**Proyecto para el trabajo de pasantía**

**Licenciatura en Biología Humana**

**Facultad de Ciencias, UdelaR**

**Estudio de la actividad neuroprotectora de extractos de cannabis, variedades Alfa I y Beta I, producidas y comercializadas en Uruguay.**

Estudiante: Federico Vignolo

Laboratorio de Mecanismos de Neurodegeneración y Neuroprotección-Departamento de Neuroquímica. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Tutora: Dra. Carolina Echeverry

Mayo, 2022

**Resumen**

Cannabis sativa L. contiene más de 500 compuestos, incluyendo un grupo particular conocido como fitocannabinoides. Dentro de este grupo los más conocidos son el delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) por sus propiedades psicotomiméticas y el cannabidiol (CBD) por su potencial terapéutico. En 2013 Uruguay, mediante la Ley 19.172, fue el primer país en dar el puntapié inicial en la regulación del consumo de cannabis con fines recreativos y medicinales. De este modo se permitió, en una primera instancia, el acceso a la población (mayores de 18 años) de dos variantes de Cannabis, Alfa I y Beta I. La primera con predominancia de variedad “índica” y la segunda de variedad “sativa''. Esta regulación generó gran interés en la población en general, tanto en el sector popular como en la academia. Esta última, con el fin de explorar diversas características, entre ellas, las propiedades terapéuticas de la planta. Sin embargo, escasos estudios se han realizado hasta ahora sobre los efectos producidos por dichas variedades (Alfa y Beta). En los últimos años, el estudio de la propiedad neuroprotectora de los cannabinoides ha ganado mucho interés dada la falta de terapias disponibles para tratar enfermedades neurodegenerativas En este sentido varios estudios preclínicos han mostrado la acción neuroprotectora de algunos cannabinoides. Sin embargo, existe la teoria de que combinaciones de cannabinoides y otros compuestos presentes en la planta podrían ser más efectivos que los cannabinoides individuales, pero no hay evidencia suficiente para respaldar esta hipótesis

En este trabajo proponemos evaluar la capacidad neuroprotectora de extractos de las variantes Alfa I y Beta I, en un modelo de cultivo celular neuronal (*in vitro*) frente a la rotenona (actuando como agente neurotóxico). Para cumplir con este objetivo en primer lugar se llevarán a cabo diferentes métodos de extracción. Dado que la literatura indica que la capacidad antioxidante (CA) de Cannabis podría ser la responsable de su potencial neuroprotector, y que esta propiedad está relacionada con el contenido en fenoles totales (FT). Se determinarán estos 2 parámetros y seleccionarán los extractos de mayor rendimiento para su posterior estudio neuroprotector.

Los resultados obtenidos en este proyecto nos permitirán determinar si los extractos de Alfa y Beta presentan propiedad neuroprotectora, y compararlos con el efecto neuroprotector de CBD aislado.

**Introducción y antecedentes:**

El presente trabajo de investigación, que se llevará a cabo en marco de mi pasantía de grado, dará lugar a un breve recorrido general sobre la planta *Cannabis Sativa L* y sus propiedades fitoterápicas.

Hay principalmente dos grupos de uso de Cannabis (Lynch et al. 2016): cáñamo definido por un límite de < 0,3% Δ9-tetrahidrocannabinol (THC) en los EE. UU., y marihuana con concentraciones de THC de moderadas a altas (siempre > 0,3 % de THC). En el mercado comercial, el cannabis se ha dividido en cepas (variedades): Sativa, que según se informa, tiene efectos estimulantes y más psicotrópicos, Indica, que según se informa, tiene efectos más relajantes y sedantes, e Híbrido, que es el resultado de cruzar tipos Sativa e Indica que dan como resultado efectos intermedios. Sin embargo, los análisis genéticos no han proporcionado un consenso claro para una distinción taxonómica entre estos tipos de Cannabis comúnmente descritos (Lynch et al. 2016; Sawler et al. 2015), y también se debate si existe una diferencia verificable entre las cepas de tipo Sativa e Indica (McPartland 2017; Piomelli y Russo 2016; Erkelens y Hazekamp 2014). A pesar de esto, tanto la comunidad de Cannabis medicinal como la recreativa afirman que existen claras diferencias en los efectos entre las cepas de tipo Sativa e Indica (Leafly 2018; Seedfinder 2018; Leaf Science 2016; Smith 2012). En Uruguay, se cultiva y se comercializa en farmacias registradas, distintos híbridos derivados de ambas variedades. Las variedades son la Alfa I (híbrido con predominancia de cannabis índica), y la Beta I (híbrido con predominancia de cannabis sativa), cada una de ellas con proporciones menores o iguales a 9% de THC y mayores o iguales a 3% de CBD. Hoy en día también se puede adquirir en farmacias las variedades Alfa II y Beta II, y Alfa III y Beta III (con leve incremento en su concentración de CBD y THC respecto a Alfa I y Beta I) (reportes del IRCCA).

***Cannabis sativa L* y su composición química**

Hoy en día gracias al avance científico, se conocen alrededor de 500 compuestos derivados de esta planta, entre ellos están los flavonoides, terpenos, saponósidos, carotenoides y un grupo químico particular de este vegetal, denominado cannabinoides. Los cannabinoides presentan ciertas similitudes en su estructura química, aunque existen ciertas diferencias, lo que les confiere diferente actividad. Estos varían en número y en cantidad en dependencia del clima, tipo de suelo, variedad cultivada e incluso de la forma en que se haya realizado su cultivo.

Cannabinoides

El término cannabinoide describe aquellas sustancias que tienen una estructura carbocíclica con 21 átomos de carbono y entre los que se incluyen sus análogos y los productos procedentes de su transformación. Desde principios del siglo pasado los esfuerzos en este campo se centraron en dilucidar la estructura química de estos compuestos. El primer fitocannabinoide descubierto en un laboratorio fue el Cannabinol (CBN), el cual carecía de efectos psicoactivos pero que al parecer es producto de THC (Harvey, 1984). Continuando en la búsqueda de ese componente que de alguna manera producía efectos psicoactivos, se aisló el segundo compuesto perteneciente a esta clase de moléculas, el Cannabidiol (CBD), el cual tampoco poseía efectos significativos a nivel conductual (Adams y cols., 1940). Unos años más tarde, se descubrió el Tetrahidrocannabinol (THC), principal componente psicoactivo del cannabis (Mechoulam y Shvo, 1963), (Gaoni y Mechoulam, 1964). En la actualidad se han descrito más de 180 fitocannabinoides entre los que cabe destacar, -además de los mencionados anteriormente- el Cannabigerol (CBG) y el Cannabicromeno (CBC) (Fraguas y cols., 2014).

La síntesis de los fitocannabinoides comienza con las moléculas precursoras ácido olivetólico y geranil pirofosfato, que se combinan para formar el ácido cannabigerólico (CBGA) (Shoyama et al., 1975; Fellermeier y Zenk, 1998; Fellermeier et al., 2001; Gülck y Møller, 2020). El CBGA actúa como precursor de la mayoría de los otros cannabinoides y se convierte en ácido Δ9-tetrahidrocannabinólico (Δ9-THCA), ácido cannabidiólico (CBDA) y ácido cannabicroménico (CBCA) que resulta de la oxidación de THCA a través de sus respectivas enzimas de formación (ácido tetrahidrocannabinólico sintasa, ácido cannabidiólico sintasa y ácido cannabicroménico sintasa). Debido a que el CBGA sirve como molécula precursora de los otros cannabinoides, normalmente se encuentra en cantidades muy bajas en el Cannabis; sin embargo, las cepas con actividad reducida de las tres principales enzimas de síntesis pueden acumular niveles más altos de CBGA (Fellermeier y Zenk, 1998; Fellermeier et al., 2001). Todos los cannabinoides producidos enzimáticamente (incluido el CBG) se producen en su forma ácida y luego se descarboxilan mediante calor para crear la forma "activa" (CBG, THC, CBD y CBC). (R, Nachnani y cols., 2021).

Terpenos

Se han aislado y caracterizado al menos 200 terpenoides estructuralmente diferentes de las flores de Cannabis sativa (Ross y ElSohly 1996), las raíces (Slatkin y cols., 1971), las hojas (Hendriks y cols., 1975) y los tricomas (Kim y Mahlberg 2003; Giese et al., 2015). Los terpenos son los responsables del olor y el sabor de las diferentes variedades de Cannabis y han contribuido a la selección de las variedades narcóticas de Cannabis bajo domesticación humana (Small 2015). Los terpenoides más abundantes y representativos son el β-mirceno, el transcariofileno, el α-pineno, el trans-ocimeno y el α-terpinoleno (Malingré y cols., 1975). Específicamente, en aquellas cepas de Cannabis destinadas al consumo de drogas psicoactivas, los terpenoides más prominentes y únicos que se identiﬁcaron fueron el β-cariofileno-epóxido (de hecho, este es el compuesto percibido por los perros entrenados para detectar drogas) y el m-mentha-1,8(9)-dien-5-ol (Russo 2011). Los terpenos, junto con los cannabinoides, se han utilizado con éxito como marcadores quimiotaxonómicos en el Cannabis, ya que ambos se consideran los principales metabolitos secundarios fisiológicamente activos (Fischedick y cols., 2010; Elzinga y cols., 2015). Es importante señalar que los terpenos son compuestos lipofílicos que atraviesan fácilmente las membranas biológicas, y en particular, la barrera hematoencefálica (Fukumoto y cols., 2006), esto sugiere que podrían tener diferentes acciones sobre el sistema nervioso central. En este sentido, varias revisiones actuales describen una amplia gama de propiedades farmacológicas de estos compuestos (Russo 2011; Singh y Sharma 2015). (Echeverry y cols., 2021).

Flavonoides

Los flavonoides son el mayor grupo de fitoquímicos fenólicos y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndose encontrar en frutas, hojas, semillas y flores. Su gran distribución es debida a la gran variedad de funciones que desempeñan como pigmentantes, productos defensivos e inhibidores del crecimiento. Su propiedad principal es la capacidad antioxidante, aunque también actúan como tónicos venosos y antiinflamatorios. Los compuestos fenólicos, también conocidos como fenilpropanoides, constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Presentan más de 10.000 estructuras diferentes, incluyendo ácidos fenólicos, como los ácidos benzoico e hidroxicinámico, ﬂavonoides como los ﬂavonoles y las ﬂavonas, estilbenos y lignanos (Andre y cols., 2010; Solanki et al., 2015). En el Cannabis se han identiﬁcado unos 20 ﬂavonoides, principalmente pertenecientes a las subclases ﬂavona y ﬂavonol (Flores-Sánchez y Verpoorte 2008). Los ﬂavonoides del Cannabis pueden clasificarse en tres categorías: (1) O-glicósidos de apigenina, luteolina, quercetina y kaempferol (Mc Partland y Mediavilla 2002), (2) C-glicósidos de orientina y vitexina (Vanhoenacker et al. 2002) y, (3) ﬂavonoides prenilados de cannaﬂavina A y B (Barrett y cols., 1986).

**Enfermedades Neurodegenerativas. Necesidad de estrategias terapéuticas eficaces**

Aunque las enfermedades neurodegenerativas difieren en sus características clínicas y neuropatológicas, todas se caracterizan morfológicamente por la pérdida progresiva de poblaciones neuronales específicas y vulnerables del SNC. La muerte neuronal en estas neuropatologías es un fenómeno complejo que implica la alteración de varios fenómenos, entre los cuales se destacan, los procesos metabólicos y de la función mitocondrial, aumento de daño oxidativo, defectos en el sistema proteosomal, agregación de proteínas, cambios en el metabolismo del hierro y el calcio, excitotoxicidad e inflamación (Alexi et al., 200). En todos estos procesos celulares, el daño mitocondrial y el estrés oxidativo (EO) son componentes claves en la muerte neuronal (Hayashi, 2009, Xiong et al, 2012). Es por esto que fármacos con capacidad de inhibir estos procesos oxidativos podrían retardar o prevenir, en cierto grado, el avance de dichos trastornos neurodegenerativos. Durante los últimos 20 años, se ha investigado la propiedad terapéutica de numerosos compuestos capaces de incrementar la supervivencia de las neuronas. Esta estrategia ha incluido agentes antioxidantes, antiinflamatorios o antiexcitotóxicos, inhibidores de la apoptosis, potenciadores de la autofagia o factores neurotróficos. Sin embargo, la mayoría de ellos no han podido reproducir en humanos los efectos positivos observados en los modelos experimentales. Los cannabinoides se han incorporado de forma más reciente a este arsenal neuroprotector en investigación, y han evidenciado tener una serie de ventajas interesantes sobre los compuestos neuroprotectores clásicos (Scotter et al, 2010, Hampson et al 1998). Estos compuestos además de ser potentes antioxidantes y antiinflamatorias son capaces de interaccionar con el sistema endocannabinoide (SEC) potenciando así sus propiedades beneficiosas. (Palomo Garo, C. 2016).

**Sistema endocannabinoide (SEC)**

Se creía con anterioridad, que los cannabinoides ejercían efecto en el organismo debido a ciertas modificaciones en la membrana plasmática, producto de la difusión de las mismas por su alta tasa de lipofilidad, generando modificaciones en estas y consecuentemente el efecto orgánico. Esto fue así hasta que se encontró un sistema de comunicación interno, a nivel celular, lo que llevó al descubrimiento de los receptores de membrana, los encargados de responder frente a la presencia de los cannabinoides (Mechoulam y cols., 1999; Herkenham et al., 1991). Los receptores cannabinoides son 2, CB1 y CB2 (acoplados a proteínas G) (Katona y Freund, 2012), donde CB1 está involucrado principalmente en el SNC (localizado en ganglios basales, corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo y médula), y CB2 se encuentra asociado al sistema inmune, caracterizado en 1993, tres años después que CB1. Entonces, si ya existía un proceso de respuesta frente a cannabinoides exógenos, esto condujo a la búsqueda de ligandos endógenos que fueran los responsables de la activación de los canales receptores. Estos ligandos son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, derivados del ácido araquidónico, y son sintetizados a demanda por el organismo. Los más estudiados y conocidos al momento (entre otros) son la N-araquidonil etanolamida o anandamida (AEA) y el 2-araquidonil glicerol (2-AG) (Devane y cols., 1992). SEC posee un amplio espectro de acción sobre los circuitos neuronales y participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos. (Zou y Kumar 2018). Los endocanabinoides son capaces de actuar como mensajeros retrógrados en las sinapsis neuronales. Se sintetizan por un mecanismo dependiente de calcio en los terminales postsinápticos, siendo capaces de difundir al terminal presináptico inhibiendo la liberación de neurotransmisores. Esta propiedad refuerza la idea de que los endocannabinoides poseen una alta capacidad de interacción con distintos sistemas de neurotransmisión, tanto excitatorios como inhibitorios (Mestre y cols., 2005). Por lo tanto, la utilización de agonistas y antagonistas de este sistema podría regular la sintomatología de muchas afecciones nerviosas (Pacher et al., 2006). Además, con el paso de los años se ha venido demostrando la capacidad que posee el sistema endocannabinoide para mediar en distintos procesos relacionados con la respuesta inmune, como, por ejemplo, en los procesos neuroinflamatorios muy habituales en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, entre otras patologías como en cáncer (Guindon et al., 2010).

**Cannabis y neuroprotección.**

En la última década, varios estudios han demostrado que algunos cannabinoides aislados y purificados (en su forma activa -no acídica-) son capaces de disminuir el efecto nocivo producido por diferentes estímulos citotóxicos (ej. estrés oxidativo) en modelos de neurotoxicidad, indicando una posible capacidad neuroprotectora (Echeverry et al., 2020).

Se sabe que CBD puede actuar por diferentes vías en el organismo, actuando como neuromodulador, desde un lugar de agonista parcial, o antagonista de los receptores cannabinoides. Esto le confiere propiedades de acción estudiadas, como ansiolítica, antiinflamatoria, neuromoduladora, antipsicótico y antiepiléptico (Moreira et al., 2006; Iannotti et al.,2016; Mechoulam and Parker, 2013; Duran et al., 2004).

En 2017 se autorizó en Uruguay la prescripción de medicamentos en base a cannabis con receta profesional y en 2020 se aprobó la Ley 19.847. Esta normativa establece las pautas para el acceso al cannabis medicinal y terapéutico, definiendo cuatro tipos de productos medicinales a los cuales se podrá acceder: (1) especialidades farmacéuticas (medicamentos en el sentido tradicional), (2) productos vegetales (especialidades vegetales, medicamento fitoterápico y productos vegetales en base a cannabis), (3) formulaciones magistrales, y (4) la importación de productos en base a cannabinoides con fines medicinales. Tal es el caso de Epifractán, Xannadiol, Xalex y Bidiol, que son medicamentos obtenidos de extractos de cannabis (con predominancia de CBD), que fueron aprobados por el Ministerio de Salud Pública, para su comercialización bajo receta médica, en las farmacias autorizadas. Estos medicamentos son recetados principalmente para Epilepsia Refractaria en niños y adolescentes. También se recetan frente a otras patologías, y se utiliza con fines antiinflamatorios, analgésicos y antiespasmódicos. Dada la falta de terapias efectivas para tratar enfermedades neurodegenerativas, existe interés en valorar este tipo de formulaciones como agentes neuroprotectores. En este sentido, la capacidad neuroprotectora de algunos cannabinoides ha sido evaluada y particularmente varios estudios preclínicos y clínicos relacionados con trastornos neurodegenerativos han reportado al CBD como neuroprotector (Campos et al. 2016; Peres et al. 2018; Zunino y cols., 2018).

Los mecanismos moleculares implicados en esta propiedad parecen ser muy diversos y frecuentemente complementarios, sugiriendo que una ventaja adicional para los fitocannabinoides estaría dada por su capacidad de actuar no solamente sobre el SEC, sino sobre múltiples sitios de acción (Echeverry et al., 2020). La capacidad antioxidante está incluida como parte de estos mecanismos, ya que es crucial para prevenir la disfunción celular producida por el estrés oxidativo (Hampson et al., 1998; Grotenhermen et al., 2003). También, se ha comprobado su claro potencial antiinflamatorio al intervenir de manera directa en la cascada de las reacciones inflamatorias (Suero-García, Carlos, et. al, 2015).

Aunque existen evidencias de la actividad neuroprotectora de cannabinoides individuales como el CBD y el THC (Happyana et al.,1998), en la literatura se postula que combinaciones de cannabinoides y otros compuestos presentes en la planta podrían suponer ventajas clínicas, tales como una potenciación de su actividad individual, un aumento de la ventana terapéutica de dosis y una disminución de los efectos secundarios. Sin embargo, hasta el momento no hay evidencia suficiente para respaldar esta hipótesis. Este fenómeno se conoce como "efecto séquito", y estaría dado por la contribución positiva derivada de la adición de terpenos y flavonoides al efecto de los cannabinoides (Russo, E. B. 2011). Esto significa que la totalidad del efecto es mayor que la suma de los efectos de sus partes contribuyentes. El efecto séquito en el Cannabis fue postulado por primera vez por Mechoulam y Ben-Shabat (Mechoulam R., Ben-Shabat S. 1999). Sus hallazgos les llevaron a desarrollar la hipótesis de que otros productos biológicos inactivos, que acompañan a los cannabinoides endógenos primarios, aumentan su actividad. Russo describió el concepto de sinergia botánica, en el que una molécula dominante es apoyada por otros derivados de la planta - cannabinoides, terpenos, flavonoides y otras sustancias inactivas, para lograr un efecto farmacológico máximo. Russo revisa varios estudios, en los que un extracto de planta entera tuvo un efecto superior al cannabinoide purificado (Russo, E. 2015).

**Hipótesis**

Tomando de referencia la evidencia científica existente sobre las propiedades terapéuticas de los cannabinoides y otros compuestos naturales presentes en la planta Cannabis sativa, proponemos que la capacidad neuroprotectora de extractos totales de Cannabis será mayor que la obtenida para cannabinoides aislados. Por esto, nos vimos con la necesidad de explorar sobre sus características químicas, su perfil antioxidante y finalmente su capacidad neuroprotectora. Es aquí donde surge una instancia innovadora, de investigar sobre estos fenómenos terapéuticos a través de extractos de materia prima producida, cultivada y comercializada de forma regular en nuestro país (mediante IRCCA). La búsqueda de tratamientos alternativos de carácter polifarmacológico que orienten a generar conocimiento, donde se evidencie la acción sinérgica de nuestros extractos impidiendo o disminuyendo fenómenos de neurotoxicidad inducidos por un agente neurotóxico. Lo que generará evidencia respecto a propiedades fitoterápicas del cannabis, desde un punto de vista sinérgico entre los diferentes grupos químicos ya mencionados. De este modo podremos contrastar nuestros resultados a partir de extractos ricos en cannabinoides y fenoles totales, con resultados obtenidos con cannabinoides estudiados de forma aislada (Echeverry et al., 2020).

**Objetivos**

Objetivo general:

El objetivo principal del proyecto de investigación es estudiar la capacidad neuroprotectora de extractos de Cannabis en sus variedades Alfa I y Beta I en un modelo de neurotoxicidad en cultivos primario de neuronas. Para esto se realizarán diferentes extractos y se seleccionarán para su evaluación los que presenten mayor capacidad antioxidante, contenido polifenólico y los que tengan mayor presencia de cannabinoides activos (no acídicos).

Las variedades Alfa I y Beta I producidas y comercializadas en Uruguay fueron brindadas por el Instituto de Regulación y Control de Cannabis (IRCCA).

Objetivos específicos:

1) Obtención de extractos de variedades Alfa I y Beta I, utilizando dos métodos de extracción, con y sin etapa de descarboxilación.

2) Determinación de fenoles totales de los extractos

3) Determinación del contenido de Cannabidiol (CBD), Ácido Cannabidiólico (CBDA), y ∆9-Tetrahidrocannabinol (THC) en los extractos con mayor rendimiento.

4) Evaluación de CA de los extractos con mayor rendimiento.

5) Estudio y análisis de la propiedad neuroprotectora en cultivo celular (in vitro) de los extractos con mayor CA y contenido en FT.

**Metodología:**

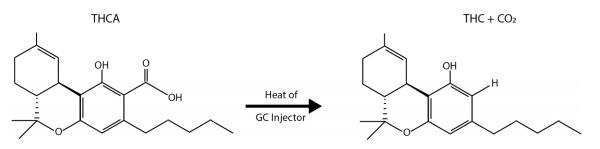
Obtención de extractos de Cannabis, variedad Alfa I y Beta I

Para llevar a cabo los extractos, vamos a morterear nuestros productos (sumidades floridas secas). Tomaremos 0,4 gr de ambas variedades por separado y luego se le añadirán 5 ml de solvente (etanol 95% o 70%).

Las muestras extraídas con EtOH 95% serán maceradas durante 3 minutos y posteriormente filtradas.

Las muestras extraídas con EtOH 70 % serán sonicadas durante 10 minutos y posteriormente filtradas

Luego de esto, se realizará la descarboxilación de todos los extractos mediante la aplicación de calor (80°-90° C durante 90 min).



Proceso de descarboxilación no enzimática de THC (mediante calor).

Al final obtendremos un total de 8 extractos:

-Alfa I 95% etOH

-Beta I 95% etOh

-Alfa I 70% etOH

-Beta I 70% etOH

-Alfa I 95% etOH + Descarboxilación

-Beta I 95% etOh + Descarboxilación

-Alfa I 70% etOH + Descarboxilación

-Beta I 70% etOH + Descarboxilación

Cuantificación de FT

Para determinar la cantidad de polifenoles totales presentes en nuestras muestras, vamos a realizar la técnica de Folin-Ciocalteau. Esta técnica se basa en que al reaccionar los compuestos con grupo fenol con el reactivo Folin-Ciocalteau a pH básico, darán lugar a una coloración azul susceptible a ser determinada por un espectrofotómetro a un rango de 765nm. Para poder determinar el contenido en PT se realiza una curva de calibración tomando como referencia al ácido gálico. A partir de los valores obtenidos de absorbancia de cada concentración de ácido gálico, se lleva a cabo la curva de calibración de referencia para luego extrapolar los datos del contenido de FT de nuestros extractos.

Cuantificación de CBD, CBDA y THC por HPLC-DAD

Para calcular la concentración de CBD, THC y sus respectivas formas acídicas presentes en nuestras muestras, se llevará a cabo un análisis mediante el equipo HPLC-DAD. El extracto de las muestras de cannabis se diluirá adecuadamente en la fase móvil, se microfugará a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se inyectarán en el sistema HPLC. La separación de los constituyentes se logra mediante HPLC de fase inversa utilizando una columna C18 (Kinetex, EE.UU.). Se utiliza una bomba de HPLC binaria (Waters 1525) con un muestreador automático Waters 717 plus y un detector de matriz de fotodiodos Waters 2998 conectado al software de datos cromatográficos Empower 2 (Waters). La temperatura de la columna se ajusta a 30 °C. La fase móvil a utilizar será (A) 89,9% Acetonitrilo, 10% agua, 0,1% ácido fórmico (B) 99,9% agua, 0,1% ácido fórmico. A 1mL/min. El sistema de gradiente consiste en (min/%A): 0/90, 10/60, 12/90 y 30/90. El eluyente se monitorizará mediante detección por matriz de fotodiodos a 210 nm.

Determinación de la CA

Para determinar la CA de nuestras muestras, utilizaremos la técnica de ABTS. Este es un método colorimétrico/espectrofotométrico empleado para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto frente a un radical catiónico ABTS•+. Este radical es producido mediante la reacción de una solución ABTS (7 mM) con persulfato de amonio (140 mM) durante 12-16 hs protegidos de la luz y a temperatura ambiente. Antes de su uso la solución será filtrada y diluida en PBS (5mM) hasta alcanzar una absorbancia de 0.70 0.02 a 734 nm. A 1 mL de esta solución se le agregará 10L de la muestra (a diferentes concentraciones) y se calculará el porcentaje de disminución de la absorbancia a 734 nm. Para cada muestra se determinará la concentración inhibitoria 50 (IC50(µM)).

Determinación de la capacidad neuroprotectora de los extractos en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo

La obtención del cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo se realizará a partir de ratas Wistars de entre 6 y 8 días de edad postnatal, según la metodología descrita por García y Massieu (García O, Massieu L, 2001). Luego de disecados los cerebelos, éstos serán chopeados, incubados en una solución con tripsina al 0,25%, y disgregados mecánicamente en una solución con DNAsa (0,08%) e inhibidor de tripsina (0,52%). Las células serán resuspendidas en medio basal Eagle (BME) suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2mM) y KCl (25mM), y se sembrarán a una densidad de 200.000 céls/well en placas multihoyos de 96 hoyos y 625.000 céls/well en placas multihoyos de 24 hoyos pretratadas con poliornitina (5g/ml). Se cultivarán a 37°C en estufa humidificada (5% CO2) y a las 24 horas post-siembra, los cultivos serán suplementados con glucosa (5mM) y citosina arabinosa (10M) para inhibir la proliferación celular favoreciendo el crecimiento neuronal.

Luego de 7 días de la siembra, a este cultivo se le agregará un agente neurotóxico (Rotenona). Previo a la adición de la injuria, algunos wells serán tratados con nuestros extractos para poder realizar una comparación con las muestras no tratadas (controles). La viabilidad neuronal será evaluada mediante la técnica de viabilidad celular con un compuesto denominado 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) (Denizot y Lang, 1986). Este ensayo colorimétrico evidencia la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, al ser capaz de reducir el MTT formando un formazan de color purpura, indicando la integridad mitocondrial de las neuronas viable. Para esto, incubamos nuestro cultivo celular con MTT durante 45min. a 37° C (0.1 mg/ml de concentración final). Luego, desechamos el contenido de la placa, y adicionamos DMSO. Este compuesto presentará una coloración violácea oscura, en los pocillos donde hayan sobrevivido las células, y una coloración de violácea clara a transparente en los pocillos que no hayan células vivas, la absorbancia específica para su medición en el espectrofotómetro (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific), será de 630nm. El mencionado procedimiento nos dará lugar para evaluar y determinar varios aspectos, por ejemplo: estimar un rango de concentración de nuestros extractos donde no presenten toxicidad, calcular y comparar la injuria producida por los agentes neurotóxicos frente a nuestros compuestos, y de esta forma también, poder comparar la capacidad neuroprotectora.

**Cronograma de actividades**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | MES 1 | MES 2 | MES 3 | MES 4 | MES 5 | MES 6 | MES 7 |
| Objetivo específico 1 | X |  |  |  |  |  |  |
| Objetivo específico 2 |  | X | X | X |  |  |  |
| Objetivo específico 3 |  |  |  | X |  |  |  |
| Objetivo específico 4 |  |  |  | X | X |  |  |
| Objetivo específico 5 |  |  |  |  |  | X | X |

**Bibliografía**

Adams, R., Hunt, M., & Clark, J. H. (1940). Structure of cannabidiol, a product isolated from the marihuana extract of Minnesota wild hemp. I. *Journal of the American chemical society*, *62*(1), 196-200.

Alexi, T., Borlongan, C. V., Faull, R. L., Williams, C. E., Clark, R. G., Gluckman, P. D., & Hughes, P. E. (2000). Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson’s and Huntington’s diseases. *Progress in neurobiology*, *60*(5), 409-470.

Campos, A. C., Fogaça, M. V., Sonego, A. B., & Guimarães, F. S. (2016). Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological research*, *112*, 119-127.

Denizot, F. and Lang, R. (1986) Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability. Journal of Immunological Methods, 8, 271-277.

Devane, W. A., Hanuš, L., Breuer, A., Pertwee, R. G., Stevenson, L. A., Griffin, G., ... & Mechoulam, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, *258*(5090), 1946-1949.

Duran, M., Laporte, J. R., & Capellà, D. (2004). Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide. *Medicina Clínica*, *122*(10), 390-398.

Echeverry, C., Reyes-Parada, M., & Scorza, C. (2021). Constituents of Cannabis sativa. In *Cannabinoids and Sleep* (pp. 1-9).

Erkelens, J. L., & Hazekamp, A. (2014). That which we call Indica, by any other name would smell as sweet. *Cannabinoids*, *9*(1), 9-15.

Fellermeier, M., & Zenk, M. H. (1998). Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS letters*, *427*(2), 283-285.

Fellermeier, M., Eisenreich, W., Bacher, A., & Zenk, M. H. (2001). Biosynthesis of cannabinoids: Incorporation experiments with 13C‐labeled glucoses. *European Journal of Biochemistry*, *268*(6), 1596-1604.

Fraguas, A., Fernández, A., Torres, A. (2014). Cannabinoides: una prometedora herramienta para el desarrollo de nuevas terapias. Real Academia Nacional de Farmacia., 80, pp.555-577.

Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, *86*(8), 1646-1647.

García del Vello Moreno, M. P. (2015). Productos naturales como candidatos a fármacos en enfermedades neurodegenerativas.

García O, Massieu L (2001) Strategies for neuroprotection against Ltrans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro. J Neurosci Res 64:418–428.

Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM. (2015). Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. Nov-Dec;98(6):1503-22.

Grotenhermen, F., Varo, R. N., & Russo, E. (Eds.). (2003). *Cannabis y cannabinoides: farmacología, toxicología y potencial terapéutico*. Castellarte.

Guindon, J.; Hohmann, A. G. (2010). The endocannabinoid system and cáncer: therapeutic implication. Br J Pharmacol 163 (7), 1447-1463.

Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: origins and biosynthesis. *Trends in Plant Science*, *25*(10), 985-1004.

Hampson, A. J., Grimaldi, M., Axelrod, J., & Wink, D. (1998). Cannabidiol and (−) Δ9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(14), 8268-8273.

Happyana, N.; Agnolet, S.; Munte Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. (1998). Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci, 95:8268-73.

Harvey D.J. (1984) Chemistry, metabolism and pharmacokinetics of the cannabinoids. En Nahas G.G. Raven Press. New York, pgs. 37-107.

Hayashi, (2009). Oxidative stress in developmental brain disorders. Neuropathology, 29: 1-8.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1991). Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci. Feb;11(2):563-83.

Iannotti, F. A., Di Marzo, V., & Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in lipid research*, *62*, 107-128.

Katona, I., & Freund, T. F. (2012). Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annual review of neuroscience*, *35*, 529-558.

Kim, E. S., & Mahlberg, P. G. (2003). Secretory vesicle formation in the secretory cavity of glandular trichomes of Cannabis sativa L.(Cannabaceae). *Molecules and Cells*, *15*(3), 387-395.

Lynch, R. C., Vergara, D., Tittes, S., White, K., Schwartz, C. J., Gibbs, M. J., ... & Kane, N. C. (2016). Genomic and chemical diversity in Cannabis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *35*(5-6), 349-363.

Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346:561-564.

McPartland, J. M., & Guy, G. W. (2017). Models of Cannabis taxonomy, cultural bias, and conflicts between scientific and vernacular names. *The botanical review*, *83*(4), 327-381.

Mechoulam R., Ben-Shabat S. (1999). From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. Nat. Prod. Rep. 16 131–143. 10.1039/a703973e.

Mechoulam, R., & Parker, L. A. (2013). The endocannabinoid system and the brain. *Annual review of psychology*, *64*, 21-47.

Mechoulam, R., & Shvo, Y. (1963). Hashish? I. *Tetrahedron*, *19*(12), 2073-2078.

Mestre, L., Correa, F., Arévalo‐Martín, A., Molina‐Holgado, E., Valenti, M., Ortar, G., ... & Guaza, C. (2005). Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *Journal of neurochemistry*, *92*(6), 1327-1339.

Moreira FA, Aguiar DC, Guimaraes FS. (2006). Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 30:1466-71.

Nachnani, R., Raup-Konsavage, W. M., & Vrana, K. E. (2021). The pharmacological case for cannabigerol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *376*(2), 204-212.

Notejane, M., Zunino, C., Rodríguez, A., Speranza, N., Giachetto, G., Bernadá, M., & González, G. (2018). Derivados cannábicos para uso medicinal en niños y adolescentes: aportes para un uso responsable y seguro. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, *89*(3), 187-193.

Pacher, P. Bátkai, S, & Kunos, G. (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. Pharmacological Reviews, 58(3), 389-462.

Palomo Garo, C. (2016). Análisis del sistema endocannabinoide en la enfermedad de Parkinson: hacia un tratamiento polivalente.

Peres, F. F., Lima, A. C., Hallak, J. E., Crippa, J. A., Silva, R. H., & Abílio, V. C. (2018). Cannabidiol as a promising strategy to treat and prevent movement disorders?. *Frontiers in pharmacology*, *9*, 482.

Piomelli, D., & Russo, E. B. (2016). The Cannabis sativa versus Cannabis indica debate: an interview with Ethan Russo, MD. *Cannabis and cannabinoid research*, *1*(1), 44-46.

Proyecto de investigación Fundamental Fondo Clemente Estable - 2020. FCE\_3\_2020\_1\_162440.

Ross, S. A., & ElSohly, M. A. (1996). The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of Cannabis sativa. *Journal of Natural Products*, *59*(1), 49-51.

Russo, E. (2015). Historia del cannabis como medicamento. *Grupo Ars XXL de comunicaciones*, 1-15.

Russo, E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid‐terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, *163*(7), 1344-1364.

Scotter EL, Abood ME, Glass M. (2010). The endocannabinoid system as a target for the treatment of neurodegenerative disease. Br J Pharmacol. 160: 480–498.

Sawler, J., Stout, J. M., Gardner, K. M., Hudson, D., Vidmar, J., Butler, L., ... & Myles, S. (2015). The genetic structure of marijuana and hemp. *PloS one*, *10*(8), e0133292.

Shoyama, Y., Yagi, M., Nishioka, I., & Yamauchi, T. (1975). Biosynthesis of cannabinoid acids. *Phytochemistry*, *14*(10), 2189-2192.

Smith, P. H., Homish, G. G., Leonard, K. E., & Cornelius, J. R. (2012). Intimate partner violence and specific substance use disorders: findings from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Psychology of Addictive Behaviors*, *26*(2), 236.

Solanki, I., Parihar, P., Mansuri, M. L., & Parihar, M. S. (2015). Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. Advances in nutrition, 6(1), 64-72.

Suero-García, Carlos, Martín-Banderas, Lucia, & Holgado, Mª Ángeles. (2015). Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas.

Xiong, W., Cui, T., Cheng, K., Yang, F., Chen, S. R., Willenbring, D., ... & Zhang, L. (2012). Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting α3 glycine receptors. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(6), 1121-1134.

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *International journal of molecular sciences*, *19*(3), 833.