

Efectos del cannabis sobre la viabilidad celular y el ciclo sueño vigilia en un modelo animal

Effects of Cannabis on Cell Viability and the Sleep-Wake Cycle in an Animal Model

Juan Laluz¹, Analía Ríos¹, Santiago Salvo¹, Agustín Scasso¹, Antonella Techera¹, Gimena Vargas¹, Burix Mechoso^{2*}, Verónica Sosa², Alejandra Mondino³, Atilio Falconi³, Carlos García⁴ y Néelson Bracesco².

Resumen:

La investigación básica en nuestro país en relación a los efectos biológicos del cannabis es relativamente reciente. Si bien la ley 14.294 de 1974 ya habilitaba a realizar investigación con cannabis, no fue hasta la aprobación de la ley 19.172 en el año 2013 de Regulación y Control del cannabis que se logró un marco regulatorio amplio que realmente impulsa la concreción de programas de investigación en diferentes áreas del conocimiento. En el presente trabajo se propone la aproximación al trabajo que realiza el Núcleo Interdisciplinario de Estudios sobre Cannabis (NIEC). Se presentan ensayos realizados sobre la viabilidad celular tras la exposición a extractos de cannabis en el Laboratorio de Radiobiología y los resultados obtenidos por integrantes del laboratorio de Neurobiología del Sueño de la Facultad de Medicina en relación a los efectos sobre el ciclo sueño-vigilia de la administración aguda de cannabis vaporizado en un modelo animal. Los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad celular muestran una disminución de la sobrevivencia con concentraciones bajas de cannabinoides (1,0 μM), mientras cuando las líneas celulares fueron expuestas a concentraciones más elevadas (10 μM y 100 μM), no se observó disminución de la fracción sobreviviente en ninguna de las líneas estudiadas. Este trabajo y los resultados obtenidos pretenden ser un insumo para la posterior profundización en la investigación sobre el potencial medicinal del cannabis en especial para futuros ensayos clínicos o terapéuticos del cannabis o los extractos de la planta.

¹Estudiante de Medicina, Ciclo de Metodología Científica II, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. La contribución en la realización del trabajo fue equivalente a la de los demás estudiantes.

²Docente supervisor, Laboratorio de Radiobiología, Departamento de Biofísica de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

³Docente supervisor, Laboratorio de Neurobiología del Sueño, Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

⁴Docente supervisor, Catedra de Farmacognosia y productos Naturales, Dpto de Química Orgánica de la Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

*Contacto: Burix Mechoso. Correo electrónico: burixmechoso@gmail.com

Palabras clave:

Cannabis, trabajo interdisciplinario, viabilidad celular, ciclo sueño-vigilia.

Abstract:

The basic research in our country in relation to the biological effects of cannabis is relatively recent. Although the law 14,294 of 1974 already enabled to carry out research with cannabis, it was not until the approval of the law 19,172 in the year 2013 of regulation and control of cannabis that a broad regulatory framework was achieved that really drives the realization of research programs in different areas of knowledge. In the present work, the approach to the work carried out by the Interdisciplinary Nucleus of Cannabis Studies (NIEC by its initials in Spanish) is proposed. The tests carried out on cell viability after exposure to cannabis extracts in the Radiobiology Laboratory are presented and also the results obtained by members of the Sleep Neurobiology Laboratory of the Faculty of Medicine in relation to the effects on the sleep-wake cycle of the acute administration of vaporized cannabis in an animal model. The results obtained from the cell viability tests show a decrease in survival with low concentrations of cannabinoids (1.0 μM), while when the cell lines were exposed to higher concentrations (10 μM and 100 μM), no decrease in the surviving fraction was observed in none of the lines studied. This work and the results obtained are intended to be an input for further research on the medicinal potential of cannabis, especially for future clinical or therapeutic trials of cannabis or plant extracts.

Keywords:

Cannabis, Interdisciplinary Work, Cell Viability, Sleep-Wake Cycle.

Introducción

Historia

El cannabis es una de las primeras plantas que fue utilizada con fines medicinales, religiosos y recreacionales. Si bien evidencias arqueológicas encontradas en Tailandia indican que el uso de la fibra del cannabis podría incluso remontarse a diez mil años atrás (Pereda et al., 2003), los primeros registros de uso medicinal pertenecen a una farmacopea china (*Pen-Ts'ao*) escrita en el año 2727 a.C.⁽¹⁾. El empleo de esta planta dependía de la cosmovisión de la civilización estudiada; enteramente religioso en ceremonias de gue-

rreros synthios (civilización proveniente de Medio Oriente), rituales de fertilidad en los celtas, medicinales en los hindúes (como antiinflamatorio y para el alivio del dolor en enfermedades reumáticas). No obstante la larga tradición del uso de la planta por diferentes culturas antiguas y clásicas, diversos factores llevaron al abandono de su prescripción en la cultura occidental, no siendo hasta mediados del siglo XIX que la medicina comienza a interesarse nuevamente por las propiedades terapéuticas del cannabis⁽²⁾. Fue en

la década de 1940 que comenzaron a realizarse estudios sobre las propiedades farmacológicas de los fitocannabinoides (compuestos sintetizados únicamente por la planta del cannabis)⁽³⁾.

Generalidades de la Planta

La planta de cannabis pertenece a la familia cannabináceas, la cual está compuesta solamente por dos géneros; Cannabis y Humulus, y tres especies: Cannabis sativa, Humulus lupulus (lúpulo común) y H. Japónica (lúpulo japonés). En el presente trabajo se hará referencia a *Cannabis sativa*, la cual es una planta herbácea anual, originaria del centro-oeste asiático, cuya forma silvestre se encuentra actualmente extinguida. La misma es una planta dioica, es decir que las flores femeninas y masculinas se encuentran en plantas separadas, si bien las mismas son anatómicamente indistinguibles hasta la fecha de maduración y floración. La inflorescencia masculina se compone de muchas flores individuales y pequeñas, mientras que las femeninas son compactas y contienen solamente unas pocas flores agrupadas de dos en dos. Cada una de estas flores presenta un cáliz que encierra a su vez un ovario. Una vez polinizada, la planta femenina madura luego de las cuatro a las ocho semanas, produciendo cada ovario una única semilla⁽¹⁾. Independientemente de las características morfológicas y microscópicas que diferencian las diferentes subespecies, pueden establecerse distintos quimiotipos de cannabis según el contenido de cannabinoides que presentan. El principal fitocanabinoide es el delta-9-tetrahidrocanabinol (THC), siendo este a su vez el componente psicoactivo más potente. Dicho componente varía enormemente dependiendo no solo de su origen genético⁽⁴⁾, del quimiotipo, sector, sexo y edad de la planta sino también

según las condiciones ambientales en la cual es cultivada, cosechada y almacenada, modificando de esta manera, también, su actividad farmacológica⁽¹⁾.

Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide cumple funciones reguladoras importantes en el cuerpo humano, se vio implicado en procesos como el desarrollo neurológico, las funciones inmunomediadas, el apetito, la función cardiovascular, entre otros⁽⁵⁾. Está constituido por los receptores endocannabinoides y los cannabinoides endógenos llamados endocannabinoides⁽³⁾. Se distinguen principalmente dos tipos diferentes de receptores, los receptores tipo 1 (CB1) y los tipo 2 (CB2). Los CB1 se localizan en el sistema nervioso central y periférico, siendo los encargados de regular los efectos psicoactivos de los cannabinoides y, de hecho, son receptores presinápticos cuya función principal es la modulación de la liberación de diversos neurotransmisores. El receptor CB2 se encuentra principalmente a nivel de células del sistema inmune presentes en órganos linfoides⁽¹⁾. Los endocannabinoides son moléculas lipídicas derivadas del ácido araquidónico producidas por las neuronas de nuestro organismo que se unen con alta afinidad a los CB1 y CB2. Los más conocidos son el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) y araquidonoil etanolamida (anandamida).

Además de los endocannabinoides y los fitocannabinoides, se han desarrollado cannabinoides sintéticos. Así mismo, en la planta de cannabis, se encuentran los llamados exocannabinoides, moléculas de estructura y función completamente diferente a las anteriores. Actualmente se reconocen más de 100 cannabinoides diferentes⁽⁶⁾.

Se dividen en compuestos psicoactivos, siendo el más conocido el THC, y no psicoactivos, como el canabidiol (CBD) y canabigerol (CBG). El CBD carece de actividad psicotrópica pero tiene un gran potencial terapéutico para el manejo de diferentes desórdenes como la inflamación, ansiedad, náuseas y vómitos. Parece ser un agente neuroprotector y antioxidante. El CBG es un fitocannabinoide poco investigado que al parecer tampoco tiene efectos psicotrópicos. El THC es el principal compuesto psicoactivo del cannabis, el cual se une con gran afinidad a los receptores CB1. La distribución de los receptores en el sistema nervioso central es consistente con los efectos conocidos de la droga sobre la memoria, los procesos cognitivos, la actividad motriz y la inducción de analgesia⁽⁷⁾.

Modelos de estudio

-In Vitro: Las líneas celulares representan una herramienta esencial para la biología celular y molecular, permitiendo realizar estudios controlados con resultados reproducibles. No debe perderse de vista, sin embargo, que las líneas celulares no alcanzan la complejidad y heterogeneidad de los tejidos, básicamente porque no interactúan con células de diferente tipo, con la matriz extracelular ni con señales parácrinas⁽⁸⁾.

-In Vivo: En este trabajo se evaluó el efecto de la administración de cannabis sobre el ciclo sueño vigilia utilizando ratas como modelo animal.

En los humanos, así como en la mayoría de los mamíferos y aves, se pueden distinguir principalmente tres estados conductuales diferentes; la vigilia (W), el sueño lento o no REM (NREM) y el sueño con movimientos oculares rápidos (REM). La polisomnografía (PSG) es la herramienta básica para diagnosticar estos estados. La misma

consiste en el registro simultáneo de varios parámetros fisiológicos como el electroencefalograma (EEG), el electromiograma (EMG) y el movimiento de los ojos o electrooculograma (EOG).

La vigilia permite una óptima interacción con el ambiente para poder desarrollar comportamientos necesarios para sobrevivir. El registro del EEG de este estado está marcado por la presencia de alta frecuencia y pequeña amplitud de las ondas del EEG, lo que confirma la actividad cortical desincronizada. Durante el sueño hay una disminución importante de la interacción con el ambiente, una reducción del umbral de reacción ante estímulos externos y un descenso de la actividad somatomotora. Del estado de vigilia, los adultos sin sueño patológico entran en el sueño NREM. En estados profundos de esta fase, la actividad cognitiva es mínima o nula. El sueño REM ocurre periódicamente y (siempre precedido por el sueño NREM) es un estado profundo de sueño que se ve similar al estado de vigilia en el EEG, por lo que también es llamado sueño paradójal. Las ensoñaciones ocurren principalmente durante la fase REM del sueño, la cual está acompañada de atonía muscular en el canal del EMG y cambios fásicos en la actividad autonómica. En ratas, especie comúnmente utilizada en estudios preclínicos, la vigilia y el sueño están definidas por el PSG de la manera siguiente. La vigilia está marcada por la presencia de ondas rápidas de pequeño voltaje en el córtex frontal, y una actividad en el canal del EMG relativamente alta. El sueño NREM está marcado por la presencia de ondas frontales y occipitales continuas lentas y de alta amplitud. El sueño REM se da por la presencia de ondas frontales rápidas de bajo voltaje, un ritmo THETA regular en el córtex occipital y un EMG de muy baja amplitud o nulo, excepto por breves espasmos mioclónicos ocasionales. El sueño en

humanos durante la noche muestra 4 a 5 ciclos de sueño NREM-REM. La duración promedio de cada ciclo es entre 90-120 minutos, en contraste con el de rata, cuyo promedio de duración es entorno a los 10 minutos por ciclo⁽⁹⁾.

Contexto Nacional/Justificación del Trabajo

El 10 de diciembre del 2013 se aprobó en nuestro país la ley 19.172 referente a la regulación del cannabis y sus derivados. La misma tiene como objetivo regularizar su producción, distribución y venta, y se enmarca en una política orientada a minimizar riesgos y reducir daños, promoviendo la información, educación y prevención sobre el uso problemático de ese producto (art.1). Es el Estado quien asume el control (art. 2) a través de la creación del Instituto de Regulación y Control del Cannabis (IRCCA)⁽¹⁰⁾, constituyendo el primer país en el mundo con acceso y uso total de manera regulada⁽¹¹⁾. Entre otras, la ley y sus decretos reglamentarios otorgan un marco legal favorable para la investigación científica del cannabis y para la elaboración de productos terapéuticos de uso medicinal. Es en este contexto que se crea el Núcleo Interdisciplinario de Estudios Sobre Cannabis de la Universidad de la República (NIEC), el cual se enfoca en el estudio de los aspectos fitoquímicos, farmacognósticos y de los efectos biológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, el estudio del potencial radioprotector y antimutagénico de los cannabinoides y de los extractos de cannabis. Definir la investigación interdisciplinaria no es tarea fácil, sin embargo, una posible aproximación a la misma es que constituye “una modalidad de investigación para individuos y equipos que integra información, datos, técnicas, herramientas, perspectivas, conceptos o teorías

provenientes de dos o más disciplinas o cuerpos de conocimiento especializado para lograr comprender principios o resolver problemas cuya solución esté fuera del alcance de una disciplina o área de investigación tomada de forma aislada.”⁽¹²⁾. Como se desprende de lo anteriormente mencionado, el NIEC está integrado por investigadores provenientes de diferentes disciplinas, y es a través del Laboratorio de Radiobiología de la Facultad de Medicina que, como estudiantes, tuvimos la posibilidad de aproximarnos a otros servicios tanto dentro de nuestra casa de estudios, así como de la Facultad de Química.

En este trabajo se plantea contribuir desde un enfoque interdisciplinario al desarrollo del conocimiento del potencial uso medicinal del cannabis mediante ensayos en cultivos celulares y modelos animales.

Materiales y Métodos

Extracto de cannabis:

El extracto se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de Facultad de Química extrayendo 0,853 g de flores de *Cannabis sativa* en 20 mL de etanol durante 3 horas con agitación magnética. El extracto se filtró por papel y se diluyó a 25,00 mL de etanol. El contenido de THC y CBD fue determinado mediante cromatografía gaseosa.

Líneas celulares:

Se utilizaron dos líneas celulares; V79 (fibroblasto pulmonar de hámster chino)⁽¹³⁾ y T24 (carcinoma de vejiga⁽¹⁴⁾ donadas por colegas locales quienes las adquirieron del banco de la American Type Culture Collection (ATCC). Ambas líneas

celulares son inmortales y pueden cultivarse en condiciones controladas. Todas fueron descongeladas en baño maría a 37°C⁽¹⁵⁾, luego de lo cual se procedió a la siembra en frascos estériles de 25 cm².

Medio de cultivo:

Se utilizó medio de cultivo RPMI 1640. Se preparó y se filtró mediante presión negativa a los efectos de asegurar la esterilidad del producto final.

Cultivo:

La siembra fue realizada en monocapa, en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino. El cultivo se realizó para las dos líneas celulares en estufa a 37°C con 5% de CO₂. Se mantuvieron las células en estufa por 24 horas, controlando que no existiera crecimiento microbiano. Para esto se agregó al medio penicilina (200 U/mL) y estreptomycinina (50 µg/mL). Se controló el crecimiento celular mediante observación directa al microscopio óptico invertido.

Conteo:

Pasadas 48 horas de cultivo se contaron las células y se sembraron en placas de 96 pocillos

Preparación de la placa:

Una vez contadas las células se procedió a la siembra en las placas de 96 pocillos. Se sembró por triplicado cada línea celular conforme al diseño de placa detallado (Figura 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V79											
B	T24											
C												
D												
E	V79											
F	T24											
G												
H												

Figura 1. Diagrama de la disposición en la placa

A su vez, se observa que se realizó el mismo diagrama duplicado, uno por el tutor y otro por los estudiantes. Se realizó por triplicado para cada concentración y una por triplicado de control. Las concentraciones de extracto utilizadas fueron de 100 µM, 10 µM y 1 µM en CBD. Tras la exposición al extracto se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Todos los pasos hasta el momento fueron realizados bajo condiciones de estricta esterilidad en cámara de flujo laminar vertical. Luego se lavaron los pocillos con buffer fosfato salino (PBS). Se fijaron las células con ácido acético al 1% en metanol frío y se incubaron a -20°C.

Medida de sobrevida:

Luego de la fijación se adicionó la solución de sulforodamina B (SRB) y se procedió a la incubación. Tras una hora de incubación se procedió al lavado, en cantidad suficiente para remover el exceso de SRB y evitar la sobreestimación⁽¹⁶⁾.

La lectura se realizó en espectrofotómetro a 510 nm y la medida del background a 620 nm. Se obtuvieron valores de absorbancia mediante los cuales se realizó el cálculo del porcentaje de supervivencia. Este se basa en la relación entre la absorbancia de las células tratadas y las no tratadas o células de control.

Estudio del sueño:

Tras la aprobación por el Comité de Ética correspondiente (Exp. N° 070153-000089-17), en el Laboratorio de Neurofisiología del sueño se utilizaron ratas con implantes crónicos cerebrales para realizar un electroencefalograma y electromiograma en forma continua. Las mediciones se realizaron durante periodos de 6 horas, con y sin exposición a material vegetal de cannabis vaporizado con 11,5% de THC y menos de 0,05% de CBD. Los resultados se analizaron en el laboratorio según 7 registros (Figura 2), en intervalos de 10 segundos catalogando tres fases: vigilia, sueño NREM y sueño REM, según las características de las ondas predominantes en cada intervalo de tiempo.

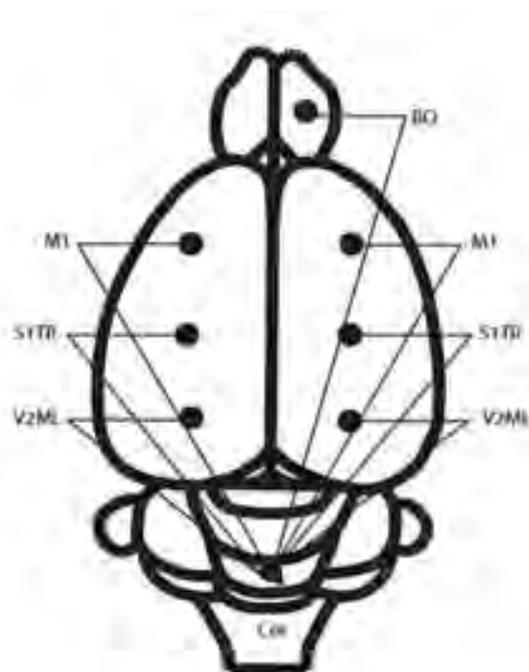


Figura 2. Colocación de electrodos a nivel cortical para los registros de EEG. BO: Bulbo olfatorio, M1: Corteza motora primaria, S1: Corteza somatosensitiva primaria, V2: Corteza visual secundaria. Cer: Cerebelo (electrodo indiferente)

Se realizó, además del análisis del sueño, la medida en los efectos sobre la potencia, que analiza las ondas que componen el registro electroencefalográfico completo. Los animales fueron tratados con 0 mg (sham), 40 mg y 80 mg de material vegetal mediante vaporización del mismo con vaporizadores comerciales.

Resultados

En cuanto a la búsqueda del trabajo interdisciplinario es de destacar que se consiguió un abordaje amplio del tema al poder conocer las formas de trabajo de tres laboratorios distintos que se encuentran investigando las propiedades del cannabis. Fue posible, a su vez, formar parte del intercambio en el trabajo entre éstos, enmarcados dentro del NIEC.

El primer paso del trabajo consistió en conocer el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Química donde se realizaron los extractos de cannabis.

Siguiendo el algoritmo de trabajo del NIEC, se procedió luego al cultivo de las líneas celulares para realizar los ensayos de sobrevivencia. Dentro de la base del Núcleo se encuentra este proceso de trabajo, partiendo del análisis de la muestra obtenida hasta los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se logró realizar la puesta a punto necesaria para los cultivos de las líneas celulares, lo cual permitió realizar los ensayos posteriores.

Se trabajó en aspectos metodológicos en el Laboratorio de Radiobiología. Fue posible aprender la técnica de cultivo de líneas celulares y realizar el tratamiento con los extractos obtenidos de Facultad de Química.

Los cultivos celulares realizados en monocapa de tipo estacionario mostraron un crecimiento uniforme, cumpliendo el ciclo en 24 horas. No se

observó crecimiento microbiano a la microscopía óptica.

Al realizar el conteo del número de células en cámara Neubauer para cada cultivo se obtuvo un resultado de 7 células por campo de gran aumento para las células V79 y 5 para las células T24.

La siembra en placas de 96 pocillos fue de 10.000 células por pocillos, de las cuales se observó un crecimiento de acuerdo a lo esperado para los experimentos realizados.

En cuanto a la medición de la sobrevida se realiza a través del cálculo del promedio de las absorbancias (Tablas 1 y 2). El mismo se obtiene a través de la diferencia entre los resultados obtenidos para 510nm y 620nm.

Tabla 1. Promedios de absorbancia de medidas realizadas por tutor ($p < 0.05$)

	100 μ M	10 μ M	1 μ M	CONTROL
V79	0,67	0,69	0,25	1,0
T24	1,0	1,0	0,80	1,0

Tabla 2. Promedios de absorbancias de medidas realizadas por estudiantes ($p < 0.05$)

	100 μ M	10 μ M	1 μ M	CONTROL
V79	1,0	1,0	1,0	1,0
T24	1,0	1,0	0,1	1,0

Tras obtener los promedios se realizan los cálculos de la sobrevida según la exposición a las distintas concentraciones de extracto obteniéndose los resultados expuestos en el Gráfico 1. Se trabajó con los porcentajes de supervivencia de cada línea celular (Tablas 3 y 4).

Gráfico 1. Supervivencia en función del tratamiento. Curva dosis-respuesta del extracto de cannabis sobre la supervivencia celular. La (B) hace referencia a los valores obtenidos por el tu

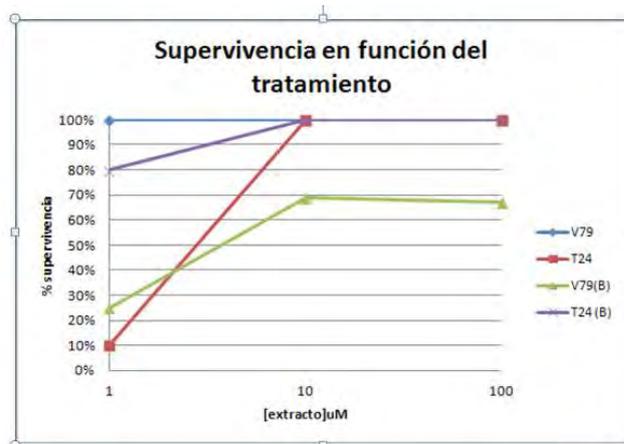


Tabla 3. Porcentaje de sobrevida de la medida realizada por el tutor ($p < 0.05$)

	100 μ M	10 μ M	1 μ M	CONTROL
V79	67%	69%	25%	1,0
T24	100%	100%	80%	1,0

Tabla 4. Porcentajes de sobrevida de medidas realizadas por estudiantes ($p < 0.05$)

	100 μ M	10 μ M	1 μ M	CONTROL
V79	100%	100%	100%	1,0
T24	100%	100%	10%	1,0

A continuación se presentan los resultados obtenidos por el Laboratorio de Neurobiología del Sueño de la Facultad de Medicina en cuanto a las medias y error estándar del efecto de la vaporización de 40 y 80 mg de material vegetal de cannabis sobre los tiempos de sueño y vigilia durante las 6 horas de registro (Figura 3)⁽¹⁷⁾.

En la Figura 4 se observan los resultados obtenidos en los ensayos realizados relativos al análisis de la potencia, donde se observan con un código de color las cortezas que tuvieron un incremento significativo de la potencia bajo los efectos de cannabis⁽¹⁷⁾.

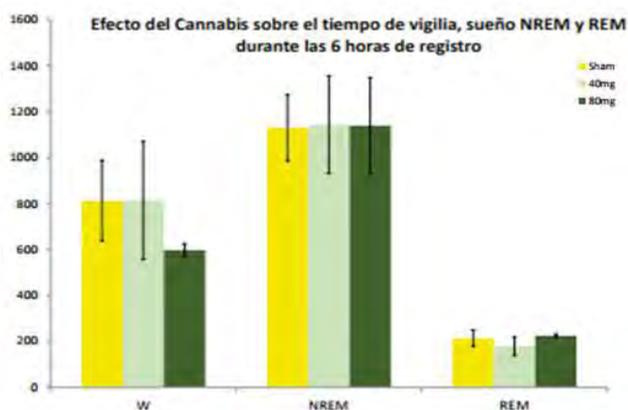


Figura 3. Tomado de: Mondino(17). Efecto del cannabis sobre el tiempo de vigilia, sueño NREM y REM durante las 6 horas de registro

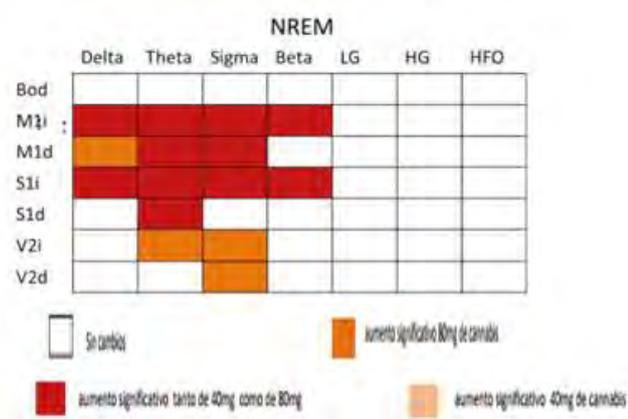


Figura 4. Tomado de: Mondino(17). Efecto de la administración aguda de Cannabis mediante vaporización sobre el ciclo sueño-vigilia y la potencia de las bandas de frecuencia del EEG

Discusión

La determinación de las concentraciones a utilizar de extracto se basó en los ensayos previos realizados en el Departamento de Radiobiología. Se utilizaron dosis en escala logarítmica para obtener los resultados tanto de dosis bajas como de dosis altas. No se esperaba encontrar gran toxicidad con ninguna de las dosis utilizadas.

En cuanto a los resultados del análisis de viabilidad celular es posible dividirlos en dos comportamientos diferentes según las concentraciones de extracto utilizadas. Entre 10 y 100 μM no se observaron diferencias en la supervivencia de las células. Los resultados son compatibles para ambas líneas

celulares, en las que en estas concentraciones no hay una importante caída de la supervivencia.

El otro grupo de resultados obtenidos es el de las células a las que se les aplicó un extracto con una concentración de 1 μM . En los ensayos realizados por el tutor, se observó a esta concentración una clara caída en la supervivencia en las células V79 (al 25%) y una disminución menos marcada en las T24 (al 10%). Esto se observó también en los ensayos realizados por los estudiantes en su proceso de aprendizaje. Es importante destacar que como se puede observar de los resultados obtenidos, existen diferencias entre los que se logran por manos experimentadas y los realizados por los estudiantes. Es así que es posible concluir que para lograr resultados confiables es necesaria la repetición de las técnicas. En concordancia con estos resultados se encuentran otros que no han sido presentados, realizados por el laboratorio en concomitancia con este proyecto, en los cuales se describe un comportamiento similar de las células en un rango de concentraciones más estricto (0,1; 0,5; 1; 5 y 10 μM).

De estas observaciones resulta interesante la propuesta de los diferentes mecanismos que podrían estar implicados en la disminución de la supervivencia frente a la exposición a extractos con menores concentraciones de cannabinoides. Se pueden plantear como probables diferentes hipótesis por las cuales se observan estas diferencias. Una podría ser el sitio de acción de las moléculas presentes en los extractos y las concentraciones a las que son activados los distintos receptores a los que se unen. Éstas tienen actividad en la superficie celular, en receptores citoplasmáticos y en el núcleo. Podría plantearse que a menores concentraciones solo se accede a los receptores de superficie y que al aumentar las mismas se pueden activar los intracelulares que podrían estar

exhibiendo actividades que antagonicen las que presentan los receptores de superficie.

En relación a la hipótesis planteada anteriormente se puede generar la duda acerca de si se logra efectivamente el ingreso del extracto a las células. Se probó como vehículo el etanol al 1% existiendo otras posibilidades para utilizar.

Otra hipótesis a plantear es que al utilizar un extracto de planta entera sólo se conoce la concentración de los cannabinoides que se explora en el laboratorio de farmacognosia, pero no la totalidad de componentes de la muestra. En ésta ciertos polifenoles pueden tener acciones que no se estarían teniendo en cuenta.

Se presenta entonces este último como un resultado que genera interrogantes, que lleva a la realización de experimentos posteriores. Sería pertinente repetir estos ensayos de manera de obtener resultados de mayor fiabilidad tras el entrenamiento obtenido durante esta pasantía.

Para determinar el impacto en el ciclo sueño-vigilia de las ratas se las expuso a distintas concentraciones de cannabinoides y se las comparó a los registros de ratas que recibieron la misma manipulación, pero no se les vaporizó la sustancia (sham).

No existieron diferencias significativas en las tres fases estudiadas tras la exposición a la vaporización de 40 y 80 mg de la sustancia. La duración de la vigilia, el sueño NREM y sueño REM no se vio afectada por la administración de las distintas concentraciones de sustancia.

En cuanto a la potencia de las distintas bandas de frecuencias del EEG, se observaron diferencias significativas en el sueño no REM de las ondas delta, theta, sigma y beta durante la primera hora de registro. Mientras que durante el sueño REM observamos un aumento significativo de la potencia de las bandas gamma y las oscilaciones

de alta frecuencia (> 30 Hz) durante la segunda hora de registro.

Estos resultados pueden permitir plantear la probabilidad de que la administración de Cannabis genera una profundización en el sueño NREM. Esta profundización se explica por el aumento de la potencia de las ondas más lentas del EEG. Por otro lado, durante el sueño REM en que la corteza tiene una actividad similar a la vigilia, la administración de Cannabis conlleva una mayor activación cortical.

Desde un punto de vista evolutivo debemos tener en cuenta que el ciclo de sueño y vigilia constituye un fenómeno complejo que involucra su aparición en los invertebrados. Nos habla de su rol en biología y la importancia de los modelos de estudio en animales no solo para establecer líneas de investigación preclínicas sino para comprender aspectos básicos de las neurociencias que permitan avanzar en el conocimiento de fenómenos vitales para el ser humano y trazar correlaciones vinculadas a los procesos de salud enfermedad.

Es de destacar el interés que lleva la utilización de esta sustancia en los diversos campos, particularmente a nivel medicinal, en países que han colaborado inicialmente con su prohibición como Estados Unidos donde aún hoy es considerada ilícita. Si bien existen controversias en cuanto al uso terapéutico cada vez nos acercamos a un estatus de mayor evidencia científica y en el mundo se genera la necesidad de crecientes consideraciones sobre la protocolización desde las buenas prácticas de cultivo hasta los controles de calidad que aseguren un uso eficaz de la especialidad vegetal o de un medicamento que complete las fases de investigación clínica tradicional.

Conclusiones y Perspectivas

Se ha presentado un trabajo en el que se puede reconocer el algoritmo de trabajo de un núcleo interdisciplinario abocado a un tema de relevancia actual como es la generación de conocimiento sobre el cannabis en el área de la salud. La participación de tres Departamentos de dos Facultades de la Universidad enriquece de gran manera los objetivos planteados. Las posibilidades de desarrollo en esta área han permitido el aprendizaje de diferentes técnicas de estudio, tanto *in vitro* como *in vivo*, pudiendo formar parte del núcleo de trabajo interdisciplinario.

Como perspectivas, queda planteado como trabajo a futuro un proyecto presentado y aprobado por parte del Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil (PAIE) de la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), en el que se profundizará sobre los datos obtenidos durante la pasantía en el Departamento de Radiobiología. El proyecto buscará investigar los posibles mecanismos de radioprotección que brinden los extractos de cannabis a diferentes líneas celulares cuando estas son sometidas a radiación ultravioleta.

Los resultados obtenidos durante la pasantía por el laboratorio nos hacen plantearnos nuevas interrogantes sobre los ensayos de viabilidad celular, por lo que resulta interesante también ahondar sobre los mismos para conseguir más información acerca de lo observado.

Se plantea realizar ensayos que permitan probar otros extractos con diferentes composiciones, ya sea de concentraciones de cannabinoides o que no sean obtenidos de la planta entera para disminuir la cantidad de sustancias desconocidas en la muestra.

Sería de interés también repetir los procedimientos con un abanico de concentraciones más reducido para lograr observar las diferencias con mayor detalle.

Otro punto a trabajar es la vehiculización de las sustancias, ya que es otro de los factores que quedan por estudiar. De ser posible, el marcaje de alguno de los componentes de los extractos y el posterior estudio de las células nos permitiría aproximarnos a la idea del ingreso de los componentes de estudio a las células de forma de ver donde están ejerciendo su acción.

El proyecto ya ha sido aprobado por el PAIE y será puesto en marcha como continuación del trabajo realizado para el curso de Metodología Científica II.

En cuanto al desarrollo interdisciplinario queda abierto un amplio abanico de posibilidades de abordaje que pueden utilizar insumos para investigación básica y aplicada; los mismos podrán influir en la obtención de conocimiento integral sobre fenómenos complejos que contribuyan no solo en la salud humana sino en el bienestar colectivo.

Referencias

- García Carnelli C. Cannabis medicinal: Un enfoque farmacognóstico en un contexto interdisciplinario. *Rev Asoc Química y Farm del Uruguay*. 2017;76:12–22. *Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay*. 2017;76(27):12-22
- Covarrubias-Gómez A. Utilidad de la Cannabis sp. en medicina: Una perspectiva basada en la historia. *Revista mexicana de anestesiología*. 2011;34(2):138–40.
- Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol*. 2006;147(Supl 1):S163-71
- Sawler J, Stout JM, Gardner KM, Hudson D, Vidmar J, Butler L, et al. The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. *PLoS One*. 2015;10(8):e0133292.
- Mechoulam R. The Endocannabinoid System: A Look Back and Ahead. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;231:vii-ix.
- Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa : The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front plant sci*. 2016;7:1–17.
- Pertwee RG. *Handbook of Cannabis*. 1a ed. OXFORD; 2014. 115-136 p.
- Lopes-Ramos CM, Paulson JN, Chen C, Kuijjer ML, Fagny M, Platig J, et al. Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin. *BMC Genomics*. 2017;18:723.
- Tortero P, Monti JM, Pandi-Perumal SR. Neuroanatomy and neuropharmacology of sleep and wakefulness. En: Pandi-Perumal SR. *Synopsis of Sleep Medicine*. Apple Academic Press; 2016
- Monti JM, Tortero P, Pandi Perumal SR. The effects of second generation antipsychotic drugs on sleep variables in healthy subjects and patients with schizophrenia. *Sleep Med Rev*. 2017 Jun;33:51-57.
- Ley Marihuana y sus Derivados. Control y regulación del Estado de la importación, producción, adquisición, almacenamiento, comercialización y distribución. Ley N° 19.172 (Promulgada el 20/12/2013). Disponible: <https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp8356105.htm>
- Gould J. The cannabis crop. *Nature*. 2015;525(7570):S2-3.
- ATCC. *Cricetus griseus*, hamster, Chinese [Internet]. Available from: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-93.aspx>
- ATCC. *Homo sapiens*, human [Internet]. Available from: <https://www.atcc.org/products/all/HTB-4.aspx>
- Salgado RC, Yamazaki AK, Caballer AD, Prokopowitsch I. Evaluación de la citotoxicidad de la Clindamicina en cultivos de fibroblastos gingivales humanos. *Rev Cubana Invest Biomédica*. 2013;32(3):302–11.
- Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Madrigal-Santillán EO, Morales-González JA, Torres-Gómez A, Cristóbal-Luna JM. Genotoxic Evaluation of Duloxetine II. The Effect on the Number of Sister Chromatid Exchanges, the Mitotic Index, and the Proliferation Kinetics in Mouse Bone Marrow. *Biol Pharm Bull* 2017;40(10):1796-1800.
- Thomas BF, Pollard GT. Preparation and distribution of Cannabis and Cannabis-derived dosage formulations for investigational and therapeutic use in the United States. 2016;31(7):1–6.

Agradecimientos

A los integrantes del Laboratorio de Radiobiología del Dpto de Biofísica (Facultad de Medicina) donde realizamos el trabajo propuesto inicialmente.

A los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología del Sueño del Dpto de Fisiología (Facultad de Medicina), quienes nos aproximaron a todo el trabajo que allí realizan en relación a la temática.

A Santiago Fernández del Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales (Facultad de Química), por proporcionarnos los extractos que permitieron llevar adelante los experimentos.

A los compañeros de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Medicina quienes nos asistieron en las lecturas de absorbancia necesarias para construir las curvas de sobrevida celular.