu, N., DiPaolo, J., & Amsbaugh, S. (1987). 000132342. *Cytogenet Cell Genet*, 58–62.
- Petrosino, S., Verde, R., Vaia, M., Allará, M., Iuvone, T., & Di Marzo, V. (2018). Anti-inflammatory properties of cannabidiol, a nonpsychotropic cannabinoid, in experimental allergic contact dermatitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 365(3), 652–663. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.244368>
- Radwan, M. M., Chandra, S., Gul, S., & Elsohly, M. A. (2021). Cannabinoids, phenolics, terpenes and alkaloids of cannabis. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26092774>
- Ramachandran, D., & Dörk, T. (2021). Genomic risk factors for cervical cancer. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers13205137>
- Ramer, R., & Hinz, B. (2008). Inhibition of cancer cell invasion by cannabinoids via increased expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(1), 59–69. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm268>
- Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., & Hinz, B. (2010). Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1.

Biochemical Pharmacology, 79(7), 955–966.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.11.007>

Razlog, R., Kruger, C. A., & Abrahamse, H. (2022). Enhancement of Conventional and Photodynamic Therapy for Treatment of Cervical Cancer with Cannabidiol. In *Integrative Cancer Therapies* (Vol. 21). SAGE Publications Inc.
<https://doi.org/10.1177/15347354221092706>

Razlog, R., Kruger, C. A., & Abrahamse, H. (2023). Cytotoxic Effects of Combinative ZnPcS4 Photosensitizer Photodynamic Therapy (PDT) and Cannabidiol (CBD) on a Cervical Cancer Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms24076151>

Sangiovanni, E., Fumagalli, M., Pacchetti, B., Piazza, S., Magnavacca, A., Khalilpour, S., Melzi, G., Martinelli, G., & Dell'Agli, M. (2019). Cannabis sativa L. extract and cannabidiol inhibit in vitro mediators of skin inflammation and wound injury. *Phytotherapy Research*, 33(8), 2083–2093.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6400>

Schubert, M., Bauerschlag, D. O., Muallem, M. Z., Maass, N., & Alkatout, I. (2023). Challenges in the Diagnosis and Individualized Treatment of Cervical Cancer. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 59, Issue 5). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/medicina59050925>

Sholler, D. J., Schoene, L., & Spindle, T. R. (2020). Therapeutic Efficacy of Cannabidiol (CBD): a Review of the Evidence From Clinical Trials and Human Laboratory Studies. In *Current Addiction Reports* (Vol. 7, Issue 3, pp. 405–412). Springer. <https://doi.org/10.1007/s40429-020-00326-8>

Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E., & Prasad, A. (2011). Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(7), 1161–1172. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-1100>

- Silvestro, S., Schepici, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Molecular Targets of Cannabidiol in Experimental Models of Neurological Disease. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 21). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules25215186>
- Sultan, A. S., Marie, M. A., & Sheweita, S. A. (2018). Novel mechanism of cannabidiol-induced apoptosis in breast cancer cell lines. *Breast*, 41, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2018.06.009>
- Taylor, A. H., Tortolani, D., Ayakannu, T., Konje, J. C., & Maccarrone, M. (2021). (Endo)cannabinoids and gynaecological cancers. *Cancers*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.3390/cancers13010037>
- Thompson, S. L., & Compton, D. A. (2008). Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *Journal of Cell Biology*, 180(4), 665–672. <https://doi.org/10.1083/jcb.200712029>
- Williams Nkune, N., Kruger, C. A., & Abrahamse, H. (2022). Oncotarget 156 www.oncotarget.com Synthesis of a novel nanobioconjugate for targeted photodynamic therapy of colon cancer enhanced with cannabidiol. In *Oncotarget* (Vol. 13). www.oncotarget.com
- Winawer, S. J. (1999). *Natural History of Colorectal Cancer*.
- Zaiachuk, M., Pryimak, N., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2021). Cannabinoids, Medical Cannabis, and Colorectal Cancer Immunotherapy. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.713153>
- Zembruski, N. C. L., Stache, V., Haefeli, W. E., & Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, 429(1), 79–81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>