

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD IRAPUATO**

**DEPARTAMENTO DE  
BIOQUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Y**

**DEPARTAMENTO DE  
INGENIERIA GENÉTICA**

**El papel de las *N*-aciletanolamidas en la metilación del ADN inducida por el  
ácido araquidónico en células THP-1**

**Tesis que presenta:  
José Filimón Gonzaga Espíritu**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias**

con especialidad en  
**Biotechnología de plantas**

**Directores de Tesis**

Dra. Gertrud Lund

Dr. Jorge Molina Torres

Irapuato, Gto. México Abril, 2016

---

---



---

---

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitobioquímica del departamento de Biotecnología y Bioquímica, bajo la dirección del Dr. Jorge Molina Torres y en el laboratorio de Epigenética del departamento de Ingeniería Genética a cargo de la Dra. Gertrud Lund. Ambos departamentos pertenecen al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. Además, agradezco al Dr. Silvio Zaina del Departamento de Ciencias Médicas División de Ciencias Médicas y de la Salud en la Universidad de Guanajuato, Campus León.

---

---



---

---

## A G R A D E C I M I E N T O S .

Este trabajo no se habría podido realizar sin la generosa colaboración de muchas personas a quienes expreso mis más sinceros agradecimientos.

A la **Dra. Gertrud Lund y al Dr. Jorge Molina Torres, directores** de este trabajo, por sus valiosas guías, apoyos, consejos y sugerencias, y sobretodo darme la oportunidad de colaborar con ellos en este trabajo.

A la **Dr. Silvio Zaina** por su sincero apoyo y sus valiosas aportaciones en la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité revisor: a la **Dra. Mercedes G. López y al Dr. Raúl Álvarez Venegas**, por sus valiosas aportaciones, consejos y apoyo para enriquecer la calidad de este trabajo.

A los técnicos de laboratorio: **Dra. Yolanda Alvarado Caudillo, M.C. Enrique Ramírez Chávez** y la **BQ. Dalia Rodríguez**, por su ayuda y enseñanza en la parte experimental de este trabajo.

Al **M.C. Juan Vázquez Martínez y M.C. Guillermo A. Silva Martínez** por su ayuda en algunas metodologías y consejos técnicos durante los experimentos.

A **CONACyT** por el apoyo económico para la realización de esta investigación, a través del otorgamiento de la beca de posgrado.

A **CINVESTAV-IPN Campus Irapuato** por permitirme realizar mi estudio de posgrado y proporcionarme la beca de titulación.

---

---



---

---

## DEDICATORIA

A **Dios**, ese ente que la misma ciencia nos hace dudar de su existencia. Él nos brinda amor, sabiduría y felicidad diaria a nuestras vidas. Gracias por las alegrías brindadas, por mantener con salud a las personas que amo y aprecio.

A mis padres **Marcela Espiritu López** y **Filimón Gonzaga Martínez** por ser unos excelentes padres, que me brindaron cariño y apoyo. Gracias por los grandes consejos.

A mi hermano **Andrés**, que este donde este sé que siempre estuvo con nosotros y que dios lo tenga en su gloria. A mis hermanas **Marisol** y **Laura Estela** por apoyarme y darme ánimos.

A mis sobrinos **Aixa Marian**, **Sheili Azul** y **Alan Jesús** por ser una fuente de inspiración y por brindarme su cariño y afecto. Ellos me inspiran a estudiar para saber más, para después poder platicarles y transmitir el hábito de la lectura científica.

A mi abuela **Estela López de la Cruz** por confiar en mí, por cuidarme y educarme mientras mis padres cumplían con sus labores para nosotros.

A todos mis **familiares** que estuvieron apoyándome durante este proceso.

A mis amigos **Sergio Eliezer López Hernández** y **Mario Yubén Pimentel García** por brindarme su amistad y estar conmigo en las buenas y en las malas desde la secundaria.

A los integrantes del laboratorio de Fitobioquímica: **Enrique Ramírez Chávez**, **Juan Vázquez Martínez (Juanito)** y **Génesis Beautimeac Vidal (genes)**. A los integrantes del laboratorio de Epigenética: **Guillermo Antonio Silva Martínez (Memo)**, **Fabiola Tristán (Fabi)**, **Pilar Valencia Morales (Pili)**, **María del Carmen de la Rocha**, **Melany Scarlet Ortega**

A mis colegas, amigos y compañeros del posgrado.

---

---





## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ABREVIACIONES.....	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1. LA EPIGENÉTICA.....	9
2.2. LA REGULACIÓN DE LA METILACIÓN DEL ADN (mADN).....	9
2.2.1. La mADN.....	9
2.2.2. La desmetilación del ADN.....	10
2.2.3. Los blancos genómicos de la mADN.....	10
2.2.4. Ubicación de la mADN.....	11
2.2.5. Efecto de la mADN sobre la transcripción.....	11
2.3. MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES GLOBALES DE mADN.....	12
2.3.1. Análisis COBRA-ALU.....	12
2.4. PATOLOGÍA Y EPIGENÉTICA DE LA ATEROSCLEROSIS.....	13
2.5. LA LÍNEA THP-1 MODELO DE ESTUDIO EN LA ATEROSCLEROSIS..	14
2.5.1. La línea celular THP-1.....	14
2.5.2. Efectos de ácidos grasos específicos en células THP-1.....	14
2.6. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA).....	16
2.7. METABOLISMO DEL AA.....	16
2.8. ENDOCANNABINOIDES DERIVADOS DEL AA.....	17
2.9. LOS RECEPTORES CANNABINOIDES.....	20
2.10. EL METABOLISMO DE LA ANANDIMIDA (AEA) Y OTRAS N- ACILETANOLAMIDAS (NAEs).....	20
2.10.1. Síntesis de la AEA.....	20
2.10.2. Catabolismo de la AEA.....	21

2.11. EFECTO DE LA AEA SOBRE LA mADN.....	21
2.12. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE NAEs.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	29
5.1. Objetivo general.....	29
5.2. Objetivos específicos.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	31
6.1. EQUIPO.....	31
6.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
6.3. MEDIO DE CULTIVO.....	31
6.3.1. Medio RPMI 1640 adicionado.....	31
6.4. SOLUCIONES “STOCK”.....	31
6.4.1. Preparación de AA y oleico (AO).....	31
6.4.2. Preparación de los estándares de las NAEs.....	32
6.4.3. Preparación de los inhibidores de los receptores cannabinoides....	32
6.5. CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS.....	33
6.5.1. Estimulación de células THP-1 con NAEs.....	33
6.5.2. Estimulación con AA y AO.....	33
6.5.3. Inhibición de los receptores cannabinoides.....	34
6.5.4. Conteo y viabilidad celular.....	34
6.6. SÍNTESIS ENZIMÁTICA NAEs.....	35
6.7. METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE NAEs POR GC/EIMS.....	36
6.7.1. Caracterización de NAEs por GC/EIMS.....	36
6.7.2. Diseño del método SIM (Selected Ion Monitoring) para NAEs.....	36
6.7.3. Curvas de calibración para las NAEs.....	37
6.7.4. Determinación de NAEs en células THP-1.....	37
6.7.5. Determinación de NAEs en células sanguíneas.....	38
6.8. ANÁLISIS COBRA-ALU EN CÉLULAS THP-1.....	39
6.8.1. Extracción de ADN. ....	40
6.8.2. Tratamiento del ADN genómico con bisulfito.....	40

6.8.3. Amplificación de los elementos ALU.....	41
6.8.4. Análisis de la metilación total.....	42
6.9. EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES.....	42
6.9.1. Extracción de ARN.....	42
6.9.2. Síntesis de ADNc.....	43
6.9.3. Amplificación de <i>CNR1</i> y <i>CNR2</i> .....	43
6.9.4. Cuantificación de la expresión génica.....	43
7. RESULTADOS.....	45
7.1. IDENTIFICACIÓN DE NAEs POR GC/EIMS.....	45
7.2. DETERMINACIÓN DE NAEs EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	49
7.2.1. Diseño del método SIM para NAEs.....	49
7.2.2. Curvas de calibración de NAEs.....	49
7.2.3. Determinación de NAEs en células THP-1.....	49
7.2.4. Determinación de NAEs en células sanguíneas.....	52
7.3. ANÁLISIS COBRA-ALU EN CÉLULAS THP-1.....	53
7.4. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS THP-1 CON NAEs ESPECÍFICAS.....	54
7.5. EFECTO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES SOBRE LA mADN-AA.....	54
7.5.1. Expresión génica de los receptores cannabinoides.....	54
7.5.2. Inhibición de los receptores cannabinoides.....	57
8. DISCUSIÓN.....	59
9. CONCLUSIÓN.....	63
10. REFERENCIAS. ....	65
11. ANEXOS.....	75



## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Estándares de las <i>N</i> -aciletanolamidas.....	32
<b>Cuadro 2.</b> Sustratos utilizados para la síntesis enzimática de <i>N</i> -aciletanolamidas.....	35
<b>Cuadro 3.</b> Tiempo de retención de las <i>N</i> -aciletanolamidas silanizadas.....	45
<b>Cuadro 4.</b> Iones característicos de las <i>N</i> -aciletanolamidas silanizadas para el diseño del método SIM (Selected Ion Monitoring).....	49



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Principales endocannabinoides derivados del ácido araquidónico....	18
<b>Figura 2.</b> Principales <i>N</i> -aciletanolamidas (NAEs) con actividades biológicas en mamíferos.....	19
<b>Figura 3.</b> Vías de acción hipotéticas del ácido araquidónico.....	27
<b>Figura 4.</b> Espectro de masas de la estearoiletanolamida silanizada.....	46
<b>Figura 5.</b> Espectro de masas de la linoleoiletanolamida silanizada.....	46
<b>Figura 6.</b> Espectro de masas de la linolenoiletanolamida silanizada.....	47
<b>Figura 7.</b> Espectro de masas de la palmitoiletanolamida silanizada.....	47
<b>Figura 8.</b> Espectro de masas de la oleoiletanolamida silanizada.....	48
<b>Figura 9.</b> Espectro de masas de la anandamida silanizada.....	48
<b>Figura 10.</b> Curvas de calibración para las <i>N</i> -aciletanolamidas silanizadas.....	50
<b>Figura 11.</b> Algunos ácidos grasos pueden interferir en la determinación de las <i>N</i> -aciletanolamidas.....	51
<b>Figura 12.</b> Detección de oleoiletanolamida (OEA) y anandamida (AEA) en sangre.....	52
<b>Figura 13.</b> El efecto de la estimulación con 100 $\mu$ M de ácido araquidónico por 24 horas sobre la mADN de ALU I en células THP-1.....	53
<b>Figura 14.</b> Efectos de las <i>N</i> -aciletanolamidas sobre viabilidad celular y la mADN de elementos ALU I después de un estimulación con palmitoiletanolamida (PEA) y anandamida (AEA) por 24 horas.....	55
<b>Figura 15.</b> Análisis de niveles de expresión de <i>CNR1</i> y <i>CNR2</i> en células THP-1 estimuladas por diferentes periodos de tiempo.....	56
<b>Figura 16.</b> Efecto inverso del ácido araquidónico (AA) y oleico (AO) sobre la expresión de <i>CNR1</i> en células THP-1 estimuladas en diferentes tiempos y concentraciones.....	57
<b>Figura 17.</b> Los efectos de los antagonistas Rimonabant y AM630 sobre la viabilidad celular y la mADN de elementos ALU I en células THP-1.....	58





## ABREVIATURAS

2-AG	2-araquidonoilglicerol
5hmeC	5- hidroximetilcitosina
5meC	5-metilcitosina
AA	ácido araquidónico
AO	ácido oleico
AEA	anandamida o araquidonoiletanolamida
BISTFA	<i>N</i> - <i>O</i> – <i>Bis</i> (trimetilsilil) trifluoroacetamida
CB1	receptor cannabinoide 1
CB2	receptor cannabinoide2
COBRA	análisis de restricción combinado con bisulfito
COX	Ciclooxigenasas
CYP	Citocromo
CPT-1	palmitoiltransferasa de carnitina
dmADN-AO	hipometilación del ADN inducida por ácido oleico
DMSO	dimetil sulfóxido
DNMT	ADN metiltransferasa
EET	ácido epoxieicosatetraenoico
FAAH	hidrolasa de amidas de acidos grasos.
GC/EIMS	cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico
HETE	ácido hidroxieicosatetraenoico
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
iCpG	isla CpG
LDL	lipoproteína de baja densidad
LEA	linoleoiletanolamida
LNEA	linolenoiletanolamida
LINE	elementos largos dispersos
NAE	<i>N</i> -aciletanolamida
mADN	metilación del ADN
mADN-AA	metilación del ADN inducida por el ácido araquidónico
MBD	proteínas de unión a ADN metilado
MEF	fibroblastos de embriones de ratón
MLL	leucemia de linaje mezclado
NAAA	amidasa acida de <i>N</i> -aciletanolamidas
NAPE-PLD	fosfolipasa D de <i>N</i> -acilfosfatidiletanolamidas
NArPE	<i>N</i> -araquidonoilfosfatidiletanolamida
OEA	oleoiletanolamida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEA	palmitoiletanolamida
PGC1 $\alpha$	coactivador 1 de PPAR $\gamma$
PLA-2	fosfolipasa A2
PMA	forbol-12 miristato-13-acetato
PMSF	floururo de fenilmetilsulfonilo
PPAR	receptores activados por proliferadores peroxisomales
SEA	estearoiletanolamida
SINE	elementos cortos dispersos
SIRT1	sirtuina 1
TET	ten-eleven translocation
THC	$\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol
TMS	trimetilsilil o silanizado/a
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato



## RESUMEN

Aunque varias enfermedades no transmisibles como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis están asociadas con alteraciones en la metilación del ADN (mADN), todavía existe poca información en cuanto a cómo se producen estos cambios. De especial importancia para la aterosclerosis es el impacto de los factores nutricionales específicos, como los ácidos grasos sobre la mADN.

Trabajos previos de nuestro grupo ha demostrado que el ácido araquidónico (AA) induce la mADN (mADN-AA) mientras que el ácido oleico (AO) tiene un efecto opuesto en células THP-1. La mADN-AA es dependiente de SIRT1, una histona deacetilasa y PPAR $\alpha$ , un factor de transcripción involucrado en el metabolismo de los ácidos grasos. Ligandos de PPAR $\alpha$  incluyen al AA y *N*-aciletanolamidas (NAEs) como palmitoiletanolamida (PEA) y araquidonoiletanolamida (AEA). Los ligandos PEA y AEA también pueden activar los receptores cannabinoides, CB1 y CB2, y la activación del primero por la AEA induce hipermetilación en líneas celulares de queratinocitos. Además, se ha mostrado que CB2 regula a PPAR $\alpha$  a través de la activación de la vía de SIRT1/PGC1 $\alpha$ . Lo anterior sugiere que los receptores cannabinoides pueden actuar río arriba de PPAR $\alpha$  en la mADN-AA.

En este trabajo se evaluó la posible función de las NAEs y de los receptores cannabinoides en la mADN-AA en células THP-1. En células estimuladas con AA mostramos que las NAEs no son detectables por GC/EIMS y que ni PEA ni AEA pueden reproducir la mADN-AA. Sin embargo, ambos receptores participan en la mADN-AA ya que la inhibición de éstos abolió la respuesta. Además, la expresión de ambos está asociado con los cambios dinámicos en la mADN en células estimuladas con el AA y AO. En particular, observamos que la expresión de CB1 está regulado de manera inversa en células estimuladas con AO respecto a AA. Tomados en conjunto los datos muestran que CB1 y CB2 están implicados en la mADN-AA y así pudieran ser excelentes blancos terapéuticos para revertir la hipermetilación de ADN observada durante la progresión de la aterosclerosis.



## ABSTRACT

Although several non-communicable diseases such as cancer, cardiovascular diseases and atherosclerosis are associated with alterations in DNA methylation (mDNA), there is still limited information as to how these changes occur. Of specific relevance to atherosclerosis is the impact of nutritional factors such as fatty acids on mDNA.

Previous work from our group has shown that arachidonic acid (AA) induces mDNA (AA-mDNA) while oleic acid (OA) has the opposite effect in THP-1 cells. AA-mDNA is dependent on SIRT1, a histone deacetylase, and PPAR $\alpha$ , a ligand-activated nuclear transcription factor involved in the fatty acid metabolism. PPAR $\alpha$  ligands include AA and *N*-acylethanolamides (NAEs) such as palmitoylethanolamide (PEA) and arachidonylethanolamide (AEA). The latter can also activate cannabinoid receptors, CB1 and CB2, and activation of the former by AEA induces hypermethylation in a keratinocyte cell line. Furthermore, CB2 regulates PPAR $\alpha$  via activation of the SIRT1/PGC1 $\alpha$  pathway in muscle myoblasts. Collectively data suggest that cannabinoid receptors may act upstream of PPAR $\alpha$  in AA-mDNA.

In this work we evaluated the putative role of NAEs and cannabinoid receptors in the AA-mDNA in THP-1 cells. The results show that NAEs are undetectable by GC/EIMS in cells stimulated with AA, and that neither AEA nor PEA are capable of reproducing the AA-mDNA. However, both CB1 and CB2 are expressed during, and participate, in AA-mDNA and the expression of the former is opposite in AA and OA-stimulated cells. Taken together, the data suggest that both receptors are necessary for AA-mDNA and may represent excellent therapeutic target for reversing the increase in methylation observed during atherosclerosis progression.



## 1. INTRODUCCIÓN

La metilación del ADN (mADN) es la principal modificación epigenética en el genoma de los mamíferos y consiste en la transferencia de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a una citosina. La mADN es fundamental para un desarrollo normal y representa un mecanismo importante en la regulación de la expresión génica (revisado por Breiling y Lyko 2015). En humanos, diversas enfermedades no transmisibles, como son el cáncer y la aterosclerosis, están asociadas con cambios en los patrones de metilación (Esteller 2011; Zaina *et al.* 2014, 2015). De manera interesante, en la aterosclerosis, los cambios en la mADN ocurren antes de presentarse el fenotipo asociado con la enfermedad y aumentan con la severidad de esta (Lund *et al.* 2004; Valencia-Morales *et al.* 2015). Esto indica que la mADN juega un papel clave en la aterosclerosis, y que la identificación de factores que inducen los cambios en la mADN puede resultar en nuevas estrategias de prevención y tratamiento para esta enfermedad.

A nivel mundial, la aterosclerosis es la principal causa de mortalidad y morbilidad por enfermedades cardiovasculares y resulta de un proceso inflamatorio crónica en la pared de las arterias provocada por la acumulación de lípidos. Durante el proceso inflamatorio, las células del sistema inmune, como son los monocitos, juegan un papel importante (Ghattas *et al.* 2013). Por eso, las células THP-1, una línea derivada de monocitos, ha sido utilizada para estudiar la aterosclerosis y otros procesos inflamatorios *in vitro* (revisado por Qin 2012).

Diversos estudios han relacionado el consumo excesivo de los ácidos grasos provenientes de la dieta con el desarrollo de la aterosclerosis (Jane-George y Lyon 2010; Georgiadi y Kertsen 2012). Sin embargo aún se desconoce el mecanismo regulatorio molecular por el cual los ácidos grasos pudieran iniciar esta patología (Georgiadi y Kertsen 2012). Existe evidencia que los ácidos grasos pueden modular la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos como es la mADN (revisado por Burdge y Lillicrop 2014). En nuestro grupo de trabajo se

ha observado que lipoproteínas ricas en triglicéridos inducen el aumento en la mADN en células THP-1 (Lund *et al.* 2004; Rangel-Salazar *et al.* 2011). De manera similar, el ácido araquidónico (AA, ácido icosan-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico), un ácido graso poliinsaturado, induce hipermetilación del ADN (mADN-AA) sobre todo en la parte codificante de un gran número de genes que se asocia con un incremento en la expresión génica (Silva-Martínez *et al.* 2016). Por otra parte, el ácido oleico (AO, ácido octadecenoico) induce hipometilación del ADN (dmADN-AO).

La mADN-AA en células THP-1 es dependiente del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas (PPAR $\alpha$ ), Sirtuina 1 (SIRT1) y  $\beta$ -oxidación (Silva-Martínez *et al.* 2016). PPAR $\alpha$  es un factor de transcripción nuclear que regula genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos y es activado por una diversidad de ligandos como los ácidos grasos y algunas amidas derivadas de éstos como por ejemplo las *N*-aciletanolamidas (NAEs) (Schupp y Lazar 2010; Grygiel-Gomiak 2014; O'Sullivan 2007). SIRT1 es una deacetilasa que regula de manera positiva la actividad de PPAR $\alpha$  actuando sobre PGC-1 $\alpha$ , un co-factor transcripcional de PPAR $\alpha$  (Roth y Chen *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2013).

El AA es un precursor de una gran variedad de moléculas de señalización denominados eicosanoides, que incluyen a las prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas y algunos endocannabinoides (Pertwee 2015). Los principales endocannabinoides son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Ambos son ligandos de los receptores cannabinoides, CB1 y CB2, que regulan varios procesos inmunoregulatorios, apetito, dolor y procesos cognitivos. De manera interesante, AEA induce hipermetilación del ADN dependiente de la activación de CB1 que resulta en la represión de genes involucrados en la diferenciación de queratinocitos (Paradisi *et al.* 2008). Por otra parte, Zheng y colaboradores (2013) confirmaron que la activación del receptor CB2 promueve la  $\beta$ -oxidación a través de la vía SIRT1/PCG-1 $\alpha$ , la cual regula de manera positiva a PPAR $\alpha$ .



Por la evidencia anterior, y el hecho que las células THP-1 expresan los receptores CB1 y CB2 (Rajesh *et al.* 2008), es probable que la AEA, algunos de sus congéneros (NAEs) u otros metabolitos derivados de éste participen en la respuesta de mADN-AA en células THP-1, ya sea activando a los receptores cannabinoides o PPAR $\alpha$ . Así, las principales preguntas de este trabajo son: 1) ¿La AEA o alguno de sus congéneros pueden reproducir los efectos de mADN-AA? 2) ¿Participan los receptores CB1 y CB2 en la mADN-AA?



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. LA EPIGENÉTICA**

El término epigenética fue acuñado en 1942 por el Británico Conrad Waddington y la definió como “*la interacción causal entre genes y sus productos que permiten la expresión del fenotipo*”. Históricamente, la epigenética se define como el estudio de los procesos y mecanismos que determinan cambios heredables en la expresión génica que no son ocasionados por la alteración en la secuencia del ADN. Entre los principales mecanismos epigenéticos se encuentran las modificaciones covalentes por la mADN y las modificaciones postranscripcionales de histonas; ambas están íntimamente ligadas a la remodelación de la cromatina, permitiendo controlar la expresión génica (Kouzarides 2007; Cheng *et al.* 2011). Un tercer tipo de mecanismo esta mediado por la expresión de moléculas de RNA no codificantes, que a menudo comparten componentes de la vía de RNA de interferencia y pueden influenciar aspectos epigenéticos. Los mecanismos epigenéticos juegan papeles cruciales en la expresión diferencial de los genes y en la regulación de procesos celulares como son diferenciación celular y fenómenos como la impronta génica, inactivación del cromosoma X y el efecto de posición cromosomal entre otros. El conjunto global de dichas modificaciones epigenéticas se le denomina la epigenoma (Feil 2006).

### **2.2. LA REGULACIÓN DE LA METILACIÓN DEL ADN (mADN)**

#### **2.2.1. La mADN**

La mADN es el mecanismo epigenético más estudiado y mejor comprendido en mamíferos. Este consiste en la transferencia de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) hacia la posición 5' de la citosina, utilizando como donador S-Adenosilmetionina (SAM) originando 5-metilcitosina (5meC) en el contexto de dinucleótidos 5' CpG 3' (Cheng y Roberts 2001; Goll y Bestor 2005). La reacción es catalizada por una familia de enzimas denominadas ADN metiltransferasas (DNMTs). En base a la similitud en sus secuencias de aminoácidos se han identificado cinco miembros en la familia DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b y DNMT3L (Kullis y Esteller 2010). Solo DNMT1, DNMT3a y DNMT3b

han mostrado actividad para la transferencia de grupos metilo a residuos de citosina en el ADN. Por otro lado, la DNMT2 es una metiltransferasa de RNA (Goll *et al.* 2006) y DNMT3L no posee actividad catalítica, pero es un importante regulador de DNMT3a y DNMT3b (Cheng *et al.* 2011). En base a la susceptibilidad a modificar citosinas en ADN de doble cadena (dsADN), hemimetiladas *versus* desmetiladas *in vitro*, las metilaciones en la citosina se han clasificado en “*de mantenimiento*” y “*de novo*”, respectivamente. DNMT3a y DNMT3b son metiltransferasas *de novo* y establecen los patrones de metilación en células germinales y durante el periodo de pre-implantación (Uysal *et al.* 2015). La DNMT1 es una metiltransferasa de mantenimiento que conserva los patrones de metilación durante la división celular y la reparación del ADN (Mohan y Chaillet 2013). Además, en interacción con DNMT3a, DNMT1 posee actividad *de novo* (Fatemi *et al.* 2002).

### **2.2.2. La desmetilación del ADN**

La 5meC puede sufrir una serie de oxidaciones, mediadas por las enzimas TET (Ten-Eleven Translocation) produciendo 5-hidroximetilcitosina (5hmeC), 5-formilcitosina y carboxicitosina (Cheng *et al.* 2011; revisado por Hashimoto *et al.* 2015). La 5hmeC que representa el 0.05-0.7% de las citosinas totales (Globish *et al.* 2010; Bachman *et al.* 2014), mientras que los niveles de 5-formilcitosina y carboxicitosina son 0.002% (Ito *et al.* 2009; Pfaffeneder *et al.* 2014). Como los productos de la oxidación no son sustratos de las metiltransferasas de mantenimiento, el ADN resulta hipometilado después de la replicación celular. Esto se conoce como la desmetilación pasiva. Sin embargo, existe también evidencia de una desmetilación activa mediada por desaminasas, ADN glicosilasas y la vía de reparación por escisión de nucleótido (revisado por Hashimoto *et al.* 2015).

### **2.2.3. Los blancos genómicos de la mADN**

En células somáticas de mamíferos del 70 al 80% de los dinucleótidos CpG están metilados y representan aproximadamente del 3 al 6% de las citosinas del

genoma (Lister *et al.* 2009; Berdasco y Esteller 2010). Así mismo, en células madre embrionarias se ha observado a muy baja frecuencia la mADN en regiones no-CpG, específicamente en dinucleótidos CpT y CpA (Ramsahoye *et al.* 2000). También es posible encontrar en células no diferenciadas metilación de citosina en nucleótidos con secuencia CHG y CHH (H = A, T o C). No obstante, la tendencia es a ser nula a medida que las células se diferencian, lo cual indica que podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia (Lister *et al.* 2009).

#### **2.2.4. Ubicación de la mADN**

El mayor porcentaje de mADN ocurre en regiones genómicas repetitivas, incluyendo ADN satélite y elementos parásitos y es necesario para mantener la integridad cromosómica (Esteller 2005; Robertson 2005). Ejemplos de estos elementos son LINES (Long Interspersed Elements), SINES (Short Interspersed Elements) y los retrovirus endógenos. Por otro lado, secuencias con una alta densidad de CpG ( $\text{CpG/GC} > 0.6$  y con una longitud de 0.2 a 5 Kb), conocidas como islas CpG (iCpG) se encuentran generalmente no metiladas. El 50% de estas suelen agruparse en regiones promotoras, cerca de sitios de inicio de transcripción mientras el resto se encuentran en regiones intergénicas o dentro del cuerpo de los genes –es decir, la región codificante (Illingworth *et al.* 2010). Otras regiones pequeñas con baja densidad de CpG ubicadas cerca (~2 Kb río arriba) de las iCpG están también sujetas a la mADN y se denominan orillas de i-CpG (Illingworth *et al.* 2010; Portela y Esteller 2009).

#### **2.2.5. Efecto de la mADN sobre la transcripción**

Como marcador transcripcional, por lo general la mADN de orillas y i-CpG está asociada al silenciamiento génico, mientras que ocurre lo contrario en genes transcripcionalmente activos (Kullis y Esteller 2010; Esteller 2011). La represión transcripcional por metilación en i-CpG es atribuida a que la mADN inhibe de manera directa la unión de factores de transcripción a su promotor o indirectamente a través del reclutamiento de proteínas que reconocen citosinas

metiladas (MBDs) (revisado por Klose y Bird 2006). Por el contrario, la mADN en el cuerpo del gen esta frecuentemente correlacionada con la sobre expresión génica y se ha especulado que podría participar en la regulación del splicing (revisado por Jones 2012).

### **2.3. MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES GLOBALES DE mADN**

Existe una gran variedad de técnicas para evaluar y cuantificar los niveles de mADN que difieren respecto a su sensibilidad, precisión, costo, requerimiento de equipos y dificultad técnica. Éstos pueden ser clasificados como técnicas basadas en: a) la sensibilidad de enzimas de restricción en reconocer y diferenciar entre sitios metilados y no metilados, b) la conversión de citosina en uracilo por el tratamiento del ADN con bisulfito, c) el reconocimiento de 5meC por anticuerpos específicos y d) la cuantificación de 5meC por HPLC acoplado a espectrometría de masas (Hattori y Ushijima 2011).

#### **2.3.1. Análisis COBRA-ALU**

El análisis COBRA-ALU es un método que combina el uso de enzimas de restricción con el tratamiento de ADN con bisulfito para determinar el estado de metilación de los elementos ALU (Sirvanachsuntun *et al.* 2008). Los elementos ALU son secuencias repetidas de aproximadamente 300 nt que pertenecen a la familia SINE. Los SINEs representan más del 13.7% de la genoma humana y se estima que el 7.1 millones de sitios CpG se encuentran en SINEs, de las cuales el 25% están representados por los elementos ALU. Por este hecho, los elementos ALU han sido explotados para determinar el estado de los niveles de mADN del genoma (Lou *et al.* 2014).

En el análisis COBRA-ALU descrito por Sirvanachsuntun y colaboradores (2008) diseñaron oligonucleótidos específicos que flanquean a sitios CpG en ALUs que son reconocidos y cortados por la enzima *TaqI* (5'-TCGA-3'). Para la evaluación del estado de metilación en diferentes tumores, previamente trataron el ADN genómico con bisulfito seguido por PCR y resticción con *TaqI*. Si la citosina del sitio 5'-TCGA-3 no está metilada, después del tratamiento con bisulfulto se

convierte en uracilo. Por otro lado, el sitio de *Taq1* al estar metilado quedaría intacto. Así, la digestión de los productos de PCR de los ALU I con *Taq1* (de ADN tratado con bisulfito) genera fragmentos diferentes dependiendo del estado de estos: 117 (Hipometilada), 75.5 (Hemimetilada) y 42.5 pb (Hipermetilada).

## **2.4. PATOLOGÍA Y EPIGENÉTICA DE LA ATEROSCLEROSIS**

La aterosclerosis es un enfermedad caracterizada por el depósito e infiltración de sustancias lipídicas, provocando la formación conocido como una placa de ateroma o ateromas (Ilhan y Kalkanl *et al.* 2014). Al ser infiltradas en la capa íntima arterial, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas inducen la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio que interactúan con los receptores de monocitos, estimulando su migración y diferenciación a macrófagos y células dendríticas. Finalmente, los macrófagos se diferencian a células espumosas, y liberan quimiocinas y otras citocininas para volver a reclutar otros monocitos y reiniciar el proceso (White *et al.* 2010). En estadios avanzadas la rotura de una placa de ateroma puede provocar la formación de un trombo que puede ser mortal si el bloqueo tiene lugar en una arteria coronaria o en una arteria cerebral.

Actualmente, el 10% de los casos de aterosclerosis es atribuido a factores genéticos (Indolfi 2002). Además, existen diferentes factores de riesgo en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, incluyendo el estilo de vida, condiciones personales (Jane-George y Lyon 2010) y la dieta. Entre los factores de riesgo más correlacionado a la propensión de la aterosclerosis se encuentra una dieta rica en lípidos como son ácidos grasos, triglicéridos y colesterol (Tabas 2010).

El desarrollo y progreso de la aterosclerosis en humanos está asociada con cambios en la mADN, siendo una hipermetilación gradual durante el progreso de la enfermedad, mientras que en lesiones avanzadas asociadas con rotura de la ateroma ocurre una hipometilación (Zaina *et al.* 2014; Zaina *et al.*, 2015)

## **2.5. LA LÍNEA THP-1 MODELO DE ESTUDIO EN LA ATEROSCLEROSIS**

### **2.5.1. La línea celular THP-1**

Las células de la línea THP-1 monocítica proceden de sangre periférica de un paciente de un año de edad con leucemia. A pesar de tratarse de una línea celular cancerígena, las células THP-1 se caracterizan por poseer un fondo genético homogéneo, lo que hace que exista poca variabilidad fenotípica a través de múltiples divisiones mitóticas. Su cariotipo se encuentra caracterizado (Odero *et al.* 2000) y con solo una diferencia genética debido a la translocación (9;11)(p22;q23) (Drexler *et al.* 1995). La translocación (9;11) resulta de la fusión del gen MLL (Mixed Lineagen Leukemia) en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22) con el gen AF9 en el brazo corto del cromosoma 9 (9p22). Esta translocación es característica en leucemias (Nakamura *et al.* 1993).

Las células THP-1 pueden diferenciarse a macrófagos exponiéndolas a forbol-12 miristato-13-acetato (PMA), 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y 1,25-dihidroxi vitamina D<sub>3</sub> (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>). De esta manera, esta línea celular ha sido utilizada para estudiar el papel de los monocitos y macrófagos en diferentes procesos inflamatorios como es la aterosclerosis (revisado por Qin 2012). Entonces, existe el potencial para el estudio de nuevos mecanismos moleculares tanto en monocitos y macrófagos y su relación con la fisiología y patofisiología en el sistema vascular.

Entre las características técnicas del uso de células THP-1 se encuentran su capacidad de dividirse cada 35 a 50 horas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino. Además, pueden prepararse stock con células y ser almacenadas por periodos de tiempo largos (Chanpout *et al.* 2013). Finalmente, existen técnicas genéticas establecidas para el silenciamiento post-transcripcional por RNA de interferencia, tal como la liberación de dsRNAs por transfección por lipofectamina 2000 (Qin 2012; Chanpout *et al.* 2013).

### **2.5.2. Efectos de ácidos grasos específicos en células THP-1**

En células THP-1 se han observado dos fenómenos importantes que podrían estar involucrados en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y



ambos son provocados por el AA: 1) hipermetilación del ADN (Lund *et al.* 2004; Silva-Martínez *et al.* 2016) y 2) la formación de gotas de lípidos en el interior celular (Guijas *et al.* 2012).

En células THP-1, el AA induce un incremento en los niveles de mADN (mADN-AA) después de 3 horas de estimulación, esta respuesta se mantiene hasta las 24 horas (datos no publicados). La respuesta de hipermetilación parece específico al AA, ya que el ácido oleico (AO), otro ácido graso insaturado, muestra un efecto opuesto (Silva-Martínez *et al.* 2016).

La mADN-AA depende del Receptor Activado por Proliferadores de Peroxisomas  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), Sirtuina 1 (SIRT1) y la  $\beta$ -oxidación (Silva-Martínez *et al.* 2016). PPAR $\alpha$  es un factor de transcripción que regula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos como por ejemplo la  $\beta$ -oxidación. Éste es activado por una diversidad de ligandos como son los ácidos grasos y amidas derivadas de éstos tal como las *N*-aciletanolamidas (NAEs). La inhibición específica de PPAR $\alpha$  en células THP-1 inhibe de la respuesta de la mADN-AA del ADN (Silva-Martínez *et al.* 2016). De manera similar, el “knock-down” de SIRT1 en células MEF (mouse embryonic fibroblasts por sus siglas en inglés) modifica también la respuesta de mADN-AA, aun solo a un 50% (Silva-Martínez *et al.* 2016). SIRT1 es una deacetilasa y entre sus blancos se encuentra PGC-1 $\alpha$ , un co-factor de los PPARs. Una vez deacetilada, PGC-1 $\alpha$  puede interactuar con y activar a PPAR $\alpha$ . Esta vía se le denomina SIRT-1/PGC-1 $\alpha$ .

Por otra parte, Guijas y colaboradores (2012) han mostrado que una concentración de 10  $\mu$ M de ácido araquidónico induce la formación citoplasmática de gotas de lípidos en células THP-1 y su formación es dependiente de las cinasas JNK-1 y p38. Las gotas de lípidos están compuestas principalmente de triglicéridos y ésteres de colesterol, y han sido consideradas como una fuente pasiva de energía. Sin embargo, en la actualidad se ha hipotetizado que a partir de los triglicéridos contenidos en éstas pudieran surgir un espectro de compuestos bioactivos que pudieran desempeñar un papel como co-activadores de factores de transcripción y diversas enzimas y contribuir a la regulación de diversos procesos celulares (Papackova y Kahova 2014). Entre estos compuestos bioactivos está el

2-araquidonoilglicerol el cual podría ser sintetizado a partir de triglicéridos con AA esterificado en la posición *sn*-2 (Di-Marzo *et al.* 1999). Por lo anterior, sería también interesante considerar la participación de la vía de señalización involucrada en la formación de las gotas de lípidos en la mADN-AA.

## **2.6. EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA)**

El AA (ácido icosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico) es un ácido con 4 insaturaciones no conjugadas en posición *cis* y comúnmente, se encuentra formando parte de los fosfolípidos de las membranas celulares regulando las propiedades físicas de estas. Debido a la posición de un doble enlace en la posición 6 a partir del carbono  $\omega$  este es clasificado dentro de la familia de los Omega 6. Fue aislado por primera vez del cacahuete *Arachis hypogaeae* L., de donde proviene su nombre (Schaefer 2014).

El AA ha sido categorizado como una molécula señal que participa en diferentes procesos en organismos que van desde esponjas, moluscos, mamíferos y plantas. Es importante para la sobrevivencia de células libres, la agregación celular, regulación de la presión osmótica, daño mecánico, supresión del sistema inmune e inflamación. Sin embargo, el mecanismo por el cual pudieran estar regulado dichos procesos es aún incierto y probablemente se encuentre conservado en el transcurso de la evolución en los organismos (Piomelli 1996).

En mamíferos, el AA mejora tanto la captación celular de glutamato potencializando a acción del transportador excitatorio de aminoácidos-2 (EAAT-2) (Zerenge *et al.* 1995) y la activación de los canales de potasio como son TREK-1 y TRAAK-2 (Fink *et al.* 1998). Además, el AA regula los niveles de calcio citoplasmático (Sergeeva *et al.* 2012) probablemente por medio de los canales ERC (Shuttleworth 2010).

## **2.7. METABOLISMO DEL AA**

El AA es liberado de la membrana plasmática por la acción de la fosfolipasa A2 (PLA-2). Una vez libre en la célula puede ser oxidado fácilmente debido a la

presencia de múltiples dobles enlaces. A su vez es sustrato para una diversidad de enzimas para producir una gran cantidad de eicosanoides.

Los principales eicosanoides son: 1) los prostanooides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano A<sub>2</sub>) sintetizados por la vía de la ciclooxigenasa (COX); 2) los leucotrienos (LT A<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub>, E<sub>4</sub> y B<sub>4</sub>) sintetizados por la vía de la 5-lipooxigenasa (LOX); 3) las lipoxinas producto de la interacción entre las 12-LOX y 15-LOX con la 5-LOX; y 4) la oxidación por el complejo Citocromo P450 (CYP) que produce los ácidos hidroxi-eicosatetraenoico (HETEs) y epoxi-eicosatetraenoico (EETs) (Yin *et al.* 2013; Capra *et al.* 2014).

Tanto los prostanooides y los leucotrienos interactúan con receptores acoplados a proteínas G. Los primeros participan en inflamación, dolor, fiebre, homeostasis vascular y en plaquetas, inmunidad y reproducción, mientras que los segundos participan en la inflamación y regulación del sistema inmune. De manera interesante, el leucotrieno LTB<sub>4</sub> es capaz de unirse y activar PPAR $\alpha$  (Lazar y Schupp 2010). Por otro lado, las lipoxinas actúan como moléculas anti-inflamatorias (Capra *et al.* 2014).

Finalmente, el AA también es sustrato para la síntesis de un grupo de compuestos con actividad biológica denominados endocannabinoides (Cascio y Marini 2015).

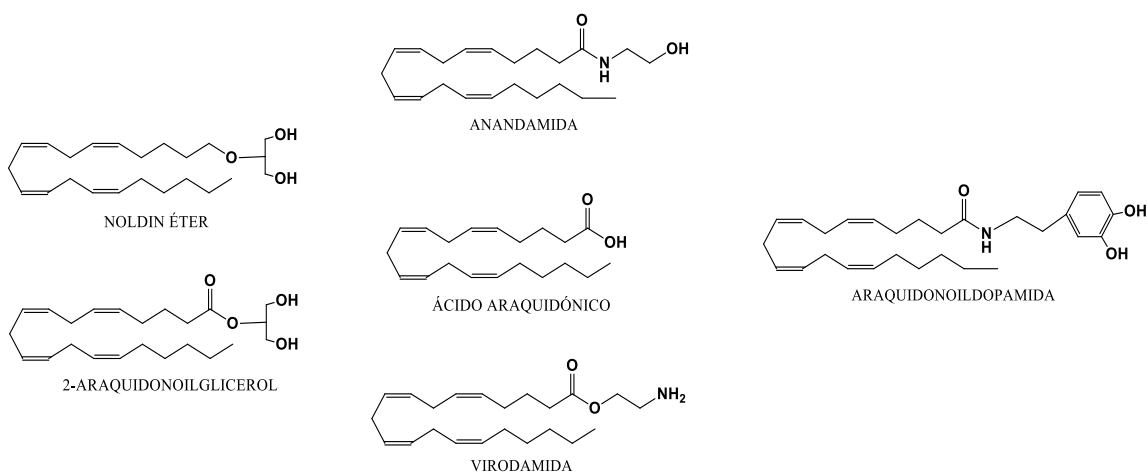
## 2.8. ENDOCANNABINOIDES DERIVADOS DEL AA

El AA es precursor de diversos endocannabinoides (**Figura 1**) que funcionan como segundos mensajeros. La anandamida (AEA o araquidonoiletanolamida) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) son considerados los dos principales endocannabinoides (Mechoulam *et al.* 2014). Similar al  $\Delta$ 9-tetrahidrocannabinol (THC) el principal compuesto activo de la *Cannabis sativa*, ellos pueden unirse y activar a los receptores cannabinoides, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Devane *et al.* 1988).

La AEA pertenece a un grupo de compuestos denominados *N*-acetil-etanolamidas (NAEs) y se caracteriza por el AA unido a etanolamina por medio de un enlace amida. Se han descrito NAEs no derivadas del AA (**Figura 2A**) y el

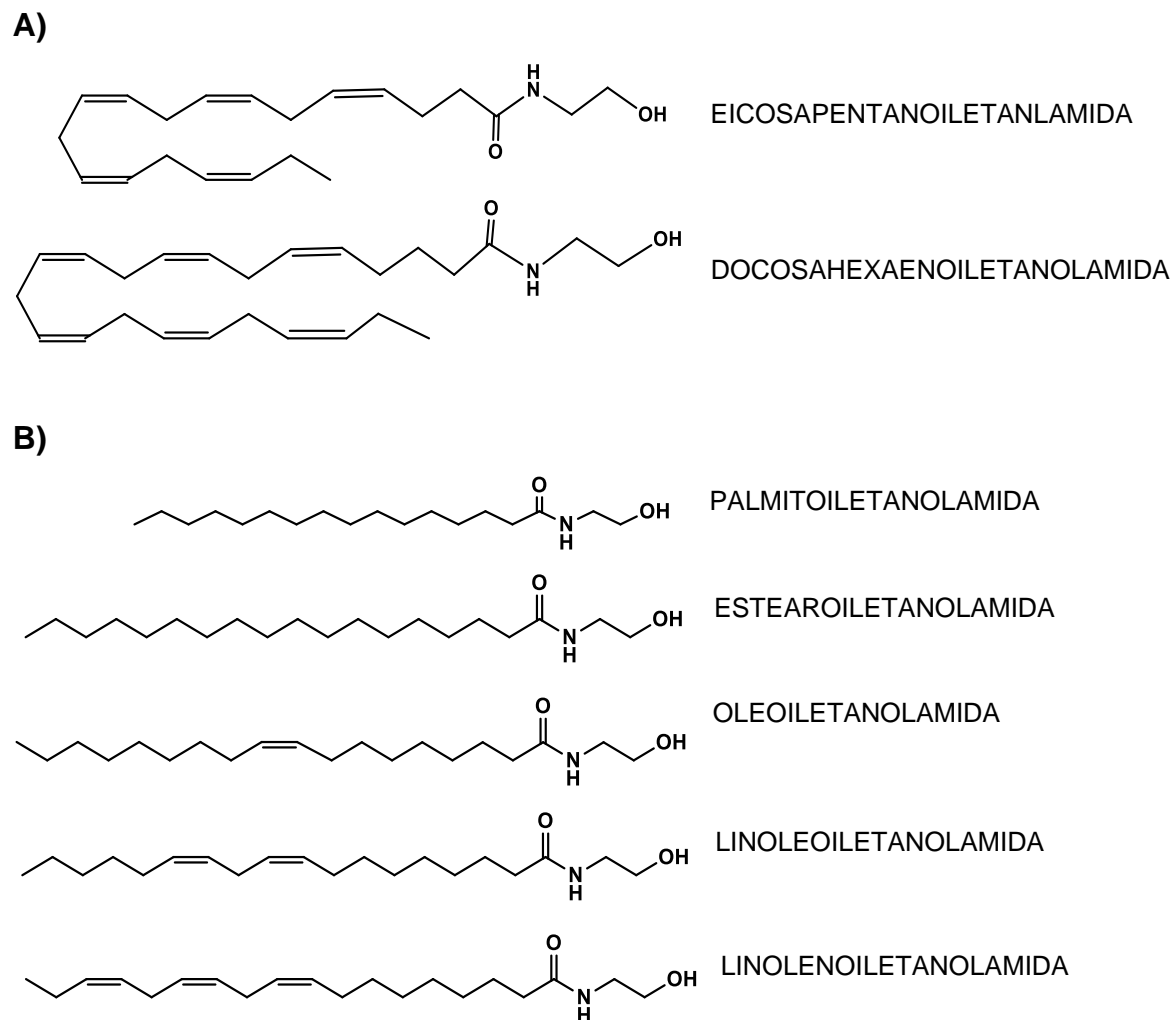
péptido homopresina que son agonistas de los receptores cannabinoides, y aún se desconoce sus relevancias farmacológicas y biológicas (Pertwee 2015).

Existen otras NAEs que poseen otro tipo de cadena acilo en su estructura como por ejemplo palmítico, esteárico, oleico, linoleico o linolénico, etc. (**Figura 2B**). Se les han denominado “compuestos similares a endocannabinoides”, ya que no son capaces de activar a los receptores cannabinoides pero ejercen algunos efectos fisiológicos independientes de éstos; incluso son capaces de potenciar el efecto de la AEA al competir como sustrato para las enzimas involucradas en su degradación (Hansen *et al.* 2015). Sin embargo, la interacción de palmitoiletanolamida (PEA) con los receptores cannabinoides ha sido reportada llevarse a cabo a altas concentraciones (Showalter *et al.* 1996).



**Figura 1.** Principales endocannabinoides derivados del ácido araquidónico

Por otra parte, el 2-AG es sintetizado por una ruta metabólica independiente a la de la AEA (Ueda *et al.* 2013). Este deriva de fosfolípidos que poseen esterificados al AA en la posición *sn*-2. Algunos autores se refieren al 2-AG como el agonista completo de los receptores cannabinoides puesto que este se encuentra a mayor concentración y se une con más afinidad a estos en comparación con la AEA (Sugiura & Waku 2000).



**Figura 2. Principales *N*-aciletanolamidas (NAEs) con actividades biológicas en mamíferos.** A) NAEs endocannabinoides no derivadas del ácido araquidónico y B) NAEs sin actividad de endocannabinoide.

## **2.9. LOS RECEPTORES CANNABINOIDES**

En humanos se han identificado y clonado dos genes *CNR1* y *CNR2* codificantes para los receptores cannabinoides CB1 y CB2 respectivamente (Matsuda *et al.* 1990; Munro *et al.* 1993). Estos pertenecen a los receptores acopladas a proteínas G (GPCR) del tipo inhibitorias (Gi) de aproximadamente 400 aminoácidos (Onavi *et al.* 2002). La activación de estos puede inhibir a la ciclasa de adenilato y los canales de calcio tipo Q y N, y estimular a los canales de potasio GIRK (McAllister *et al.* 1999). Los receptores cannabinoides también regulan, la actividad de enzimas intracelulares como cinasas de la vía MAPK/ERK, cJUN y AKT (Howlett 2005).

El receptor CB1 es expresado principalmente en tejidos del sistema nervioso central principalmente en el hipotálamo, hipocampo y ganglios basales (Munro *et al.* 1993) y a muy bajos niveles en tejido adiposo, hígado, corazón, músculo liso, endotelio, riñón, testículos y células del sistema inmune (Gerard *et al.* 1991; Herkenham *et al.* 1991). La activación del receptor CB1 inhibe la liberación de neurotransmisores de tipo excitatorio e inhibitorio. Por otro lado, CB2 es expresado en tejidos periféricos como en células del sistema inmune. La activación del receptor CB2 está involucrado en la regulación del sistema inmune (Munro *et al.* 1993). En las células THP-1 se sabe que ambos receptores están expresados (Rajesh *et al.* 2008). Lo anterior sugiere la participación de endocannabinoides en la regulación de diferentes mecanismos inmunomodulatorios (Berdyshev *et al.* 2000; Kaplan *et al.* 2013; Lombard *et al.* 2007).

## **2.10. EL METABOLISMO DE LA ANANDAMIDA (AEA) Y OTRAS N-ACILETANOLAMIDAS (NAEs)**

### **2.10.1. Síntesis de AEA**

Como se mencionó en la sección anterior, la AEA se caracteriza por poseer en su estructura al AA y a la etanolamina. El AA proviene de la dieta o directamente de la síntesis a partir de ácido linoleico por medio de elongasas y desaturasas (Wynn 2011), mientras que el grupo etanolamina también proviene de

la dieta y de la degradación de la esfingosina, –un fosfolípido de la membrana (Nakamura y Murayama 2014).

El primer paso en la síntesis de AEA es la formación de un fosfolípido denominado NArPE (N-Araquidonoilfosfatidiletanolamida), el cual se forma por la acción de una *N*-aciltransferasas encargada de condensar el grupo amino de la fosfatidiletanolamina con el AA. Una vez formado el NArPE, este es utilizado como sustrato por una enzima similar a fosfolipasa D (PLD) que libera AEA y produce ácido fosfático. Se ha especulado la existencia de rutas alternativas (no discutidas en este manuscrito), para la formación de AEA tal como se ha demostrado con mutantes carentes de la enzima NAPE-PLD (Ueda *et al.* 2013).

### **2.10.2. Catabolismo de la AEA**

Se han descrito dos sistemas de degradación de la AEA los cuales involucran a las enzimas ácido graso amido hidrolasa (FAAH) y a la *N*-acil amidasa ácida (NAAA). Como previamente se mencionó, estas enzimas se encargan de mantener los niveles de AEA y terminar la vía de señalización inducida por éste en diferentes procesos (Ueda *et al.* 2013). Puesto que el AA es utilizado para la síntesis de leucotrienos por lipooxigenasas y prostaglandinas por ciclooxigenasas, AEA también sirve como sustrato para estas enzimas para generar AEA hidroxilada y prostaglandin-etanolamidas respectivamente (Marnett *et al.* 2015). Además, la AEA es sustrato de la alcohol deshidrogenasa para generar araquidonoilglicina la cual se cree tiene efectos independientes de los receptores cannabinoides (Aneetha *et al.* 2009). En general, debido a la similitud estructural entre la AEA y sus metabolitos derivados por diferentes rutas metabólicas, no se descarta posean alguna actividad sobre los receptores cannabinoides o tal vez sean mecanismo de inactivación de esta.

### **2.11. EFECTO DE AEA SOBRE LA mADN**

Se ha observado que la AEA inhibe la diferenciación de los queratinocitos mediante un mecanismo dependiente del receptor CB1 y que está asociada con un incremento en la mADN. Así mismo, están involucradas las vías dependientes

de las MAPK p38 y p42/44 (Paradisi *et al.* 2008). Existe también evidencia que CB2, al ser activado por *trans*-cariofileno regula la  $\beta$ -oxidación a través de la vía SIRT1/PCG-1 $\alpha$  (Zheng *et al.* 2013). Esto podría sugerir que AEA, un compuesto endógeno, participe en la mADN-AA en células THP-1, ya sea activando a uno de los receptores cannabinoides o interactuando directamente con PPAR $\alpha$ .

## 2.12 SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE NAEs

La mayoría de las enzimas son proteína que catalizan reacciones bioquímicas en las células. Diversas enzimas tienen interés biotecnológico y han sido utilizadas para la síntesis de compuestos de interés biológico y farmacológico. Un claro ejemplo de ello, es la utilización de las lipasas. Las lipasas (hidrolasas de triglicéridos EC. 3.1.1.3) catalizan reacciones de hidrólisis, esterificación, *trans*-esterificación, amidación y epoxificación utilizando las condiciones apropiadas (Kidwai *et al.* 2009). De particular importancia ha sido el uso de la lipasa B de *Candida antártica* (CALB) NOVOZIM 435 con la cual ha sido posible la síntesis de alcanidas (Ley *et al.* 2004). Entre las alcanidas de importancia biológica se encuentran las NAEs que han sido sintetizadas mediante la reacción directa entre un ácido graso y etanolamina en solventes orgánicos (Plastina *et al.* 2009). En este contexto, CALB es capaz de catalizar la reacción de amidación con respecto a la esterificación produciendo principalmente amidas (Kidwai *et al.* 2009).



### **3. JUSTIFICACIÓN**

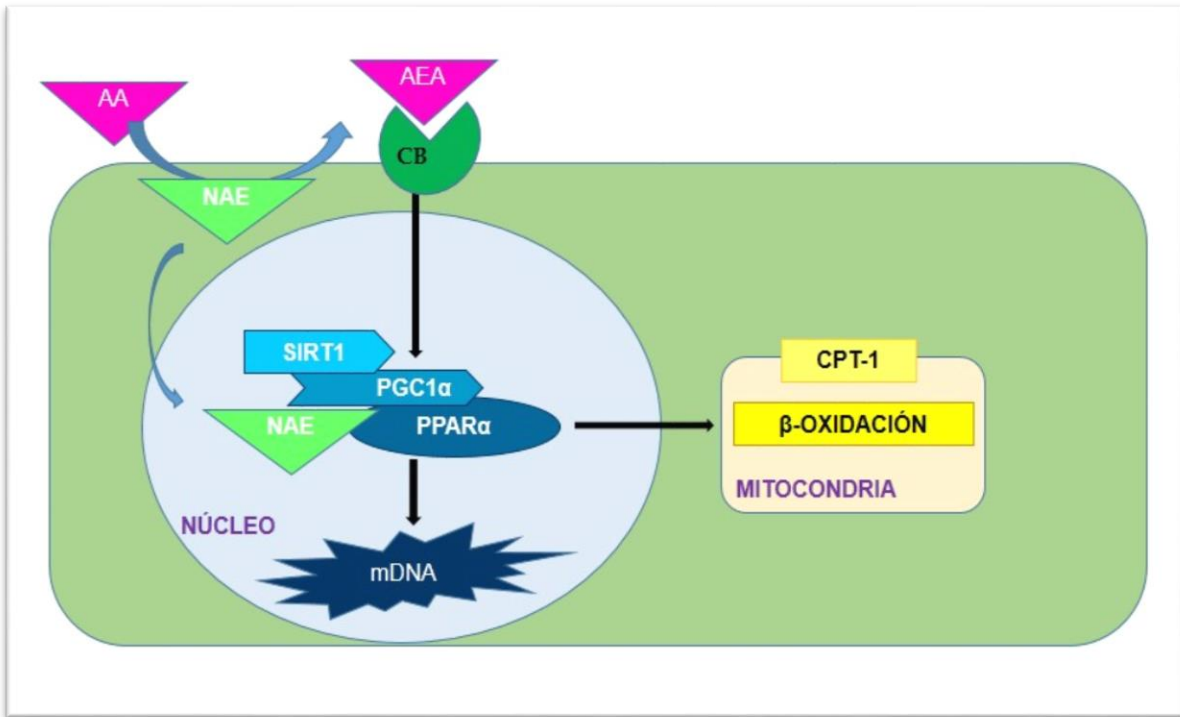
En diversas enfermedades no transmisibles como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis están asociadas con alteraciones en la metilación del ADN (mADN), todavía existe poca información en cuanto a cómo se producen estos cambios. De especial importancia para la aterosclerosis es el impacto de los factores nutricionales específicos, como los ácidos grasos, en la mADN. El ácido araquidónico, un ácido graso poli-insaturado induce metilación del ADN en células THP-1. Las células THP-1 pertenecen a una línea celular derivada de monocitos y son ampliamente utilizada para estudiar procesos inflamatorios como la aterosclerosis. De esta manera, la comprensión del mecanismo que provoca la mADN resultaría en nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de la enfermedad.



#### **4. HIPÓTESIS**

La activación de los receptores endocannabinoides por *N*-aciletanolamidas juega un papel en la metilación del ADN inducida por el ácido araquidónico en células THP-1.





**Figura 3. Vías hipotéticas de acción del ácido araquidónico.** El ácido araquidónico (AA) se metaboliza a anandamida (AEA) o produce otras *N*-aciletanolamidas (NAEs). La AEA activa receptores cannabinoides (CB) provocando la mADN ya sea mediada por la vía SIRT1/PGC1 $\alpha$  o por cinasas (No mostradas). Independientemente, las NAEs pueden interactuar directamente con PPAR $\alpha$  induciendo la mADN.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el papel de las *N*-aciletanolamidas (NAEs) en la metilación del ADN inducida por el ácido araquidónico en células THP-1.

### **5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Sintetizar y caracterizar NAEs específicas.
2. Determinar la concentración de NAEs en células THP-1 estimuladas con AA.
2. Analizar si NAEs específicas pueden reproducir la metilación del ADN inducida por el AA en células THP-1.
3. Analizar si los receptores CB1 y CB2 están involucrados en la metilación del ADN inducida por el AA en células THP-1.





## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. EQUIPO**

Para el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/EIMS) se utilizó un cromatógrafo de gases modelo 7890b con una columna DB5-MSUI (20 x 0.18 x 0.36), acoplado a un espectrómetro de masas modelo 5795b con ionización por impacto electrónico y separación de  $m/z$  por cuadrúpolo (EIMS), todos de la marca Agilent Technologies.

Para los cultivos celulares se utilizó una incubadora Blinder serie 1308173 modelo CB150UL acondicionada con CO<sub>2</sub>.

### **6.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

En nuestros experimentos se utilizó la línea celular de monocitos THP-1, la cual ha sido cultivada y utilizada en nuestro laboratorio desde el 2004. Las células THP-1 es una línea celular modelo para el estudio de la aterosclerosis y otros procesos inflamatorios (Qin 2012). Como control positivo, se evaluaron los niveles sanguíneos de NAEs en 12 mL de sangre de un sujeto sano en ayuno. La muestra fue almacenada a -60°C en un tubo que contenía EDTA.

### **6.3. MEDIO DE CULTIVO**

#### **6.3.1. Medio RPMI 1640 adicionado**

Al medio RPMI 1640 (Gibco) se le adicionó 10% de suero fetal bovino, 4 mM de glutamina, penincilina y estreptomina al 1% antes de ser utilizado en los ensayos.

### **6.4. SOLUCIONES “STOCK”**

#### **6.4.1. Preparación de ácido AA y oleico (AO)**

Se preparó una solución stock a 3 mM de cada uno de los ácidos grasos, AA (CAT506-32-1; Sigma Aldrich Cat: A9673-50MG) y AO (CAS 112-80-1; Sigma Aldrich Cat: O1008-5G) en combinación con albumina sérica bovina (BSA) en una proporción final 5:1. Para lo anterior, se utilizaron 30  $\mu$ M del ácido correspondiente y se disolvieron en 1 mL de agua destilada estéril. Las mezclas se incubaron a

100°C por un minuto para su completa disolución. Estas últimas se aforaron a 5 mL con agua destilada y se le adicionó un volumen igual de BSA a 0.5 mM a cada una de ellas. Ambas mezclas se incubaron a 37°C por una hora.

#### 6.4.2. Preparación de los estándares de las NAEs

Se utilizaron 6 estándares de las NAEs, de las cuales 3 fueron comerciales y adquiridas de la compañía Sigma Aldrich mientras que 3 fueron sintéticas enzimáticamente (**Cuadro 1**). Los estándares comerciales fueron diluidos en etanol 100% grado HPLC a una concentración final de 2.5 mg/mL. Para las pruebas y análisis por GC/EIMS se tomaron alícuotas de 1 mg/mL.

<b>Cuadro 1. Estándares de las N-aciletanolamidas</b>			
<b>ORIGEN</b>	<b>NOMBRE</b>	<b>ABREV.</b>	<b>CATÁLOGO</b>
<b>COMERCIAL</b>	Palmitoiletanolamida	PEA	P0359-10MG
	Oleoiletanolamida	OEA	O0383-10MG
	Araquidonoiletanolamida	AEA	A0580-5MG
<b>SÍNTESIS EN EL LABORATORIO</b>	Estereoiletanolamida	SEA	-----
	Linoleoiletanolamida	LEA	-----
	Linolenoiletanolamida	LNEA	-----

#### 6.4.3. Preparación de los inhibidores de los receptores cannabinoides

Se utilizaron los inhibidores específicos para los receptores cannabinoides. Para el receptor CB1, se empleó rimonabant {5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-N-1-piperidinyl-1H-pyrazole-3-carboxamida; CAS 168273-06-1 Cat: 9000484} también conocido como SR141716A, un antagonista competitivo/agonista inverso con una constante de inhibición (K<sub>i</sub>) de 1.98 ± 0.13 nM (Rinaldi-Carmona *et al.* 1994). Para el receptor CB2 se utilizó AM630 {6-iodo-2-methyl-1-(4morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl}(4methoxyphenyl)-methanone: CAS 164178-33-0 Cat: 164178-33-0}, un agonista inverso/antagonista (Ross *et al.* 1999; Bolognini *et al.*, 2012). AM630 posee baja afinidad por CB1 (Reggio 2006).

Ambos inhibidores fueron comprados a la empresa Cayman Chemicals. Tanto rimonabant como AM630 fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO; CAS 67-68-5; Sigma Aldrich Cat: 34869-100ML) y llevados a una concentración final de 6 mM. Se prepararon diluciones en DMSO de tal manera que, a todos los tratamientos se les adicionaron 5  $\mu$ L y obtener la concentración deseada. Se usó ese volumen de DMSO para obtener una concentración final menor a 0.05% y evitar toxicidad.

## **6.5. CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS**

Se utilizó la línea celular THP-1, la cual procede de un paciente con leucemia monocítica aguda. Estas fueron crecidas en medio RPMI 1640 adicionado e incubadas 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se cuantificaron cada 2 días y se mantuvieron a una densidad de 0.5 a 0.8 millones de células/mL para evitar el estrés producido por la alta densidad.

### **6.5.1. Estimulación de células THP-1 con NAEs**

Se estimularon células 10 millones de células THP-1 con las NAEs, PAE y AEA a las concentraciones de 0.5, 1 y 2  $\mu$ M por 24 horas. Se utilizó etanol como vehiculo ya que los estándares se encuentran diluidos en dicho solvente. Una vez estimuladas se tomaron 5 millones de células se utilizaron para la extracción de ADN y así determinar los niveles de metilación total mediante el análisis COBRA-ALU. El resto de las células se almacenó a -80°C para realizar otros análisis independientes.

### **6.5.2. Estimulación con AA y AO**

Para la estimulación de células THP-1 se les adicionó el volumen necesario del Stock 3 mM para llegar a una concentración final de 1 y 100  $\mu$ M del ácido graso. Posteriormente, los cultivos fueron incubados por 0, 1, 3 y 24 h. con las condiciones ya mencionadas. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, las células se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos, y lavadas con 2 mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) 2 veces y se resuspendieron en 2 mL de PBS

conteniendo 100  $\mu\text{M}$  de floururo de metilsulfonilo (PMSF; CAS 329-98-6; Sigma Aldrich Cat: P7626-5G) o solo en PBS. Las muestras almacenadas en PBS se utilizaron para la extracción de ADN y ARN, mientras que a las muestras que se le adicionó PMSF se utilizaron para la búsqueda de NAEs. El PMSF es un inhibidor de la FAAH, la principal enzima que degrada *N*-aciletanolamidas (Lin *et al.* 1998). Inmediatamente las células fueron almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. En este trabajo no se evaluó la presencia de NAEs ni metilación total de células estimuladas con AO.

### **6.5.3. Inhibición de los receptores cannabinoides**

Para determinar si los receptores cannabinoides están involucrados en el proceso de hipermetilación inducida por el AA, se utilizaron los inhibidores rimobanant y AM630 para CB1 y CB2, respectivamente. Se incubaron 10 millones de células THP-1 por una hora en presencia de los inhibidores a 0, 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  de manera independiente con su respectiva réplica bajo las condiciones previamente mencionadas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las células fueron estimuladas con 100  $\mu\text{M}$  del AA e incubadas bajo las mismas condiciones por 24 horas. Después de la incubación estas fueron centrifugadas a 3500 rpm y lavadas 2 veces con 2 mL del buffer PBS y resuspendidas en 2 mL del mismo buffer. Las células fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso en la determinación de la metilación total mediante el análisis COBRA-ALU.

### **6.5.4. Conteo y viabilidad celular**

El conteo de células se llevó a cabo utilizando el método de conteo en cámara de Neubauer. Brevemente, las células se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 minutos, y fueron resuspendidas en 1-3 mL de medio RPMI 1640. Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, donde se diluyeron en 980  $\mu\text{L}$  de medio RPMI y 10  $\mu\text{L}$  del colorante azul de tripano y se agitó suavemente. Finalmente se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se colocaron en la cámara de Neubauer para el conteo de células en el microscopio óptico. De la misma manera se realizó un conteo celular tanto de células vivas y muertas

presentes bajo cada tratamiento realizado en cada ensayo y así determinar la viabilidad celular.

## 6.6. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE NAEs

Se sintetizaron enzimáticamente en el laboratorio las NAEs de los ácidos esteárico (SEA), linoléico (LEA) y linolénico (LNEA) según Molina-Torres y colaboradores (2008). Para la síntesis se usó la enzima Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozim 435 de Sigma Aldrich), la cual se encuentra inmovilizada sobre resinas de acrílico. Se utilizaron como sustratos el ácido graso o su respectivo metil éster (**Cuadro 2**) y etanolamina (Baker). La enzima es capaz de utilizar ambos sustratos como sustrato (Kidwai *et al.* 2008). Los solventes utilizados para las reacciones fueron tolueno y cloroformo grado HPLC. Brevemente, en un reactival de 3 mL se adicionaron 20 mg de la enzima Novozym, 0.2 mM del ácido graso o su metil éster, 0.4 mM de etanolamina (Baker) en 2 mL de solvente. Adicionalmente, se agregaron 20 mg de sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Baker). Finalmente, la mezcla fue incubada a 70°C en constante agitación. La síntesis de NAEs fue monitorizada tomando 50 µL de la solución y sometidas a derivación con BISTFA (Ver más adelante) e inyectadas y analizadas por medio de GC-EIMS utilizando una columna DB1 y el método previamente establecido para alcanidas.

**Cuadro 2.** Sustratos utilizados para la síntesis enzimática de *N*-aciletanolamidas.

NAE SINTETIZADA EN EL LABORATORIO	ABREVIATURA	SUSTRATOS
Esterioiletanolamida	SEA	Ácido Esteárico (Sigma Aldrich ) + etanolamina ( )
Linoleoiletanolamida	LEA	Metil éster del ácido linoleico (Sigma Aldrich) + etanolamina
Linolenoiletanolamida	LNEA	Metil éster del ácido linolénico (Sigma Aldrich) + etanolamina

## **6.7. METODOLOGÍA PARA LA DETECCIÓN DE NAEs POR GC-EIMS**

Previo a la evaluación de la concentración de las NAEs, se decidió evaluar la presencia de PEA, OEA y AEA ya que estos estándares, al ser comerciales, se tienen disponibles en mayor cantidad.

### **6.7.1 Caracterización de NAEs por GC/EIMS**

Se diseñó el método para la detección de NAEs en el GC/EIMS y se denominó NAESDB5MUI20M. El programa del horno fue con una temperatura inicial de 150°C por 3 minutos, un incremento de 4°C/min hasta alcanzar una temperatura de 300°C mantenida durante 15 minutos. El tiempo de corrida de 55.5 minutos. La inyección de 1 µL es realizada de manera automática por el cromatógrafo y con la opción splitless, la cual nos permite inyectar completamente la muestra sin realizar algún tipo de partición.

Para la caracterización por GC/EIMS, los estándares fueron sometidos a derivación y así se obtuvieron los tiempos de retención y patrones de fragmentación en columna DB-5UI. De esta manera obtenemos derivados trimetilsililil de las NAEs (NAEs-TMS). Para la derivación se tomaron 10 µL (10 µg) de cada uno de los estándares y se colocaron en reacti-viales de vidrio y fueron secados mediante una corriente de nitrógeno. Se le adicionaron 80 µL del derivatizante BISTFA (N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida, CAS 25561-30-2; Sigma Aldrich Cat: 33027) y 20 µL de piridina (CAS 110-86-1; Sigma Aldrich Cat: 270970-100ML) y se incubó a 80°C por 30 minutos. Después de la incubación se dejó enfriar a temperatura ambiente (20-25°C) y se adicionó 100 µL de isooctano (2,2,4 trimetil pentano, CAS 540-84-1; Sigma Aldrich Cat: 34862). La mezcla fue colocada en insertos de vidrio contenidos en viales para ser analizados por GC-EIMS con el método NAESDB5MUI20M.

### **6.7.2. Diseño del método SIM (Selected Ion Monitoring) para NAEs**

Una vez obtenidos los patrones de fragmentación de las NAEs - TMS, estos fueron utilizados para diseñar el método SIM (Selected Ion Monitoring) y evaluar la concentración de las estas. Los criterios empleados para este fue la búsqueda de

iones abundantes y característicos de cada NAE –TMS en su respectivo tiempo de retención ( $R_T$ ). Este método nos permite monitorear iones característicos que corresponden a una parte específica de la molécula tomando en cuenta 1) el  $R_T$  y 2) la proporción de los iones en el espectro de masas.

### **6.7.3. Curvas de calibración para las NAEs**

Se realizaron curvas de calibración para las NAEs –TMS de PEA, OEA y AEA, con cantidades de 20, 40, 60, 80 y 100 pg utilizando el método SIM establecido. Se utilizó un volumen de derivación final de 50  $\mu$ L.

### **6.7.4. Determinación de NAEs en células THP-1**

Se estimularon 10, 30 y 50 millones de células THP-1 con 100  $\mu$ M de AA por 0, 1, 3, y 24 horas. Cada una con dos repeticiones a excepción de las estimuladas durante el tiempo 0. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, las células fueron centrifugadas a 3,500 rpm por 5 minutos y resuspendidas en 2 mL PBS conteniendo 100  $\mu$ M de PMSF (para evitar la degradación de las NAEs). Estas fueron almacenadas a  $-80^\circ\text{C}$  para su posterior uso en la extracción y purificación de NAEs.

Para la extracción de NAEs se utilizó el protocolo propuesto por Balvers y colaboradores (2013) con algunas modificaciones. Este método se basa en la extracción de compuestos lipídicos totales con isopropanol, y una posterior purificación utilizando un cartucho de purificación C8 eluído con acetonitrilo al 80%. Sin embargo, acorde a las especificaciones del cartucho, el acetato de etilo es un mejor eluyente por lo cual se eligió este para trabajar. Brevemente, las muestras fueron descongeladas y traspasadas a tubos de vidrio. Las células fueron lisadas por sonicación durante 30 minutos y secadas a evaporación con vacío utilizando el multievaporador. Una vez seca la muestra, se le adicionó 400  $\mu$ L de isopropanol conteniendo 100  $\mu$ M de PMSF y se agitó ligeramente. En este paso se adicionaron 30  $\mu$ g del estándar interno, dodecanoiletanolamida (NAE C12:0). Como control de la extracción en un tubo independiente, se le mezclaron en isopropanol 10  $\mu$ g de cada una de las NAEs, y 30  $\mu$ g del estándar interno NAE

C12:0 y se continuo según el protocolo. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos y se tomó el sobrenadante. Para desesterificar NAEs, se le adicionó 200  $\mu$ L de NaOH 0.5 N disuelto en metanol, y se incubaron a 60°C por 40 minutos. Se le adicionaron 4 mL de agua mili-Q conteniendo 0.13% de ácido trifluoroacético (TFA; CAS Sigma Aldrich Cat: 91700). La muestra (4.5 mL) se hizo pasar por una columna C8. Una vez pasada la muestra, se lavó con acetonitrilo al 20% conteniendo 0.1% de TFA y finalmente eluída con 3 mL de acetato de etilo. El cartucho C8 antes de pasar la muestra fue activado con 1 mL de metanol y lavado con 1 mL de agua mili-Q.

Las muestras (3 mL) fueron concentradas con flujos de nitrógeno hasta aproximadamente 0.5 mL. Estas fueron colocadas directamente en insertos y evaporadas hasta sequedad a una temperatura de 60°C. Una vez secas, se les adicionó 40  $\mu$ L d BISTFA y 10  $\mu$ L de piridina e incubadas a 70°C por 40 minutos. Estas fueron inyectadas y analizadas por GC/EIMS

#### **6.7.5. Determinación de NAEs en células sanguíneas**

Alternativamente, debido a ciertos problemas al utilizar la extracción en fase solida por la utilización de grandes cantidades de muestra y tienden a saturar el cartucho C8, se decidió modificar el protocolo y pasar directamente a una extracción basada en sistema de solventes en sangre humana tal como se describe en seguida. Se utilizaron 12 mL de sangre fresca al que se le adicionaron 5 mL de buffer de fosfatos (PBS) conteniendo 100  $\mu$ M de floururo de fenilmetanosulfonilo (PMSF) por cada 10 mL de sangre fresca. Las muestras fueron centrifugadas en tubos Solvats de 50 mL a 13,000  $\times g$  a 4°C. Posteriormente, se separa la fase celular de la fase plasmática. Para la fase celular se ajustó a un volumen final de volumen a 15 mL con buffer de fosfatos (100  $\mu$ M de PSMF) y se agitó vigorosamente y se dosificaron 2.5 mL/tubo en tubos de 15 mL. Tanto las muestras de plasma como de células sanguíneas fueron congeladas inmediatamente con hielo seco y sometidas a liofilización.

Una vez liofilizadas, a cada una de las muestras se les realizó una extracción lipídica sin pasar por columna tal como se describe, cada muestra con



su respectiva repetición biológica. Se adicionaron 3 mL de isopropanol (2-propanol; Karal) conteniendo 100  $\mu$ M de PMSF y 1 mL de la solución saturada de cloruro de sodio (NaCl; Baker) a cada una de las muestras y se centrifugó brevemente y el sobrenadante fue transferido a tubos de vidrio de 50 mL. Se repitió la extracción adicionando solo isopropanol dos veces más. El extracto fue incubado a 70°C por 5 minutos y posteriormente evaporado hasta sequedad en multievaporador. Se adicionaron 3 mL de hidróxido de sodio (NaOH) a 0.5 M y colocadas en baño María a 60°C por 40 minutos, lo anterior con el objetivo de saponificar los ácidos grasos y des-esterificar las NAEs que se encuentran en las NAPEs. Para eliminar los ácidos grasos saponificados el extracto se dejó enfriar a temperatura ambiente por 10 minutos. Después se adicionaron 2 mL de agua destilada y 1 mL de agua saturada de NaCl y 3 mL de acetato de etilo. Mezclar brevemente por inversión o con vórtex y centrifugar por 5 minutos. Repetir el lavado con acetato de etilo 2 veces más. La muestra fue evaporada a sequedad en una liofilizadora. Una vez secas las muestras, estas fueron derivatizadas adicionando 40  $\mu$ L de BISTFA y 10  $\mu$ L de piridina e incubadas a 80°C durante 30 min. La reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue secada bajo flujo de nitrógeno y una vez seca se resuspendió en 50  $\mu$ L de isooctano. Finalmente se colocaron en insertos para ser analizadas por GC/EIMS usando el método NAESDB5UI20M, el cual busca iones característicos de las NAEs. Los cromatogramas obtenidos fueron analizados por el programa MassHunter versión 10.0.30319.1 desarrollado por Agilent Technologies.

## **6.8. ANÁLISIS COBRA-ALU EN CÉLULAS THP-1**

Para la cuantificación de la metilación total del ADN se utilizó como referencia los estados de metilación de los elementos ALU. Se utilizaron alícuotas de muestras de diferentes ensayos con diferentes tratamientos como son la estimulación de células con NAEs y con AA en los tiempos mencionados.

### **6.8.1. Extracción de ADN**

La extracción del ADN genómico se realizó mediante el protocolo de aislamiento de ADN de cerebro o TL-Brain. Brevemente, las células fueron centrifugadas a 13,000 x g y se descartó la fase líquida en la cual se encontraban resuspendidas. A las muestras se le adicionaron 600 µL del Buffer TL-Brain (10 mM de Tris-HCl pH 7.4, 10 mM de EDTA, 200 mM de NaCl) y se homogenizaron con agitación suave. Se le adicionaron 75 µL de sulfato dodecil de sodio al 10% (SDS 10%) y 7.5 µL de proteinasa K (30 mg/mL) y se dejaron incubando por 5 horas a 55°C con agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se le adicionaron 690 µL de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 vol/vol/vol) y se mezclaron con agitación suave por 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g por 5 minutos, y se colectaron 500 µL de la fase acuosa a tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevos. Se añadió 1 volumen de cloroformo a cada una de las muestras y se mezclaron por inversión. Los tubos fueron centrifugados a velocidad máxima por 5 minutos y la fase acuosa fue transferida a tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevos. Posteriormente, se le adicionaron 50 µL de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol al 100% y se incubaron toda la noche a -20°C. Los tubos fueron centrifugados a velocidad máxima por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con etanol al 70% y nuevamente se centrifugaron a velocidad máxima por 15 minutos y se volvió a descartar el sobrenadante. El pellet fue secado a temperatura ambiente (28°C) y resuspendido en agua conteniendo 0.5 µL de RNasa A (70 µg/mL). Las muestras de ADN fueron analizadas en geles de agarosa al 1% conteniendo gel red como colorante de tinción y colocada en una cámara electroforética y corrido a un voltaje de 70 mV por 40 minutos. Finalmente, cada una de las muestras fueron cuantificadas en Nanodrop.

### **6.8.2. Tratamiento del ADN genómico con bisulfito**

Para el tratamiento del ADN con bisulfito se utilizó el Kit DNA Methylation-Gold (Zymo Research Cat: D5005). Para esto se tomaron alícuotas de 0.5-1 µg de ADN y se colocaron en tubos de PCR fueron aforadas con agua inyectable a un

volumen final de 20  $\mu\text{L}$  y se siguió el manual de manufactura del kit. Brevemente, a las muestras se le adicionó 130  $\mu\text{L}$  del reagente de conversión CT y se incubaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones: 98°C por 10 minutos y 64°C por 2.5 horas. Transcurrido el tiempo, se adicionó 600  $\mu\text{L}$  del buffer M-binding a una columna IC Zymo-Spin previamente preparada y se le adicionó la muestra (aprox. 150  $\mu\text{L}$ ) y se mezcló por pipeteo. Se centrifugó por 30 segundos a 10,000  $\times g$  y se descartó la fase líquida que eluyó. La columna se lavó con 100  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado y se centrifugó por 30 segundos a 10,000 rpm. Se adicionó 200  $\mu\text{L}$  del Buffer M de desulfatación y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Después de la incubación se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos y se descartó la elución. Se agregó 200  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado M a la columna y centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos y descartó el sobrenadante esto se realizó dos veces. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL nuevo y se adicionó 12  $\mu\text{L}$  de agua directamente a la matriz de la columna. Se centrifugó a máxima velocidad por 30 segundos y se guardó la fase eluyente a -20°C hasta su posterior uso.

### **6.8.3. Amplificación de los elementos ALU**

Los elementos ALU fueron amplificados usando los primers AluF: 5'-GGY GYG GTG GTT TAY GTT TGT AA-3' y AluR: 5'-TTA ATA AAA ACR AAA TTT CAC CAT ATT AAC CAA AC-3'. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos para PCR adicionando 2  $\mu\text{L}$  de ADN genómico tratado con bisulfito, 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los oligonucleótidos (10 pmol), 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (Invitrogen), 1 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM, 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X pcr- $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), y 0.05  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerasa (Invitrogen) y aforadas a 50  $\mu\text{L}$  con agua inyectable. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: una temperatura inicial de 94°C por 3 minutos, 94°C como temperatura de desnaturalización por 30 segundos, una temperatura de alineamiento de 53°C por 30 segundos y finalmente una temperatura de elongación a 72°C por 30 segundos. Las temperaturas de desnaturalización, alineamiento y extensión fueron sometidas por

55 ciclos. El producto de las amplificaciones fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% y teñido con gel red, a un voltaje de 90 mV por 30-40 minutos.

#### **6.8.4. Análisis de la metilación total**

Los productos de PCR de los elementos ALU fueron colocados en tubos de PCR y digeridos con la enzima TaqI. Para la digestión se adicionaron 2  $\mu$ L de BSA al 0.1%, 2  $\mu$ L del Buffer TaqI 10X y 0.2  $\mu$ L de la enzima TaqI 10 U/ $\mu$ L (Invitrogen). Estos fueron incubados en un termociclador a 65°C por 16 horas. Los productos de la digestión fueron analizados en un gel de agarosa 3% a 90 mV por 40-50 minutos. Se le adicionaron 5  $\mu$ L del buffer de carga con gel red para ser visualizadas y capturadas en un fotodocumentador Bio-Rad. Las bandas obtenidas se analizaron y cuantificaron mediante el programa Quantity One (Bio-Rad) y determinar los niveles de metilación total como sugiere Sirivanichsuntorn y colaboradores (2013).

### **6.9. EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES**

Para determinar los niveles de expresión de los genes codificantes para los receptores CB1 (*CNR1*) y CB2 (*CNR2*) se aisló y purificó ARN procedente de 5 millones de células THP-1 estimuladas con 1 y 100  $\mu$ M de AA y AO durante 0, 1, 3, 24, 48 horas. Para la extracción de ARN se utilizó el reagente TRIZOL (ThermoFisher Scientific Cat 15596018), siguiendo el protocolo del fabricante,

#### **6.9.1. Extracción de ARN**

Las células se centrifugaron a velocidad máxima por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL del reagente TRIZOL. Las muestras se homogenizaron utilizando la punta con pipeta. El homogenizado fue almacenado a -80°C durante toda la noche. La muestra se incubó a 30°C por 5 minutos (puede en un rango de 15-30°C). Se adicionó 0.2 mL de cloroformo y agitó mediante inversión por 15 segundos y posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Se centrifugó a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos. La fase orgánica se almacenó -60°C. Esta última puede

ser utilizada para la extracción de ADN y proteínas. Se agregó 0.5  $\mu\text{L}$  de isopropanol e incubó a temperatura ambiente por 10 min y centrifugó a  $12,000 \times g$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75% y agitó brevemente en el vórtex y se centrifugó a  $7,500 \times g$  por 5 min a  $4^\circ\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. Se secó la pastilla a vacío por 10 min y se disolvió en 30  $\mu\text{L}$  de agua libre de RNAsas. Se corroboró a integridad en un gel de agarosa para después ser cuantificado en el Nanodrop. Se adicionó DNAsa ( $1 \text{ U } \mu\text{g}^{-1}$ ) y almacenó a  $-60^\circ\text{C}$ .

### **6.9.2. Síntesis de ADNc**

Para la síntesis de ADNc se utilizó la enzima Súper Script III. En un tubo de PCR se colocó 500 ng de RNA y se adicionó 1  $\mu\text{L}$  de oligo dT y 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs y se aforó a 13  $\mu\text{L}$  con agua estéril. Se mezcló y se incubó a  $65^\circ\text{C}$  por 5 minutos y posteriormente se incubó por 1 minuto. Después se le agregó 7  $\mu\text{L}$  de la Super script mix: 4  $\mu\text{L}$  de buffer First Strand 5x, 1  $\mu\text{L}$  de DTT, 0.5  $\mu\text{L}$  de inhibidor Rnase Out, 0.7  $\mu\text{L}$  de enzima Super Script III y 0.8  $\mu\text{L}$  de agua. Finalmente se incubó  $50^\circ\text{C}$  por 50 min y se volvió a incubar a  $58^\circ\text{C}$  por 5 minutos. Este se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$  para la amplificación de *CNR1* y *CNR2*.

### **6.9.3. Amplificación de *CNR1* y *CNR2*.**

Se determinaron los niveles de expresión de los receptores CB1 y CB2 según Rajesh *et al.* 2008. Para lo anterior, se utilizaron alícuotas de ADNc procedentes de células THP-1 estimuladas con 100  $\mu\text{M}$  de AA en los tiempos 0, 1, 3 y 24 horas. Para la amplificación del receptor CB1 se utilizaron los oligonucleótidos 5'-TTCCCTCTTGTGAAGGCACTG-3' (sentido) y 5'-TCTTGACCGTGCTCTTGATGC-3' (reverso) el cual genera un amplicón de 132 pb; para el receptor CB2 5'-TTTGCTTTCTGCTCCATGCTG-3' (sentido) y 5'-TTCTTTTGCCTCTGACCCAAG-3' (reverso) con un producto de 150 pb. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: temperatura inicial de  $95^\circ\text{C}$  por 2 minutos, 30 ciclos de una temperatura de desnaturalización de  $94^\circ\text{C}$  por 30 segundo, de hibridación a  $60^\circ\text{C}$  y de extensión a  $72^\circ\text{C}$ . Las amplificaciones fueron

observadas en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con gel red y observados en un trans-iluminador BioRad. El producto de las amplificaciones son de 132 y 150 pb para los receptores CB1 y CB2, respectivamente. Lo anterior fue analizado *in silico* utilizando la página BiSearch: Primer design and search tool (<http://bisearch.enzim.hu/>).

#### **6.9.4. Cuantificación de la expresión génica.**

Para la cuantificación, cada una de las bandas fue analizada usando el programa Quantity One (Bio-Rad). Finalmente, los valores obtenidos fueron normalizados utilizando como referencia la expresión del gen constitutivo GADPH.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. IDENTIFICACIÓN DE NAEs POR GC/EIMS

Para corroborar la producción de NAEs por la enzima lipasa B de *Candida antarctica* Novozim 435 se tomó una alícuota de cada vial donde se realizaron las reacciones y se sometieron a derivatización con BISTFA y fueron analizadas por GC/EIMS en una columna DB1MS mientras que los estándares comerciales en una columna DB5UI. En el presente trabajo no se determinó la actividad enzimática ya que existen trabajos previos de éste donde se evaluó el efecto de solvente, la temperatura, la cantidad de sustrato y la cantidad de enzima, así como el uso de diversos sustratos en la producción de NAEs utilizando tres métodos (Kidwai et al. 2009). Para corroborar su estructura química se justificaron los 10 picos más abundantes de cada NAE - TMS. En el **Cuadro 3** se muestra el tiempo de retención y en la **Figura 4 - 9**, los espectros fragmentación de los estándares de las (NAEs - TMS) los cuales son similares a los obtenidos por Chapman y Cadas y sus respectivos colaboradores (1999 y 1997). En estos últimos se observaron 3 iones característicos de las NAEs - TMS: 1) el ion molecular  $M^+$ ; 2) el ion  $m/z=116$ , producto de la eliminación de la etanol TMS; y el ion  $m/z=M^+-CH_3$  resultado de la eliminación de un grupo metilo. Además, para cada una de las NAEs - TMS analizadas existe un ion abundante el cual proviene de la cadena acilo ( $m/z=Acilo$ ). Finalmente, para la linoleoiletanolamida (LNEA - TMS) no se encontraron espectros de fragmentación en la literatura (**Figura 9**).

**Cuadro 3. Tiempo de retención de los estándares de las N-aciletanolamidas silanaizadas.**

ORIGEN	NAE	DERIVADO	COLUMNA	R <sub>T</sub>
COMERCIAL	Palmitoiletanolamida	PEA-TMS	DB5UI	28.745
	Oleoiletanolamida	OEA-TMS	DB5UI	32.022
	Anandamida	AEA-TMS	DB5UI	34.335
SINTÉTICA	Estearoiletanolamida	SEA-TMS	DB1MS	38.51
	Linoleoiletanolamida	LEA-TMS	DB1MS	37.80
	Linoleonoiletanolamida	LNEA-TMS	DB1MS	38.21

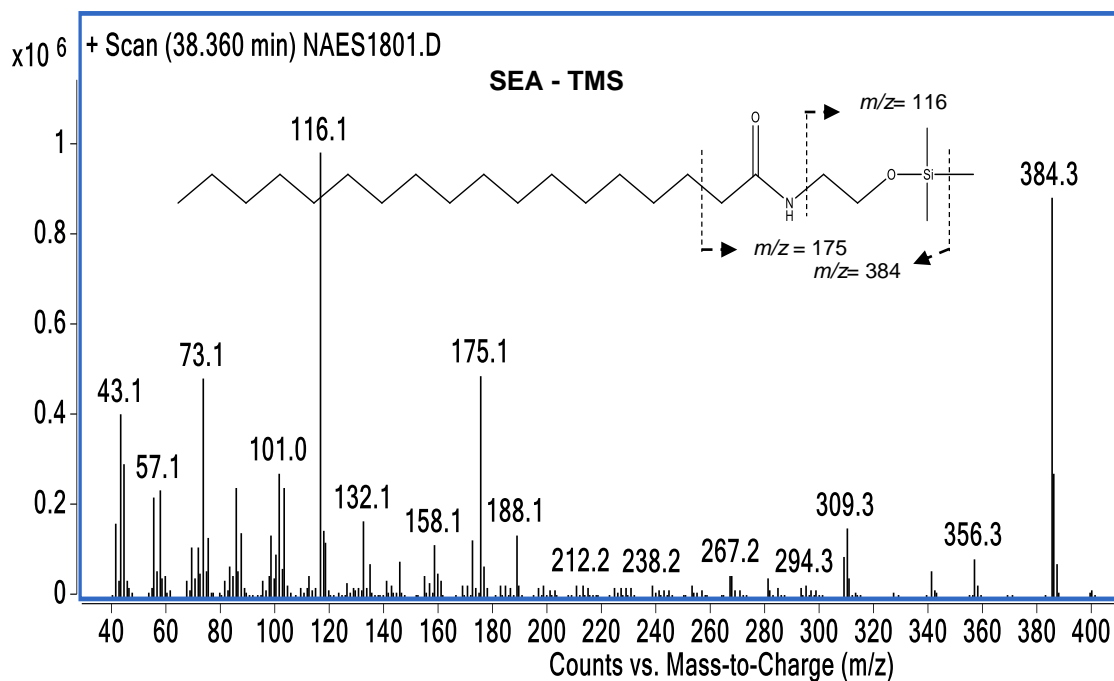


Figura 4. Espectro de masas de la estearoiletanolamida silanizada.

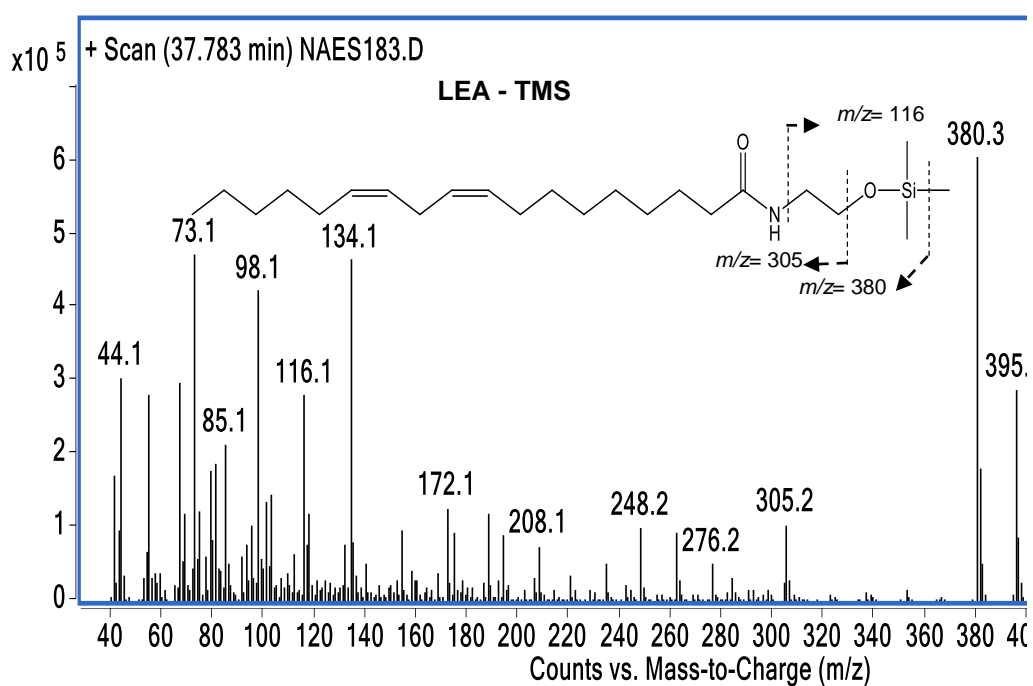


Figura 5. Espectro de masas de la linoleoiletanolamida silanizada.



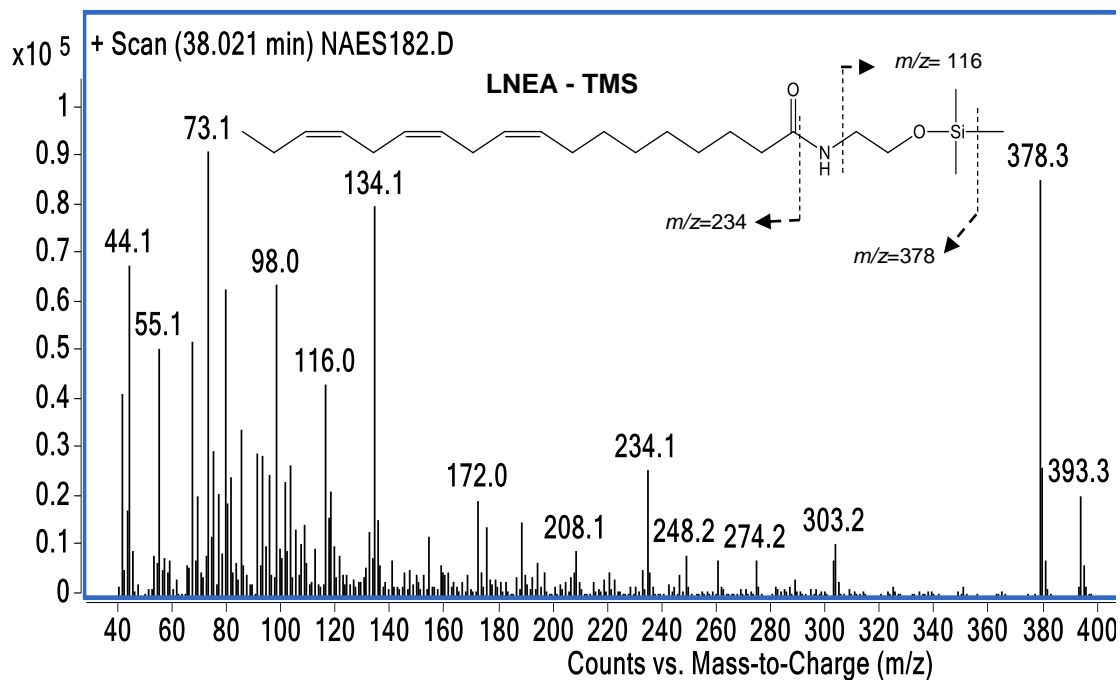


Figura 6. Espectro de masas de la linoleoiletanolamida silanizada.

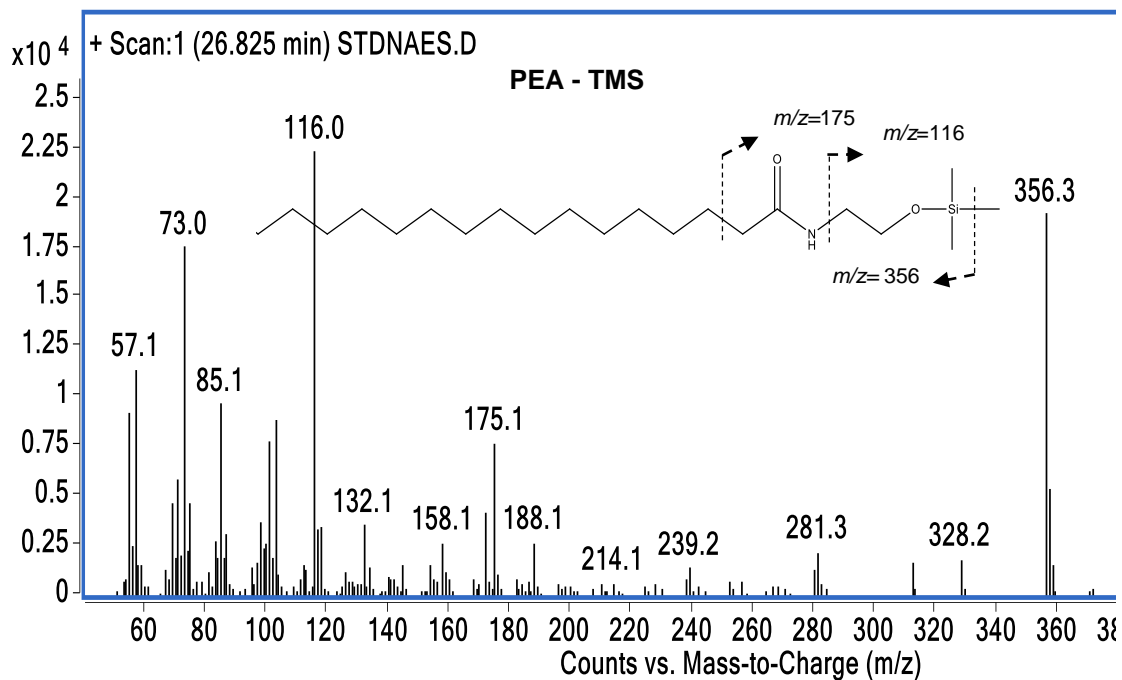
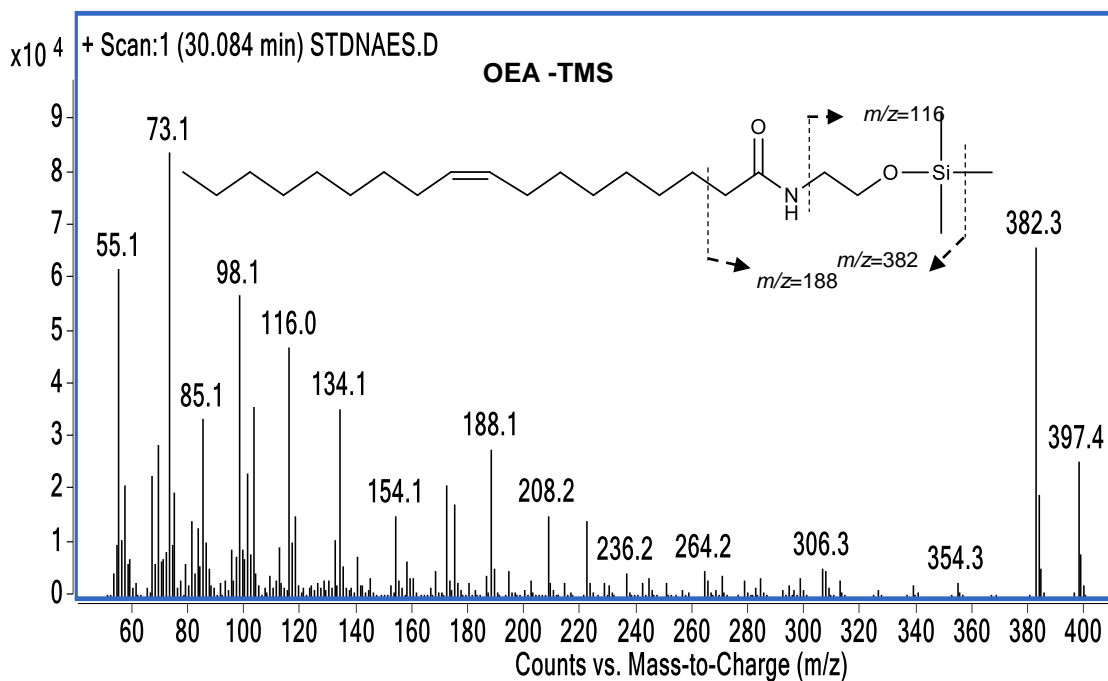
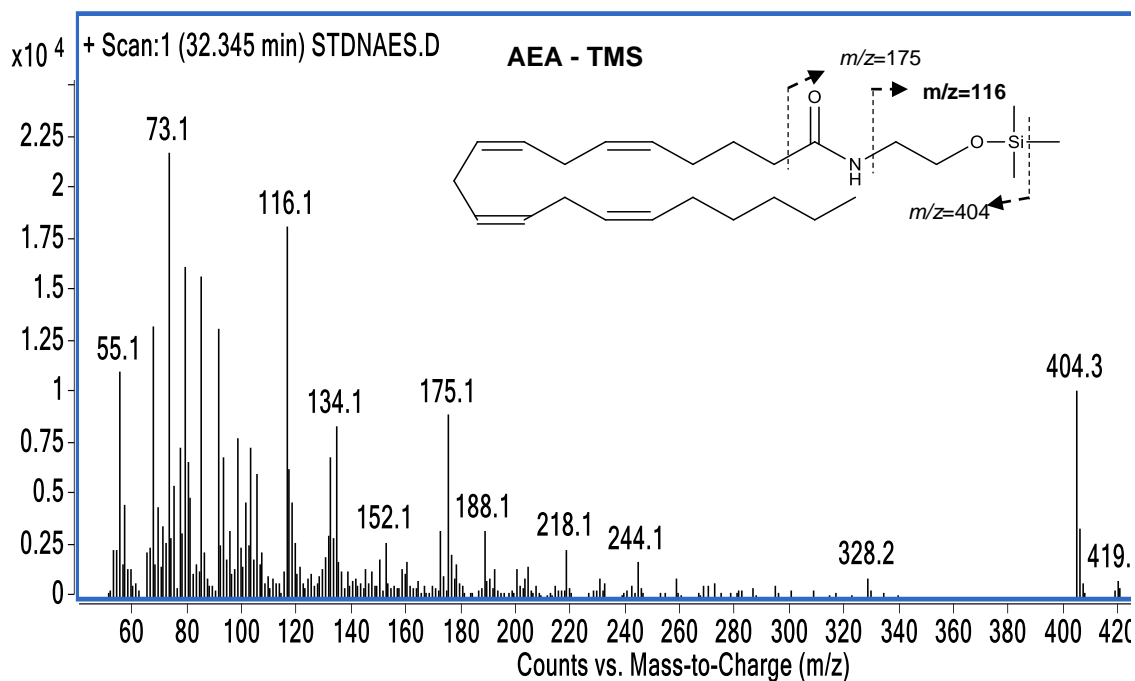


Figura 7. Espectros de la palmitoiletanolamida silanizada.



**Figura 8. Espectro de masas de la oleoiletanolamida silanizada.**



**Figura 9. Espectro de masas de la anandamida silanizada.**

## 7.2. DETERMINACIÓN DE NAEs EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Como previamente se mencionó, antes de iniciar la evaluación de todas las NAEs, se decidió realizar la determinación de los estándares comerciales PEA, OEA y AEA en muestras biológicas, ya que se disponían de mayor cantidad.

### 7.2.1. Diseño de método SIM para las NAEs

Para el diseño del método SIM se utilizaron 4 iones principales para las NAEs comerciales derivatizadas: 1) el ion  $m/z = M^+ -CH_3$ ; 2) el ion  $m/z = 116$ ; 3)  $m/z=Acilo$ ; y 4) el ion molecular  $M^+$  (**Cuadro 4**). Con lo anterior el método NAESDB5UI20M se actualizó. De esta manera ahora se obtuvieron cromatogramas de tipo SIM para la determinación de NAEs en las muestras biológicas.

**Cuadro 4. Iones característicos de las *N*-aciletanolamidas silanizadas para el diseño del método SIM (Selected Ion Monitoring).**

<b>N-ACILETANOLAMIDA</b>	<b>ABREVIATURA DEL DERIVADO</b>	<b>IONES (<math>m/z</math>)</b>
<b>Palmitoiletanolamida</b>	PAE-TMS	116, 175, 356, 371
<b>Oleoiletanolamida</b>	OEA-TMS	116, 188, 382, 397
<b>Anandamida</b>	AEA-TMS	116, 175, 404, 419

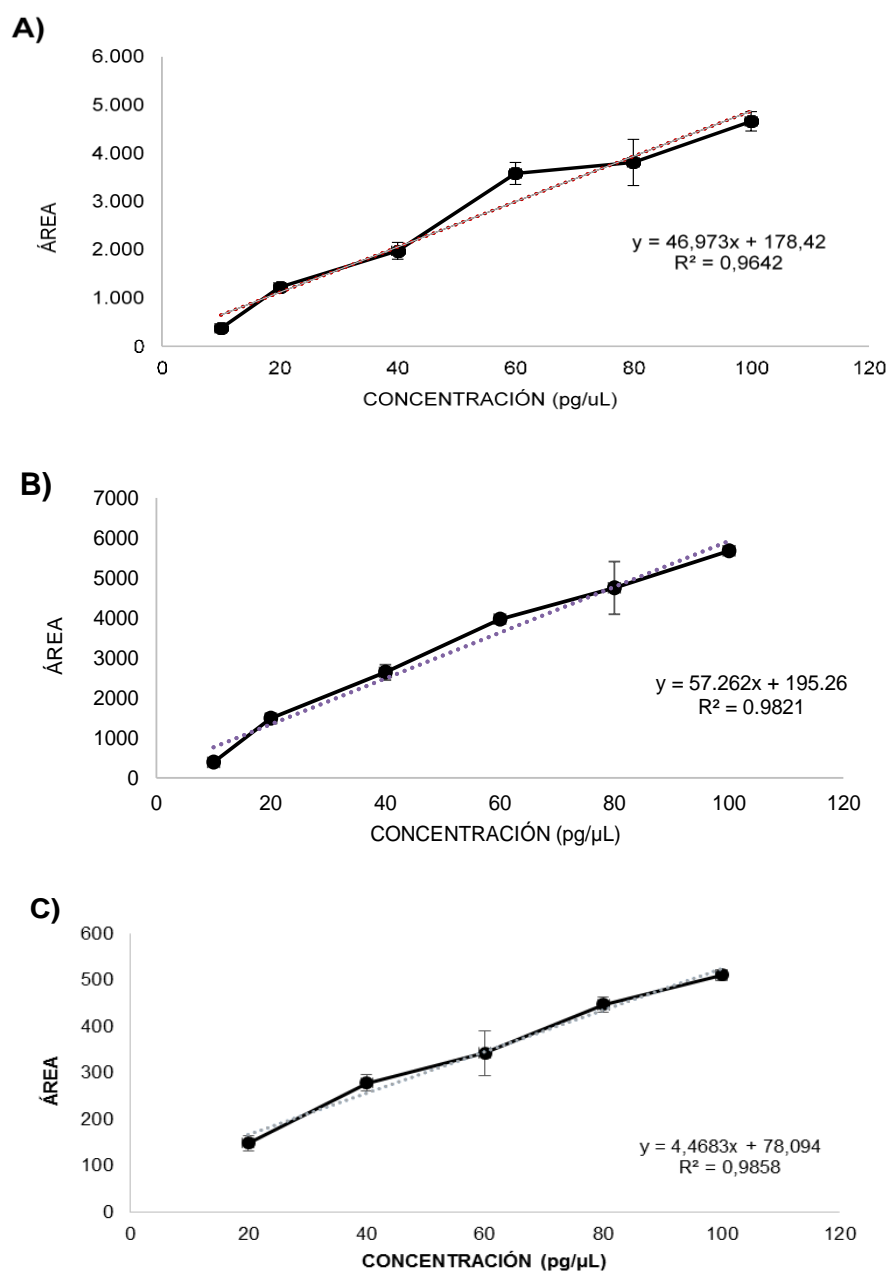
### 7.2.2. Curva de calibración para las NAEs

Se obtuvieron curvas de calibración de 20 a 100 pg/ $\mu$ L NAEs - TMS del **Cuadro 4** de acuerdo al método NAESDB5UI20M. La **Figura 10** muestra las curvas de calibración obtenidas para las estas.

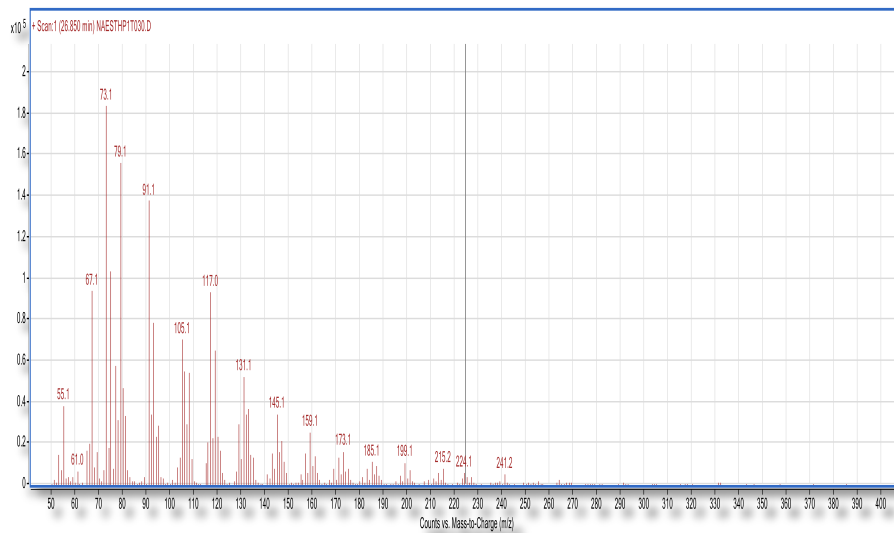
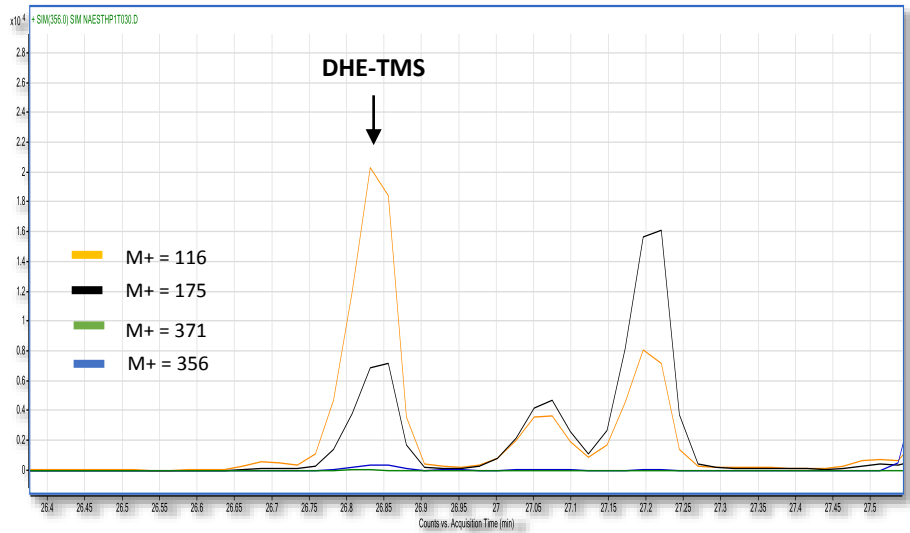
### 7.2.3. Determinación de NAEs en células THP-1

Por medio de GC/EIMS se encontró una señal en el tiempo de retención de la PEA - TMS. Sin embargo, un análisis detallado del cromatograma SIM mostró que la proporción entre el ion  $m/z=356$  es menor en comparación a los iones  $m/z=175$  y  $m/z=116$  en éste. El espectro de masas encontrado y la comparación

con la base de datos NIST arrojó una similitud con el ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico trimetilsilil éster. Este comparte los iones característicos de PEA - TMS (**Figura 11**).



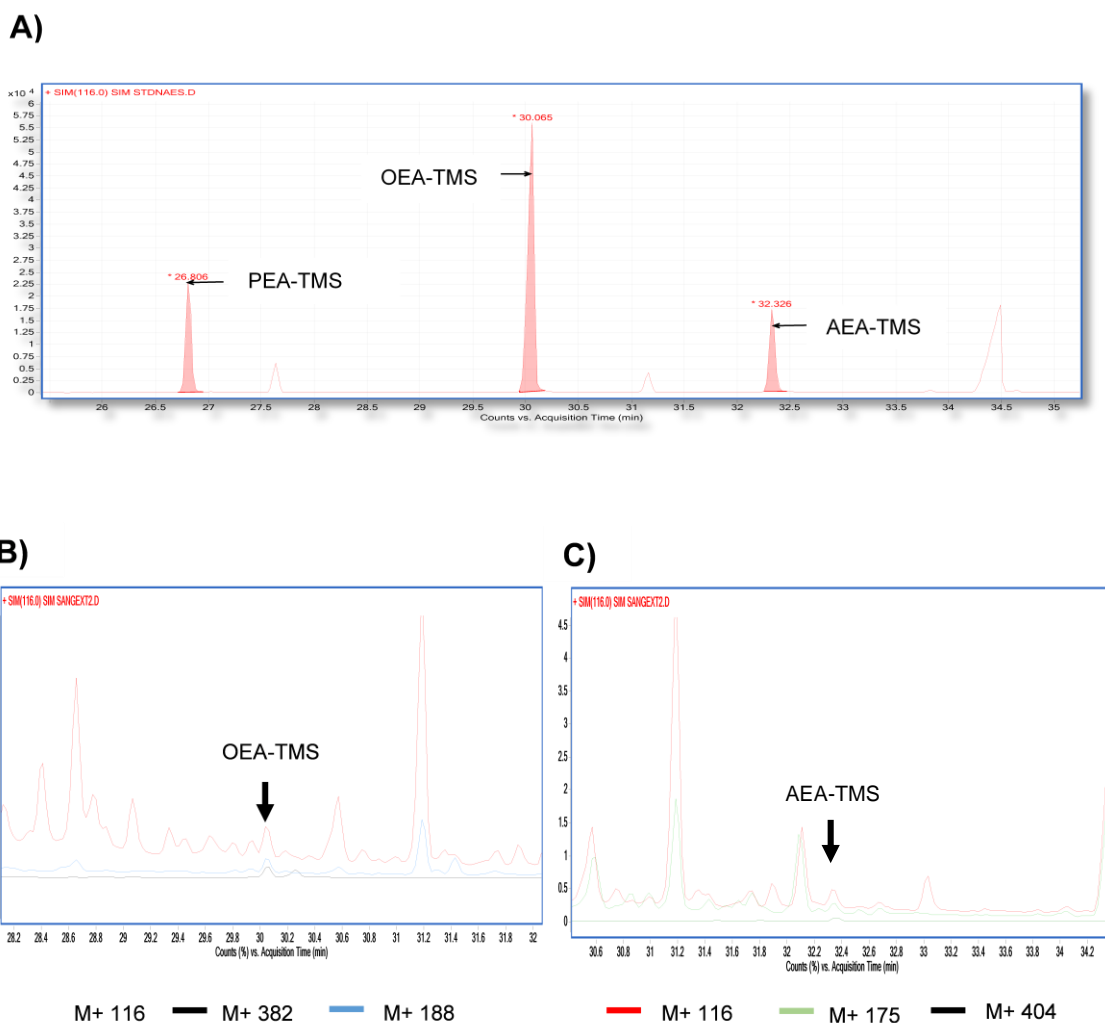
**Figura 10. Curvas de calibración por las *N*-aciletanolamidas silanizadas. A) pamitoiletanolamida, B) oleoiletanolamida y C) anandamida.**



**Figura 11. Algunos ácidos grasos pueden interferir en la determinación de las *N*-aciletanolamidas.** En A) se muestra el cromatograma del ácido docohexaenoico silanizado (DHE-TMS), un ácido graso que posee un tiempo de retención similar a palmitoiletanolamida silianizada y en B) su patrón de fragmentación.

## 7.2.4. Determinación de NAEs en células sanguíneas

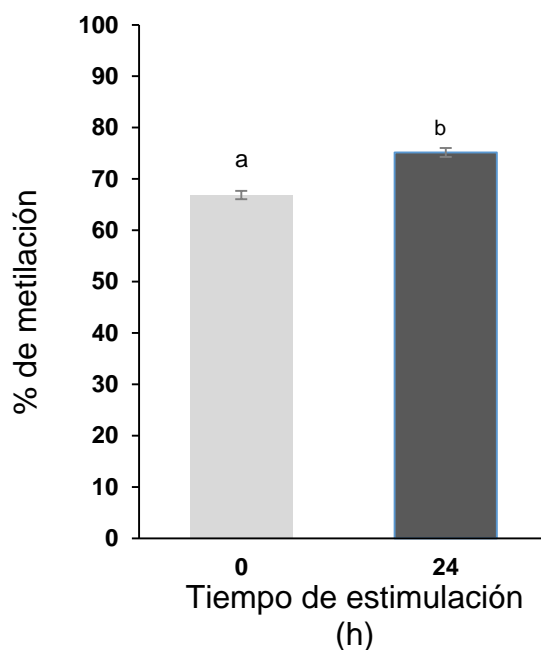
En muestras sanguíneas, se detectó AEA y OEA. Debido a la baja concentración a la cual se encontraron no fue posible su cuantificación. Sin embargo, no se detectó PEA (Figura 12).



**Figura 12. Detección de oleoiletanolamida (OEA) y anandamida (AEA) en sangre.** A) Cromatograma de los estándares PEA, OEA y AEA silanizadas (TMS); B) señales de los iones de la OEA-TMS; C) de AEA-TMS. PEA = palmitoiletanolamida.

### 7.3. ANÁLISIS COBRA-ALU EN CÉLULAS THP-1

Experimentos previos mostraron que el aa induce un incremento en la mADN de los elementos ALU (medido por COBRA-ALU) que refleja los niveles totales en la mADN medido por HPLC (Silva-Martínez *et al.* 2016). Para reproducir lo anterior, se estimularon células THP-1 con 100  $\mu$ M de AA y se analizó su efecto sobre la mADN por el análisis COBRA-ALU. Se confirmó que el AA aumenta niveles de metilación de los elementos ALU I a las 24 horas después de la estimulación (**Figura 13**).



**Figura 13.** El efecto de la estimulación con 100  $\mu$ M de ácido araquidónico por 24 horas sobre la mADN de ALU I en células THP-1. *a* y *b* indican diferencias significativas entre los dos tratamientos ( $p=0.05$   $n=4$ ; 2 repeticiones biológicas y técnicas).

#### 7.4. ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS THP-1 CON NAEs ESPECÍFICAS

Para entender si NAEs específicas son capaces de recapitular la respuesta de mADN-AA, se estimuló células THP-1 con PEA y AEA. Primero se estimó la viabilidad celular a concentraciones de 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  de ambos (**Figura 14A**). Solo la estimulación con 1 y 2  $\mu\text{M}$  de PEA mostró un efecto sobre la viabilidad celular respecto al control o vehículo (etanol) por lo cual fueron excluidas de los análisis. Posteriormente se procedió a estimular células THP-1 por 24 horas con PEA y AEA a las concentraciones que no afectaban la viabilidad celular y se midió el efecto sobre la mADN de elementos ALU I usando la técnica COBRA-ALU (**Figura 14B**). A pesar de que ninguna de las estimulaciones con NAEs pudieron replicar la mADN de elementos ALU I, se observó una tendencia en un incremento de 4.7% en la mADN al estimular células THP-1 de 2  $\mu\text{M}$  de anandamida con respecto al control.

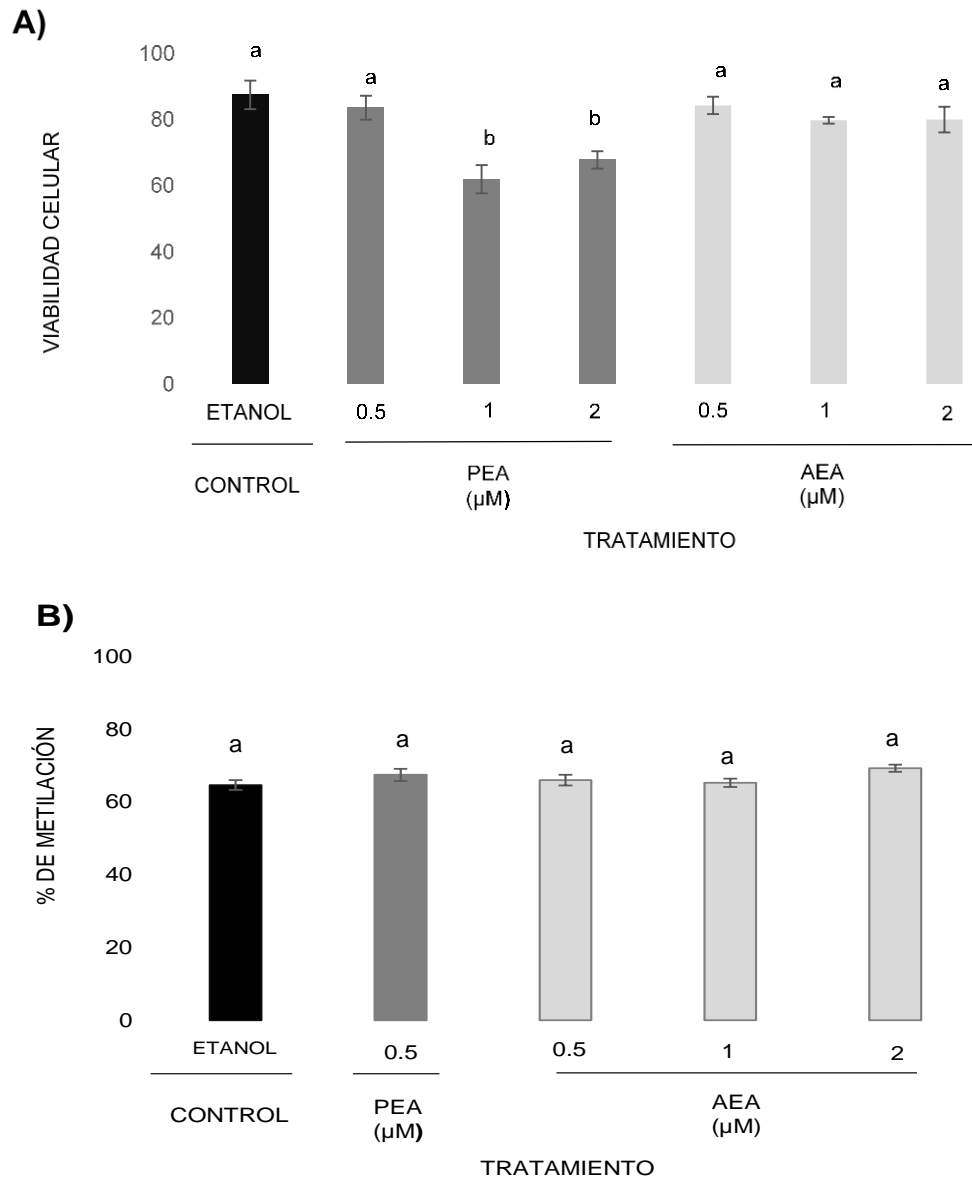
#### 7.5. EFECTO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES SOBRE LA mADN-AA.

##### 7.5.1. Expresión génica de los receptores cannabinoides.

Para determinar si existe una asociación entre la mADN y la expresión de los genes *CNR1* y *CNR2* (que codifican para los receptores CB1 y CB2, respectivamente) se realizó RT-PCR usando ARNs derivados de células estimuladas con 1 y 100  $\mu\text{M}$  de AA y AO en los tiempos 0, 1, 3 y 24 horas. (**Figura 15A**).

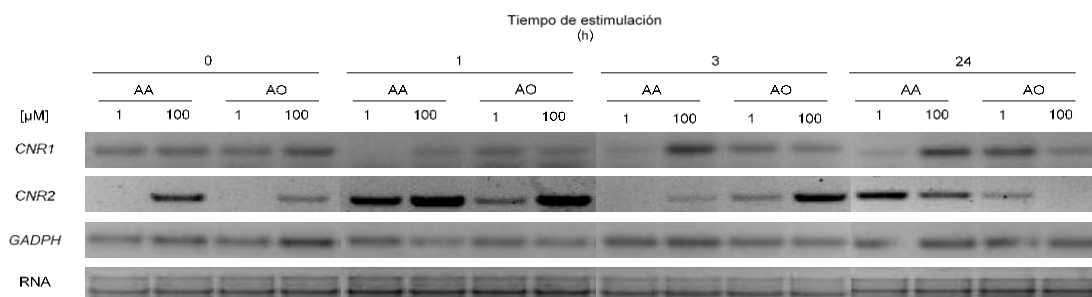
Al normalizar los datos con los niveles de transcripción de GAPDH se observó que tanto *CNR1* y *CNR2* incrementan su expresión a 100  $\mu\text{M}$  a 3 y 1 horas, respectivamente a 100  $\mu\text{M}$  de AA (**Figura 15B**). También se observó que el patrón de expresión de *CNR1* dependiente de la dosis es opuesta en células estimuladas con AA y AO a las 1, 3 y 24 horas (**Figura 15A** y **Figura 16**), mientras que el patrón de expresión de *CNR2* es similar entre los dos ácidos grasos (**Figura 15A**).



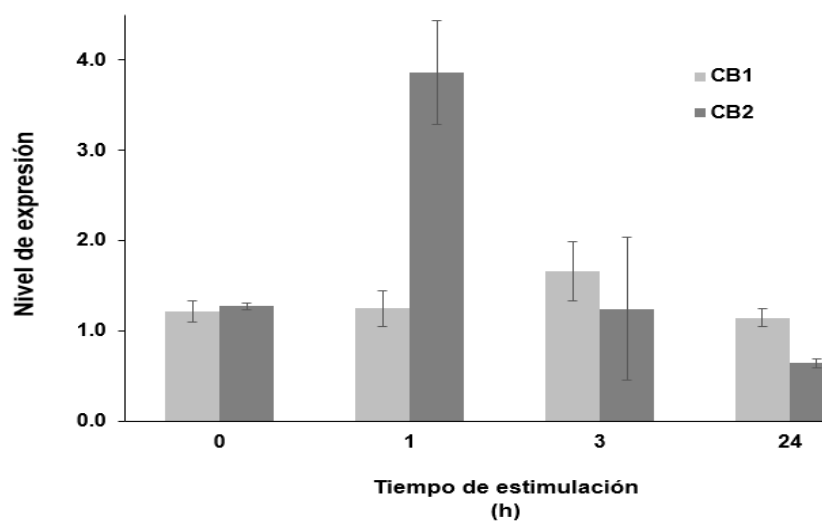


**Figura 14. Efectos de las *N*-aciletanolamidas sobre viabilidad celular y la mADN de elementos ALU I después de la estimulación con palmitoiletanolamida (PEA) y anandamida (AEA) por 24 horas. A) la viabilidad celular; B) la mADN de ALU I. a y b muestran diferencias significativas ( $p=0.05$ ;  $n=4$ ; 2 repeticiones biológicas y técnicas).**

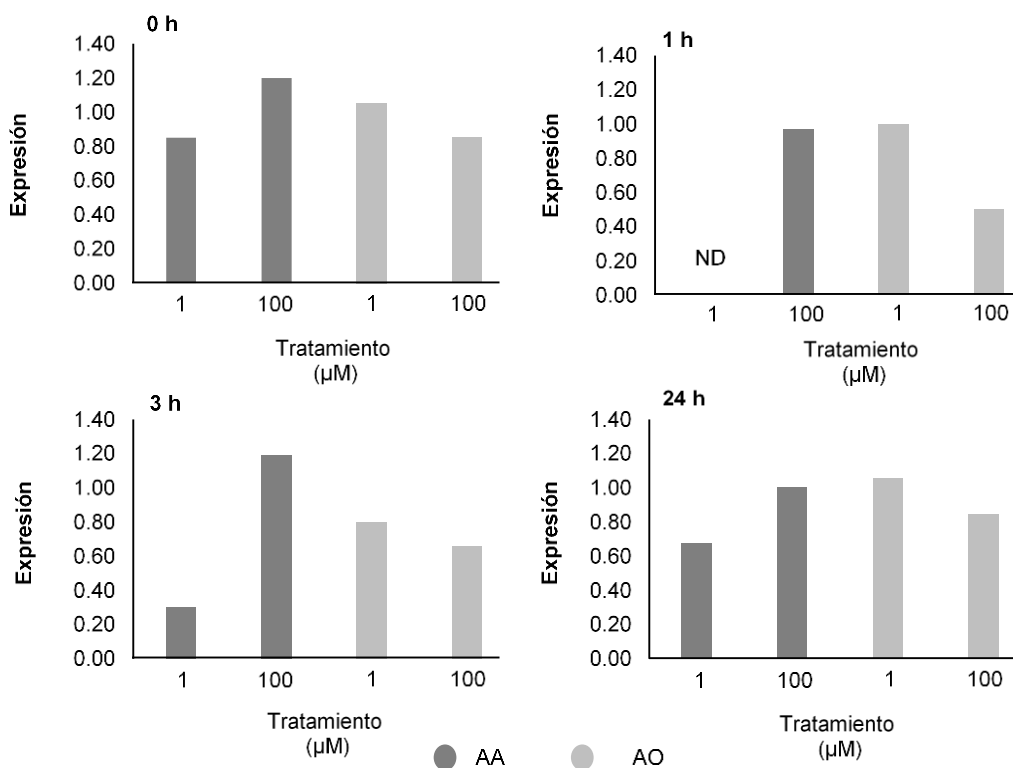
**A)**



**B)**



**Figura 15. Análisis de niveles de expresión de *CNR1* y *CNR2* en células THP-1 estimuladas por diferentes periodos de tiempo. A) RT-PCR de *CNR1* y *CNR2* bajo tratamientos de 1 y 100  $\mu\text{M}$  de ácido araquidónico (AA) y oleico (AO); B) los niveles de expresión de *CNR1* y *CNR2* normalizados respecto a *GADPH*.**

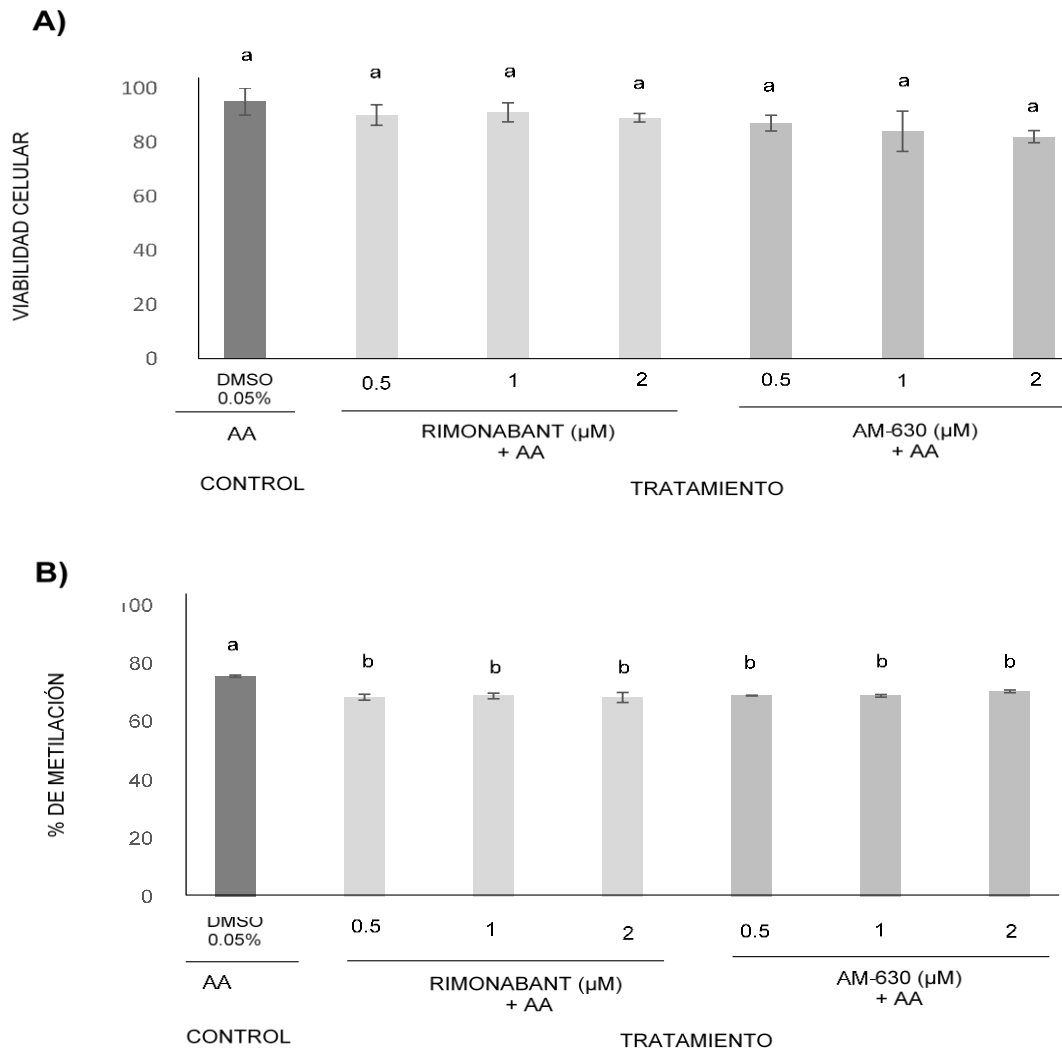


**Figura 16. Efecto inverso del ácido araquidónico (AA) y oleico (AO) sobre la expresión de *CNR1* en células THP-1 estimuladas en diferentes tiempos y concentraciones.** Los niveles de expresión están normalizados respecto a *GADPH*. (ND = No detectado).

### 7.5.2. Inhibición de los receptores cannabinoides

Para tener una evidencia más directa de que los receptores CB1 o CB2 participan en la mADN-AA, se utilizó el antagonista Rimonabant y el antagonista/agonista inverso AM630, respectivamente. Primero, se estableció que a las concentraciones de 0.5, 1 y 2  $\mu\text{M}$  ninguno de los dos afectan de manera significativa la viabilidad celular respecto al control (DMSO) después de 24 horas de incubación (**Figura 17A**). Después, se analizó los efectos de los antagonistas a diferentes concentraciones sobre la mADN de elementos ALU I en células THP-1

estimuladas con 100  $\mu\text{M}$  de AA por 24 horas. A todas las concentraciones, tanto Rimobanant como AM630 inhibieron de manera significativa la mADN-AA (**Figura 17B**).



**Figura 17. Los efectos de los antagonistas Rimobanant y AM630 sobre la viabilidad celular y la mADN de elementos ALU I en células THP-1.** A) la viabilidad de células estimuladas con 100  $\mu\text{M}$  de ácido araquidónico (AA), 0.05% de DMSO y Rimobanant y AM630 disueltas en 0.05% de DMSO por 24 horas; B) los efectos de los tratamientos sobre la mADN; *a* y *b* indican diferencias significativas entre los dos tratamientos ( $p=0.05$   $n=4$ ; 2 repeticiones biológicas y técnicas)

## 8. DISCUSIÓN

Las *N*-aciletanolamidas son moléculas biológicamente activas involucradas en neuroprotección, proliferación celular, dolor, inflamación, fertilidad, apoptosis, ansiedad, memoria y aprendizaje e ingesta de comida (Piscitelli 2015). Debido a su importancia biológica y farmacéutica, se han diseñado diferentes métodos para su síntesis. Entre estos se encuentra la síntesis enzimática catalizada por la enzima lipasa B de *Candida antarctica* NOVOZIM 435 (Plastina *et al.* 2009). Esta enzima cataliza la hidrólisis de enlaces ésteres liberando ácidos grasos libres. Sin embargo, en solventes orgánicos no acuosos se favorece la formación de enlaces amida. En estos solventes, la lipasa B es capaz de aceptar una gran cantidad de sustratos de ácidos grasos o sus respectivos metil éster y reaccionar con etanolamina para la formación de NAEs (Kidwai *et al.* 2009). De esta manera, se obtuvieron 3 estándares resultando en un método de síntesis relativamente fácil.

Para la caracterización de NAEs, se ha utilizado la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/EIMS). Para ello es necesario generar derivados trimetilsilil. En un reporte previo, se mostró que por medio de esta técnica era posible la detección de AEA y PEA sin someter las muestras a derivación con BISTFA obteniendo fragmentos de los iones dihidro y tetrahidrooxazol debido a la deshidratación térmica en las condiciones utilizadas (Devane *et al.* 1992; Macarrone *et al.* 2001). Nosotros al someter nuestros estándares con dicho método nos fue imposible la detección tanto de PEA, OEA y AEA. En nuestra experiencia la derivación es un paso necesario para la detección de estos compuestos. Otro punto importante para esto es la búsqueda de iones específicos de dichos derivados.

La concentración de las NAEs depende del tipo (Ej. AEA *versus* PEA) y varía de un tejido a otro, bajo diferentes estímulos ya sean fisiológicos y patológicos (Balvers *et al.* 2010). Se han descrito diversos métodos para la extracción y purificación de estos compuestos entre los cuales se encuentran la

extracción en fase sólida, la extracción líquido-líquido y métodos cromatográficos (Piscitelli 2015). Aquí se mostró que, el uso de la extracción en fase sólida utilizando una columna C8 retiene NAEs como la PEA, OEA y AEA. Sin embargo, debido a que estos compuestos se encuentran a muy bajas concentraciones no fue posible la detección de estos en células THP-1 estimuladas con 100  $\mu$ M de AA, y la baja concentración en sangre humana mostró que es necesario la re-evaluación y optimización de la metodología de extracción y purificación. Además, durante la extracción en fase sólida se encontraron ácidos grasos los cuales interfieren en la cuantificación de estos. Finalmente, muchos estudios sugieren utilizar métodos más sensibles para la cuantificación de estos como lo es la espectrometría de masas en tándem (Balvers *et al.* 2013; Piscitelli 2015).

Por otra parte, nuestros estudios en cultivos celulares representan el primer reporte sobre la participación de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en la respuesta de mADN-AA en células THP-1. Al nivel de ARN, mostramos que la expresión de *CNR1* y *CNR2* incrementa a las 3 y 1 horas, respectivamente, después de la estimulación con AA. Como sabemos que la mADN-AA es detectable 3 horas después del estímulo (Silva-Martínez *et al.* 2016), esto indica que uno o ambos de los receptores pueden ser importantes en la mADN-AA. Además, los tiempos en los que existe sobreexpresión de los receptores podría indicar la regulación transcripcional de CB1 por parte de CB2 (Borner *et al.* 2007). Sin embargo, en células estimuladas con AO, que opuesto al AAo induce hipometilación del ADN, solo *CNR1* mostró una expresión inversa a la observada con el AA. Lo último indica que *CNR1* es importante en la respuesta opuesta en ambos ácidos grasos sobre la mADN en células THP-1.

Al inhibir la actividad de CB1 y CB2 con los antagonistas Rimonabant y AM630, respectivamente, mostramos que ambos inhiben la mADN-AA. Sin embargo, como existe evidencia que AM630 puede unirse débilmente a CB1 (Reggio 2006), no se puede descartar que la inhibición de la mADN-AA observada por CB2 refleja una disminución en la actividad de CB1 y no CB2. Por otro lado, se

sabe que la activación del receptor CB2 por el agonista sintético *trans*-cariofileno lleva a la activación transcripcional de PPAR $\alpha$  vía SIRT1/PGC-1 $\alpha$  promoviendo la  $\beta$ -oxidación en células de mioblastos C2C12 (Zheng *et al.* 2013) y esta mismas vías es importante en la mADN-AA (Silva-Martínez *et al.* 2016).

La activación de los receptores cannabinoides involucra la síntesis de endocannabinoides que deben actuar de manera autócrina en nuestro sistema. Muchos de estos endocannabinoides son derivados del AA (Pertwee 2015). En células de queratinocitos, se ha mostrado que la activación de CB1 por anandamida lleva a la inducción de la mADN para regular genes involucrados en su diferenciación (Paradisi *et al.* 2008). Sin embargo, al estimular células THP 1 a concentraciones similares de anandamida, no observamos ningún efecto significativo sobre la mADN, aunque se observó un ligero incremento en la metilación a la concentración más alta. Lo anterior pudo deberse a los bajos niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico regulados por canales activados por el AA pero no por la AEA o PAE (Piomelli 1996; Savinainen *et al.* 2001). El Ca<sup>2+</sup> es un segundo mensajero que participa en muchos procesos fisiológicos (Kraus 2003). En las células, este ion es necesario para la movilización del AA mediada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (Pérez-Chacón *et al.* 2009) y dispara la síntesis de NAEs ya que activa a enzimas que participan en su biogénesis, entre ellas en reacciones de transacilaciones para formar NArPE (Cadas *et al.* 1996; Ueda *et al.* 2013). De tal manera que, sería interesante analizar los efectos de la adición de un pulso de Ca<sup>2+</sup> como una alternativa para la inducción de la mADN con AEA en células THP-1. Otras alternativa para la inducción de la mADN es la estimulación de células con el 2-araquidonoilglicerol, otro agonista endógeno más potente de los receptores cannabinoides (Sugiura *et al.* 2000). La carencia de efectos de la AEA o PEA demuestra que no activan a PPAR $\alpha$ , por lo cual se sugiere un mecanismo de activación por fosforilación en el dominio independiente de ligando AF-1 (Delfosse *et al.* 2015).

La mADN inducida por la AEA en queratinocitos depende de las cinasas p38 y p42/p44 (Paradisi *et al.* 2008). Se desconoce como el AO ejerce su efecto inverso al AA, pero muy probable sea regulando p42/p44 por medio de un intermediario metabólico (Wang *et al.* 2014). Sorpresivamente, p38 ha sido vinculada a la producción de gotas de lípidos en células THP-1 estimuladas con AA (Guijas *et al.* 2013). Estas gotas de lípidos son estructuras ricas en triglicéridos los cuales pueden ser precursores de fosfolípidos, sustratos en la síntesis de endocannabinoides (Ueda *et al.* 2013; Pertwee 2015). Acorde a lo anterior, sería interesante saber la importancia de la formación de estas estructuras y su participación durante la mADN-AA, ya que se han observado en lesiones ateroscleróticas (Tabas 2010).

Para medir la mADN en células THP-1 hemos usado la técnica de COBRA-ALU, que ha sido empleado para evaluar y comparar los niveles de metilación en diferentes tipos de cáncer (Sirivanachsunton *et al.* 2013). Hemos mostrado que los datos son similares replicando los resultados de un estudio previo en donde se determinó los niveles de metilación total en células estimuladas con 100  $\mu$ M de AA utilizando el KIT methyflash (Silva-Martínez *et al.* 2016). Lo anterior indica que el nivel de mADN-AA total esta correlacionado con el nivel de metilación de ALU I.

En resumen, la participación de los receptores cannabinoides sobre la respuesta de mADN-AA en células THP-1, podría sugerir que son excelentes blancos terapéuticos al revertir los efectos de los cambios en la mADN asociada con esta enfermedad (Zaina *et al.* 2014). De hecho, se ha mostrado que la administración de Rimonabant (un inhibidor de CB1) y Azacitidina (un inhibidor de la metiltransferasa DNMT1) a ratones “knock-out” de *apo E*<sup>-/-</sup> (el modelo murino de aterosclerosis) lleva a la disminución de la lesión aterosclerótica (Sigamura *et al.* 2010).



## 9. CONCLUSIÓN

1. Se pueden sintetizar *N*-aciletanomamidas usando la enzima lipasa B de *Candida antarctica* (NOVOZIM, Sigma Aldrich) resultando así un método sencillo y barato.
2. Para la caracterización de *N*-aciletanomamidas por GC/EIMS es necesario derivatizar las muestras con BISTFA. De esta manera se obtienen derivados trimetilsilil estables.
3. Debido a que las *N*-aciletanomamidas se encuentran a muy bajas concentraciones no fue posible su detección y ni su cuantificación por GC/EIMS en células THP-1 estimuladas con 100  $\mu$ M del ácido araquidónico. Por otra parte, se identificó anandamida, el principal endocannabinóide, usando 12 mL de sangre donado por un paciente sano mediante una extracción basada en solventes. Ya que existe limitación en la cantidad de muestras sanguíneas por lo cual se debe optimizar el sistema de extracción de *N*-aciletanomamidas para su re-evaluación.
4. El análisis COBRA-ALU es una técnica de bajo costo que nos da una aproximación de los estados de metilación global del genoma.
5. La mADN no fue inducida por la anandamida ni por la palmitoiletanolamida. Sin embargo, la anandamida a una concentración de 2  $\mu$ M mostró un incremento no significativo con respecto al control en los niveles de metilación de los elementos ALU I.
6. Al nivel de ARN, la expresión de *CNR1* y *CNR2* incrementa a las 3 y 1 horas, respectivamente, después de la estimulación con ácido araquidónico.
7. La expresión del gen *CNR1*, que codifica para CB1, es opuesta en células estimuladas con ácido oleico con respecto al ácido araquidónico. En células

estimuladas con ácido araquidónico existe la tendencia a incrementar su expresión dependiente de la dosis mientras que ocurre lo contrario en células estimuladas con ácido oleico.

8. La inhibición de los receptores CB1 y CB2 mostró una disminución en la mADN, lo que sugiere la participación de ambos en la respuesta.

## 10. REFERENCIAS

- Aneetha H., O'Dell D. K., Tan B., Walker J. M. y T. D. Hurley, T. D. 2009. Alcohol dehydrogenase-catalyzed *in vitro* oxidation of anandamide to *N*-arachidonoyl glycine, a lipid mediator: synthesis of *N*-acyl glycinals. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19:237-241.
- Bachman M., Uribe Lewis S., Yang X., Williams M., Murrell A., y S. Balasubramanian. 2014. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature chemistry* 6:1049-1055.
- Balvers M. G., Wortelboer H. M., Witkamp R. F. y K. C. Verhoeckx. 2013. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of free and esterified fatty acid *N*-acyl ethanolamines in plasma and blood cells. *Analytical biochemistry* 434:275-283.
- Berdasco M. y M. Esteller. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Developmental cell* 19:698-711.
- Berdyshev E. V. 2000. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chemistry and physics of lipids* 108:169-190.
- Bolognini D., Cascio M. G., Parolaro D. y R. G. Pertwee. 2012. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *British journal of pharmacology* 165:2561-2574.
- Breiling A. y F. Lyko 2015. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics chromatin* 21:8-24.
- Burdge G. C. y K. A. Lillycrop. 2014. Fatty acids and epigenetics. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 17:156–161.
- Capra V., Rovati G. E., Mangano P., Buccellati C., Murphy R. C. y A. Sala. 2015. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular and cell biology of lipids* 1851:377-382.
- Cascio M. G. y P. Marini. 2015. Biosynthesis and fate of endocannabinoids. En Pertwee R. G. *Endocannabinoids*. Springer International Publishing pp 39-58.
- Chanput W., Mes J. J. y H. J. Wichers. 2013. THP-1 cell line: an *in vitro* model for immune modulation approach. *International immunopharmacology* 23: 37-45
- Cheng X. y R. J. Roberts. 2001. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic acids* 29:3784-3795.
- Cheng X., Hashmoto H., Horton J. R. y X. Zhang. 2011. Mechanisms of DNA methylation, methyl-CpG recognition, and demethylation in mammals. En:

Handbook of Epigenetics: the new molecular and medical genetics. Edit Tollesfbol T. O. Elsevier press. San Diego, USA. Pp 624.

Delfosse V., Le Maire A., Balaguer P. y W. Bourguet. 2015. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta pharmacologica sinica* 36:88-101.

Devane W. A., Dysarz F. 3. Johnson, M. R., Melvin L. S. y A. C. Howlett. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology* 34:605-613.

Di Marzo V., De Petrocellis L., Bisogno T. y D. Melck. 1999. Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids* 34:S319-S325.

Drexler H. G., MacLeod R. A., Borkhardt A. y J. W Janssen. 1995. Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 9:480-500.

Esteller M. 2005. Impact of DNA methylation on health and disease. En: *DNA methylation: approaches, methods and applications*. Edit Esteller M. CRC press USA pp 212.

Esteller M. 2011. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biology Reports* 3:1-6.

Fatemi M., Hermann A., Gowher H. y A. Jeltsch. 2002. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during *de novo* methylation of DNA. *European journal of biochemistry* 269:4981-4984.

Feil R. 2006. Environmental and nutritional effects on the epigenetic regulation of genes. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 600:46-57.

Fink M., Lesage F., Duprat F., Heurteaux C., Reyes R., Fosset, M. y M. Lazdunski, M. 1998. A neuronal two P domain K<sup>+</sup> channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *The EMBO journal* 17: 3297-3308.

Georgiadi A. y S. Kertsen. 2012. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Advances in nutrition* 1:127-134.

Gerard C. M., Mollereau C., Vassart G. y M. Parmentier. 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochemical journal* 279:129-134.

Ghaffar A., Griffiths H. R., Devitt A., Lip G. Y. H. y E. Shantsila. 2013. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis. Where are we now? *Journal of the american college of cardiology* 62:1541-1551.

- Globisch D, Münzel M., Müller M., Michalakis S., Wagner M., Koch S., Brückl T., Biel M. y T. Carell. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLOS One* 5:e15367.
- Goll M. G y T. H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual reviews of biochemistry* 74:481-514.
- Grygiel Gomiak B. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications –a review. *Nutrition journal* 13:1-17.
- Guijas C., Pérez-Chacón G., Astudillo A. M., Rubio J. M., Gil-de-Gómez L., Balboa M. A. y J. Balsinde. 2012. Simultaneous activation of p38 and JNK by arachidonic acid stimulates the cytosolic phospholipase A2-dependent synthesis of lipid droplets in human monocytes. *Journal of lipid research* 53:2343-2354.
- Hansen H. S., Kleberg K. y H. A. Hassing. 2015 Non endocannabinoids *N*-acylethanolamines and monoacylglycerols: old molecules new targets. En Di Marzo V. y J. Wang. *The endocannabinoidome: The world of endocannabinoids and related mediators*. Ed. Elsevier Publishing Group. Pp 1-13.
- Hattori N. y T. Ushijima. 2011. Analysis of gene-specific DNA methylation. En: *Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics*. Edit Tollefsbol T. O. Elsevier press. San Diego, USA. Pp 624.
- Hashimoto H., Zhang X., Vertino P. M. y X. Cheng. 2015. The Mechanisms of Generation, Recognition, and Erasure of DNA 5-Methylcytosine and Thymine Oxidations. *Journal of biological chemistry* 290:20723-20733.
- Herkenham M., Lynn A. B., Johnson M. R., Melvin L. S., de Costa B. R. y K. C. Rice. 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative *in vitro* autoradiographic study. *The Journal of neuroscience* 11:563-583.
- Howlett, A. C. 2005. Cannabinoid receptor signaling. En Pertwee R. G. *Cannabinoids*. Ed. Springer Berlin Heidelberg. Pp. 53-79.
- Ilham F. y S. T. Kalkanli. 2015. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J. Clinical Cases* 3:245-352.
- Illingworth R. S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., Kerr A. R., James K. D., Turner D. J. y A. P. Bird. 2010. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS genetics* 6:e1001134.

- Indolfi C. 2002. Genetic factors in atherosclerosis: status and perspectives. *European heart journal* a:b14-b16.
- Ito S., She, L., Dai Q., Wu S. C., Collins L. B., Swenberg J. A y Y. Zhang, Y. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300-1303.
- Jane-George S. y C. Lyon. 2010. Pathogenesis of atherosclerosis. En: Jane-George S. y J. Johnson. *Atherosclerosis: Molecular and cellular mechanisms*. Wiley –VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. Pp 3-20.
- Jones P. A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews genetics* 13:484-492.
- Kaplan B. L. 2013. The role of CB 1 in immune modulation by cannabinoids. *Pharmacology & therapeutics* 137:365-374.
- Kidwai M., Poddar R. y P. Mothsra. 2009. N-acylation of ethanolamine using lipase: a chemoselective catalyst. *Beilstein journal of organic chemistry* 5:1-10.
- Klose R. J., y A. P. Bird. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* 31:89-97.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their functions. *Cell* 128:693-705.
- Kullis M. y M. Esteller. 2010. DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* 70:27-56.
- Ley J. P., Hilmer J. M., Weber B., Krammer G., Gatfield I. L. y H. J. Bertram. 2004. Stereoselective enzymatic synthesis of *cis*-pellitorine, a taste active alkamide naturally occurring in *Tarragon*. *European journal of organic chemistry* 2004:5135-5140.
- Lister R., Pelizzola M., Dowen R. H., Hawkins R. D., Hon G., Tonti-Filippini J., Nery J. R., Lee L., Ye Z., Ngo Q. M., Edsall L., Antosiewicz-Bourget J., Stewart R., Ruotti V., Millar A. H., Thomson J.A., Ren B. y J. R. Ecker. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315-322.
- Lombard C., Nagarkatti M. y P. Nagarkatti. 2007. CB2 cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: potential role for CB2-selective ligands as immunosuppressive agents. *Clinical immunology* 122:259-270.

- Lou Y., Lu X. y H Xie. 2014. Dynamic Alu Methylation during normal development, aging and tumorigenesis. *Biomed research international* 2014:1-12.
- Lund G., Andersson L., Lauria M., Lindholm M., Fraga M. F., Villar-Garea A., Ballestar E., Esteller M. y S. Zaina. 2004. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 279:29147-29154.
- Marnett L. J., Kingsley P. J. y D. J. Hermanson. 2015. Oxidative metabolites of endocannabinoids formed by Cyclooxygenase-2. En Di Marzo V. y J. Wang. *The endocannabinoidome: the world of endocannabinoids and related mediators*. Ed. Elsevier Publishing Group. Pp 1-13.
- Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C. y T. I. Bonner. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- McAllister S. D., Griffin G., Satin L. S. y M. E. Abood. 1999. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a *Xenopus* oocyte expression system. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 291:618-626.
- Mechoulam R., Hanuš L. O., Pertwee R., y A. C. Howlett. 2014. Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nature reviews neuroscience* 15:757-764.
- Mohan K. N. y J. L. Chaillet. 2013 Cell and molecular biology of DNA methyltransferase 1. *International review of cell and molecular biology* 306:1-42.
- Molina-Torres J., Santos-Escobar F., González-Arno M. T., Ramírez-Chávez E., y E. S. Pavón. 2008. Síntesis enzimática de alcaloides en sistemas No acuosos y ensayo de su bioactividad *in vitro*. *Latin american journal of pharmacy* 27:852-8.
- Mortusewicz O., Schermelleh L., Walter J., Cardoso M. C. y H. Leonhardt. 2005. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the national academy of sciences of USA* 102: 8905-8909.
- Munro S., Thomas K. L., y M. Abu-Shaar. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:31-65.
- Nakamura T., Alder H., Gu Y., Prasad R., Canaani O., Kamada N., y P. C. Nowell, 1993. Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 90:4631-4635.

- Nakamura H. y T. Murayama. 2014. The role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism. *Journal of pharmacological sciences* 124:307-312.
- Odero M. D., Zeleznik-Le N. J., Chinwalla V., y J. D. Rowley. 2000. Cytogenetic and molecular analysis of the acute monocytic leukemia cell line THP-1 with an MLL-AF9 translocation. *Genes, chromosomes and cancer* 29:333-338.
- O'Sullivan S. E. 2007. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British journal of pharmacology* 152:576-582.
- Papackova Z. y M. Cahova. 2014. Fatty acid signaling: the new function of intracellular lipases. *International journal of molecular sciences* 16:3831-3855.
- Paradisi A., Pasquariello N., Barcaroli D. y M. Maccarrone. 2008. Anandamide regulates keratinocyte differentiation by inducing DNA methylation in a CB1 receptor-dependent manner. *The journal of biological chemistry* 283:6005-6012.
- Pertwee R. G. 2015. Endocannabinoids and their pharmacological actions. En: Pertwee R. G. *Endocannabinoids* Ed. Springer International Publishing Pp 1-37.
- Pfaffeneder T., Spada F., Wagner M., Brandmayr C., Laube S. K. Eisen D. y D. Schuermann. 2014. Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nature chemical biology* 10: 574-581.
- Piomelli D. 1996. The arachidonic acid cascade. En Piomelli D. *Arachidonic acid in cell signaling* Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 1-14.
- Plastina P., Meijerink J., Vincken J. P., Gruppen H., Witkamp R. y G. Gabriele. 2009. Selective synthesis of unsaturated *N*-acylethanolamines by lipase-catalyzed *N*-acylation of ethanolamine with unsaturated fatty acids. *Letters in organic chemistry* 6:444-447.
- Portela A. y M. Esteller. 2009. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology* 28:1057-1068.
- Qin Z. 2012. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis* 221:2-11.
- Rajesh M., Mukhopadhyay P., Hasko G., Huffman J. W., Mackie K. y P. Pacher. 2008. CB2 cannabinoid receptor agonist attenuate TNF- $\alpha$ -induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *British journal of pharmacology* 153:347-357.



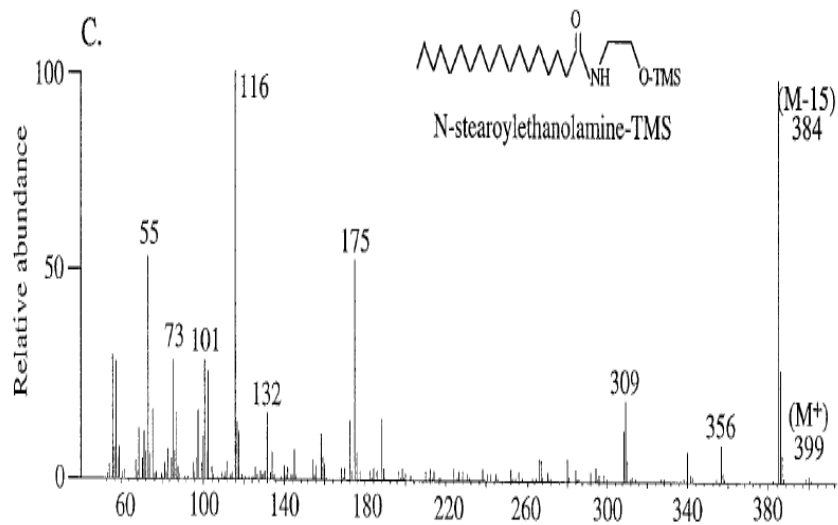
- Ramsahoye B. H., Biniszkiwicz D., Lyko F., Clark V., Bird A. P. y R. Jaenisch. 2000. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cell and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97:5237-5242.
- Rangel-Salazar R., Wickström-Lindholm M., Aguilar-Salinas C., Alvarado-Caudillo Y., Dossing K. B. V., Esteller M., Labourier E., Lund G., Nielcen F. C., Rodríguez-Rios D., Solís-Martínez M. O., Wrobel K., Wrobel K y S. Zaina. 2011. Human native lipoprotein-induced *de novo* DNA methylation is associated with repression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. *BMC genomics* 12:582.
- Reggio P. H. 2006. The relationship between endocannabinoid conformation and endocannabinoid interaction at the cannabinoid receptor. En: Onaivi E. S., Sugiura T. y V. Di Marzo. *Endocannabinoids: The brain and body's marijuana and beyond*. Ed. CRC Press Boca Raton FL. Pp. 11-54.
- Rinaldi-Carmona M, Barth F., Heaulme M., Shire D., Calandra B., Congy C., Martínez S., Maruani J., Neliat G. y D. Caput. 1994. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS letters* 350:240–4.
- Robertson K. D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nature* 6:597-610.
- Roth M. y W. Y. Chen. 2013. Sorting out functions of sirtuins in cancer. *Oncogene* 1-12.
- Savinainen J. R., Järvinen T., Laine K. y J. T. Laitinen. 2001. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB1 receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *British journal of pharmacology* 134:664-672.
- Sergeeva M., Strokin M. y G. Reiser. 2005. Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A<sub>2</sub>. *Reproduction Nutrition Development* 45:633-646.
- Schaefer B. 2014. Pharmaceuticals. En: *Natural products in the chemical industry*. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg pp 309-518.
- Schupp M. y M. A. Lazar. 2010. Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. *Journal of biological chemistry*. 285:44409-44415.
- Showalter V. M., Compton D. R., Martin B. R., y M. E. Abood. 1996. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278:989-999.

- Shuttleworth T. J. 2010. Arachidonic acid-regulated Ca<sup>2+</sup> channel. En Bradshaw R. A. y E. A. Dennis. Handbook of cell signaling. Ed. Elsevier Academic Press. New York U.S.A. Pp 915-920.
- Silva-Martinez G. A., Rodriguez-Rios D., Alvarado-Caudillo Y., Barbosa-Sabanero G., Vaquero A., Esteller M., Carmona J., Moran S., Nielsen F. C., Wickstrom-Lindholm M., Wrobel K., Wrobel K., Zaina S. y G. Lund.. Arachidonic and oleic acid exert distinct effects on the DNA methylome. Epigenetics. En prensa.
- Sugamura K., Sugiyama S., Fujiwara Y., Matsubara J., Akiyama E., Maeda H. y Y. Horibata. 2010. Cannabinoid 1 receptor blockade reduces atherosclerosis with enhances reverse cholesterol transport. Journal of atherosclerosis and thrombosis 17:141-147.
- Sirivanichsuntorn P., Keelawat S., Danuthai K., Mutirangura A., Subbalekha K. y N. Kitkumthorn. 2013. LINE 1 and Alu hypomethylation in mucoepidermoid carcinoma. BMC clinical pathology 13:1-11.
- Sugiura T. y K. Waku, K. 2000. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. Chemistry and physics of lipids 108:89-106.
- Tabas I. 2010. Lipids and atherosclerosis. En: Vance D. E. y J. E. Vance. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. Elsevier B. V 5ta Edition Pp 579-605.
- Ueda N., Tsuboi K. y T. Uyama. 2013. Metabolism of endocannabinoids and related *N*-acylethanolamines: Canonical and alternative pathways. FEBS journal 280: 1874-1894.
- Uysla F., Akkoyunlu G. y S. Ozturk. 2015. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. Biochimie 116:103113.
- Valencia-Morales M. del P., Zaina S., Heyn H., Carmona F. J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gómez A., Moran S., Lund G., Rodríguez-Ríos D., López-González G., Ramírez-Nava M. de la Rocha C., Sánchez-Flores A. y M. Esteller. 2015. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. BMC medical genomics 8:7.
- Wang G., Ji Y., Li Z., Han X., Guo N., Song Q. y H. Ouyang. 2014. Nitro-oleic acid downregulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression via the p42/p44 MAPK and NFκβ pathways. Scientific reports 4.
- White G. E., Channon K. M. y D. R. Greaves. 2010. Chemokines and atherosclerosis: a critical assessment of therapeutic targets. En: Jane-George S. y J. Johnson. Atherosclerosis: molecular and cellular mechanisms. Wiley –VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania. Pp 23-42.

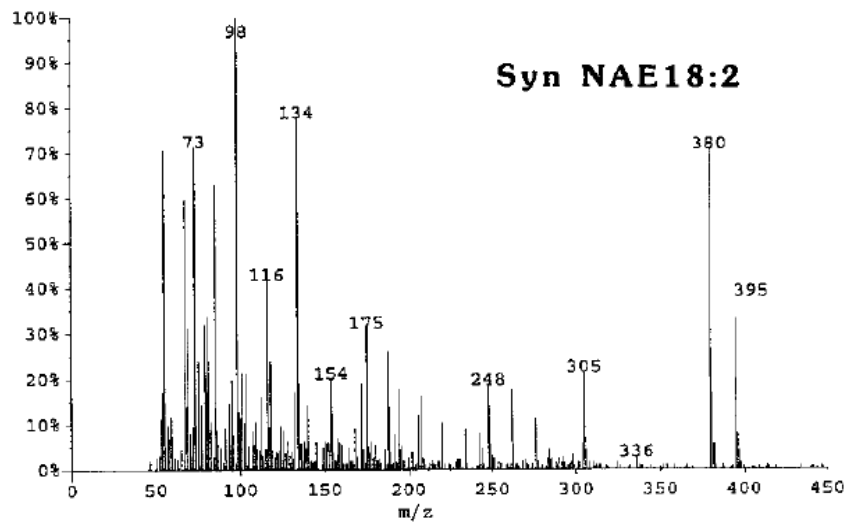
- Winn J. 2011. Lipids, fatty acids. En: Moo-Young M. Scientific fundamentals of biotechnology. Elsevier Academic Press. Vol 1 Segunda Edición. Pps 41-52.
- Zaina S., Heyn H., Carmona F. J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gómez A., Goncalvez I., Moran S. y M. Esteller. 2014. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circulation: cardiovascular genetic* 7:692-700.
- Zaina S., Gonçalves I., Carmona F. J., Gómez A., Heyn H., Mollet, I. G. y M. Esteller, M. 2015. DNA methylation dynamics in Human Carotid Plaques After Cerebrovascular Events. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 35:1835-1842.
- Zerangue N., Arriza J. L., Amara S. G. y M. P. Kavanaugh. 1995. Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *Journal of biological chemistry* 270:6433-6435.
- Zheng X., Sao. T. y X. Wang. 2013. Activation of type 2 cannabinoid receptor (CB2R) promote fatty acids oxidation through the SIRT1/PGC-1 $\alpha$  pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 436:377-381.



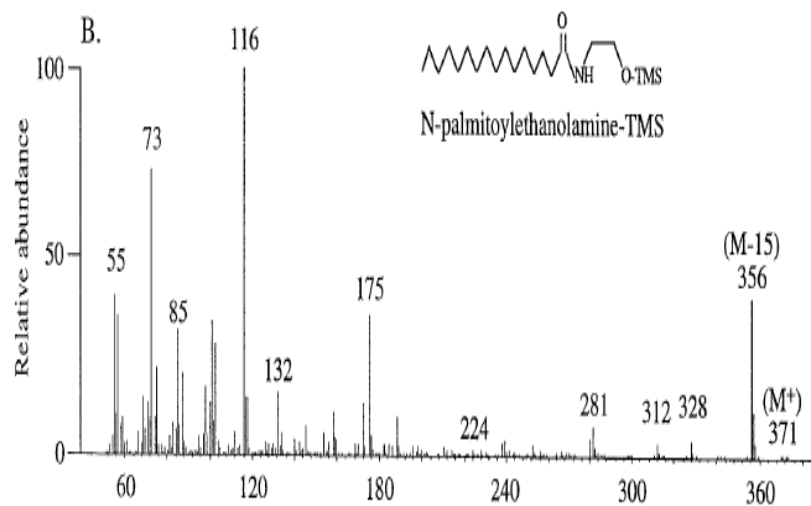
## 11. ANEXOS.



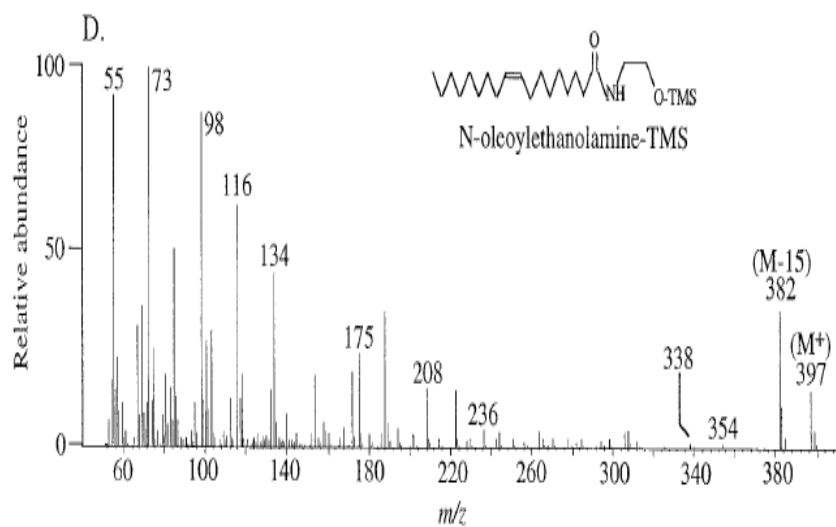
**ANEXO A.** Espectro de masas de estearoiletanolamida silanizada obtenido por Cadas y colaboradores (1997).



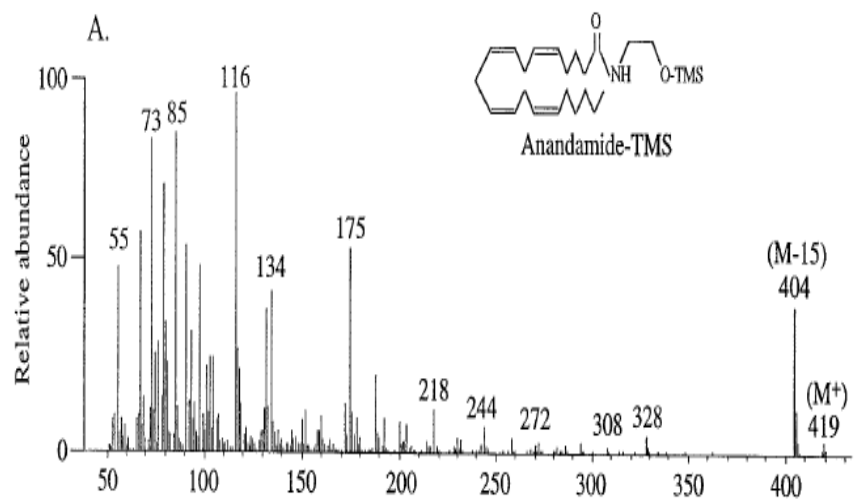
**ANEXO B.** Espectro de masas de linoleoiletanolamida silanizada obtenido por Chapman y colaboradores (1998).



**ANEXO C.** Espectro de masas de la palmitoiletanolamida silanizada obtenido por Cadas y colaboradores (1997).



**ANEXO D.** Espectro de masas de la palmitoiletanolamida silanizada obtenido por Cadas y colaboradores (1997).



**ANEXO E.** Espectro de masas de la anandamida silanzada obtenido por Cadas y colaboradores (1997).