

Informe final publicable de proyecto

Uso medicinal de Cannabinoides: búsqueda de una combinación THC:CBD o THC:CBG que potencie su acción como agentes neuroprotectores y mejore su biodisponibilidad cerebral

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162440

Fecha de cierre de proyecto: 01/11/2023

ECHEVERRY LÓPEZ, Carolina (Responsable Técnico - Científico)

LÓPEZ HILL, María Ximena (Investigador)

MARTÍNEZ BUSI, Marcela Marfa (Investigador)

PRUNELL DOS SANTOS, Giselle Fabiana (Investigador)

SCORZA ARLO, Ma. Cecilia (Investigador)

URBANAVICIUS, Jessika Carolina (Investigador)

MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE"
(Institución Proponente) \\ FUNDACIÓN DE APOYO AL INSTITUTO CLEMENTE ESTABLE

Resumen del proyecto

La planta *Cannabis sativa* L. contiene más de 500 componentes químicos, incluidos los fitocannabinoides. El compuesto psicoactivo delta-9 tetrahidrocannabinol (THC), y los no-psicotomiméticos, cannabidiol (CBD) y cannabigerol (CBG) son los fitocannabinoides más conocidos. Si bien existe evidencia sobre el potencial terapéutico de THC, CBD y CBG, hay datos controversiales sobre el efecto aditivo/sinérgico entre estos compuestos y sobre el efecto sequito del Cannabis, en el que se postula que el consumo de todos los componentes del Cannabis, incluidos los cannabinoides, terpenos y flavonoides, actúan en sinergia.

Dada la falta de terapias disponibles para tratar enfermedades neurodegenerativas, el estudio de la propiedad neuroprotectora de estos cannabinoides ha ganado interés. En este contexto, previamente hemos reportamos la propiedad neuroprotectora de CBD y CBG en modelos de cultivos neuronales frente a estímulos neurotóxicos, de forma independiente de los receptores cannabinoides, diferenciándose del mecanismo propuesto para THC. En este proyecto nos propusimos en primer lugar evaluar el potencial neuroprotector de la combinación de THC:CBD y THC:CBG, usando los modelos celulares mencionados. Dado que los resultados no mostraron un efecto sinérgico entre estos cannabinoides, nos propusimos evaluar el efecto entourage con otros componentes del Cannabis mediante la valoración de 2 extractos de Cannabis de uso médico: uno Full-spectrum, y otro CBD purificado, ambos preparados en el mismo vehículo de formulación (MCT-medium-chain triglyceride). Los resultados mostraron que la propiedad neuroprotectora de estos productos es exclusivamente debida al contenido en CBD y, que el MCT elimina la toxicidad del CBD a las altas concentraciones evaluadas. Finalmente, estamos avanzando en la determinación de la biodisponibilidad cerebral de CBD administrado en MCT de forma intranasal. Nuestros resultados respaldan los beneficios potenciales de extractos farmacéuticos a base de cannabis, donde la pureza y concentración de CBD y la selección del vehículo en su formulación podrían ser cruciales para su eficacia.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Neurociencias (incluye Psicofisiología) / Uso Medicinal del Cannabis

Palabras clave: cannabidiol, cannabigerol, tetrahidrocannabinol, Cannabis / neurodegeneración, neuroprotección / terapias combinadas /

Introducción

Consideraciones generales

Una de las especies botánicas más controversiales por su acción farmacológica es *Cannabis sativa* L. La misma ha sido utilizada durante siglos tanto por sus efectos psicotrópicos como medicinales. Entre los más de 500 compuestos identificados [1, 2], los cannabinoides representan los compuestos más estudiados del cannabis, siendo el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) el componente psicotrópico predominante. En los últimos años, otros cannabinoides como el cannabidiol (CBD) y el cannabigerol (CBG) comenzaron a estudiarse debido a que exhiben varias acciones beneficiosas y carecen de acción psicotrópica [3]. Varios de los avances sobre el potencial terapéutico de fitocannabinoides se conocen gracias a la identificación de los sitios de unión endógenos específicos para THC que permitieron la identificación del sistema endocannabinoide (SeCB) [4]. El mismo está constituido por receptores metabotrópicos CB-1 y CB-2, ligandos endógenos que se sintetizan a demanda y sirven como mensajeros retrógrados y enzimas de degradación.

Neurodegeneración y Neuroprotección - Estrategias terapéuticas

A pesar de los avances en el conocimiento en los cambios fisiopatológicos y moleculares de las diferentes enfermedades neurodegenerativas no existe cura para ninguna de estas [5]. Las terapias existentes, tanto farmacológicas como quirúrgicas, están destinadas a tratar la sintomatología de estas enfermedades [5] y, en general, poseen importantes efectos adversos. Esto hace imprescindible la necesidad de trabajar en el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces. Dada la naturaleza multifactorial de las enfermedades neurodegenerativas, creemos que una combinación de moléculas capaces de actuar simultáneamente sobre varios blancos celulares (acción polifarmacológica) va a tener un mayor potencial neuroprotector en comparación con aquellos fármacos con un solo mecanismo de acción [6].

En este contexto, el Cannabis y sus cannabinoides se han incorporado recientemente al arsenal compuestos con potencial

neuroprotector en investigación, y han evidenciado tener una serie de ventajas sobre los compuestos neuroprotectores clásicos [7, 8]. Los cannabinoides tienen una acción de amplio espectro que afectan a múltiples procesos moleculares al mismo tiempo y ése es posiblemente el principal valor añadido que aportan cuando se los compara con agentes neuroprotectores investigados desde hace ya varios años.

Varios estudios han demostrado que algunos cannabinoides poseen capacidad neuroprotectora [9, 10, 11]. Una ventaja adicional para los fitocannabinoides como neuroprotectores estaría dada por su capacidad de actuar no solamente sobre el SeCB, sino sobre múltiples sitios de acción. THC ha mostrado ser neuroprotector [12, 13] y su efecto ser mediado principalmente por receptor CB1 [14]. Sin embargo, los efectos psicomiméticos de THC limitan su uso como potencial agente terapéutico. CBD también posee propiedades neuroprotectoras [11, 15], y a diferencia del THC, no produce alteraciones psicotrópicas [15]. Es probable que éste perfil refleje su baja propiedad como agonista de CB-R. Por otra parte, su estructura química le confiere potente capacidad antioxidante que podría restaurar el desbalance oxidativo que ocurre en los desórdenes neurodegenerativos.

El CBG, un cannabinoide con baja afinidad por los receptores CB1/CB2, comparte con el CBD su capacidad para activar diferentes blancos fuera del SeCB, y ha sido beneficioso en modelos preclínicos de neurodegeneración [16, 17].

Por otra parte, varios reportes apuntan a un mayor beneficio cuando se usan combinaciones de estos compuestos o combinando todos los componentes de la planta Cannabis (cannabinoides, terpenos y flavonoides), incluyendo una potenciación de su actividad individual, aumentar la ventana terapéutica de dosis y disminuir efectos secundarios. Algunos efectos sinérgicos han sido reportados, como por ejemplo la administración de THC/CBD se está explorando como anticonvulsivante, analgésico y para el tratamiento de gliomas, entre otros [18, 19]. La capacidad de CBD para potenciar las acciones terapéuticas de THC podría permitir reducir la cantidad de THC y, por lo tanto, sus efectos psicoactivos. Además, los tratamientos con productos combinados de THC-CBD tienden a ser más tolerados y efectivos que los compuestos aislados. Ejemplo de esto es el producto Sativex (THC:CBD), que ha llegado al mercado como un recurso novedoso e interesante para neurólogos y pacientes.

A pesar de los beneficios potenciales asociados a los efectos sinérgicos entre los cannabinoides y otros compuestos del Cannabis, hay limitada información sobre el potencial sinérgico en la neuroprotección y no hay estudios que analicen mezclas con diferentes proporciones que puedan mostrar una mejor efectividad. En este contexto, surge como relevante profundizar en el conocimiento de las posibles acciones sinérgicas de estas combinaciones en eventos de neurodegeneración.

Antecedentes particulares

Este proyecto se enmarca dentro de una colaboración que venimos llevando hace unos años entre dos laboratorios del Instituto Clemente Estable con vasta experiencia para alcanzar los objetivos planteados en este proyecto. Desde hace más de 15 años el Departamento de Neuroquímica del IIBCE lleva adelante una línea de investigación cuyo objetivo es identificar compuestos neuroprotectores procedentes de fuentes naturales. En este marco se han validado diferentes metodologías para la evaluación del potencial neuroprotector de productos naturales y sus mecanismos de acción en modelos de muerte neuronal en cultivos celulares y en modelos de hipoxia, isquemia y neurodegeneración in vivo [20-27]. En el 2017, con el advenimiento del tema del Cannabis de uso medicinal a la agenda nacional, hemos comenzado una colaboración con la Dra. Cecilia Scorza del Depto. de Neurofarmacología Experimental del IIBCE para abordar el SeCB como posible blanco terapéutico en algunas patologías del SNC. Dicho departamento posee una larga trayectoria en el estudio de la neurobiología y farmacología de sistemas de neurotransmisión del SNC que son modulados por el SeCB, y en el mecanismo de acción de drogas de abuso [28-33].

De esta colaboración han surgido resultados sumamente interesantes. Hemos demostrado que tanto CBD como CBG poseen acción neuroprotectora en cultivos primarios neuronales frente a dos estímulos neurotóxicos, el peróxido de hidrógeno, oxidante que produce daño oxidativo generalizado y, la rotenona que induce primariamente disfunción mitocondrial a través de la inhibición del complejo I de la cadena mitocondrial [11]. Utilizando estrategias farmacológicas determinamos que el efecto neuroprotector de CBG y de CBD es independiente de CB-1Rs y CB-2Rs y que únicamente el efecto de CBG es parcialmente mediado por la activación del 5-HT_{1A}-R [11]. Teniendo en cuenta reportes que sugieren una acción sinérgica entre los cannabinoides [18, 19] y basados en nuestros datos que mostraban una diferencia en los mecanismos de acción entre CBG y CBD, evaluamos la acción sinérgica entre ellos. Los resultados mostraron que la coadministración de estos cannabinoides no potencia su acción neuroprotectora. Contrario a lo propuesto para CBG y CBD, THC tiene gran afinidad por CB-1Rs y CB-2Rs por lo que es probable que estos receptores medien su acción neuroprotectora [14]. En este sentido, es altamente posible que THC ejerza un efecto neuroprotector sinérgico con CBD o

CBG. Como fue mencionado previamente, cuando se inició este proyecto si bien existían algunas evidencias sobre la combinación THC-CBD y pocas sobre CBG-CBD en algunos modelos experimentales, no había información sobre estos sinergismos en modelos de neuroprotección. Tampoco existían estudios que profundicen en valorar el efecto de diferentes relaciones en las combinaciones. En el presente proyecto se planteó en una primera instancia abordar estos aspectos. Por otro lado, dado el posible efecto sinérgico de los cannabinoides con los otros compuestos del Cannabis y la aparición en el mercado farmacéutico de varias formulaciones de productos a base de cannabis para diferentes usos médicos, en este proyecto también abordamos el estudio comparativo de productos con CBD purificado y productos que tuvieran todos los componentes de la planta.

Encontrar en modelos preclínicos una relación óptima en las diferentes combinaciones que potencien su acción neuroprotectora y/o amplie el rango en dosis de acción es un paso necesario en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. Además, entender sus mecanismos de acción es fundamental para identificar blancos que puedan ser modulados para mejorar sus propiedades neuroprotectoras. Por otra parte, el estudio de la biodisponibilidad cerebral de estos compuestos, podría ser una contribución importante para un futuro diseño y desarrollo de estrategias terapéuticas que empleen estos compuestos para enfermedades neurodegenerativas.

A pesar de sus limitaciones, los estudios *in vitro* utilizando cultivos celulares, son una herramienta de diagnóstico de gran utilidad para evaluar tanto toxicidad y protección celular de compuestos, así como para la elucidación de los mecanismos de acción subyacentes. En este proyecto utilizamos el cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo (NGC) para evaluar el potencial neuroprotector de las combinaciones, modelo ampliamente utilizados para este tipo de estudios. Dada la gran cantidad de evidencias que muestran la estrecha relación del estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial en la etiología y desarrollo de varias patologías neurodegenerativas, seleccionamos la rotenona como inductora del daño neuronal. Utilizando este paradigma experimental evaluamos la capacidad neuroprotectora de THC y diferentes relaciones en la combinación con CBG y CBD y de dos extractos de Cannabis de uso médico: uno Full-spectrum y otro CBD purificado, ambos preparados en el mismo vehículo de formulación (MCT-medium-chain triglyceride). Además, profundizamos en el estudio de los mecanismos de acción implicados. Según los antecedentes planteados, esperábamos que mecanismos dependientes e independientes del SeCB estuvieran implicados en la acción neuroprotectora de las diferentes combinaciones.

Finalmente, en este proyecto propusimos evaluar la biodisponibilidad cerebral de estos compuestos utilizando la técnica de microdiálisis. Esta técnica es utilizada para determinar la presencia y niveles de compuestos neuroactivos en el fluido extracelular del cerebro como medida de la penetración cerebral y presenta varias ventajas en comparación con el muestreo de plasma o tejido, incluyendo la utilización de un menor número de animales para obtener datos confiables.

Dado que el THC tiene propiedades psicoactivas, su uso para actividades de experimentación está restringido. Es importante señalar que a partir de 2019 contamos con la licencia otorgada por el IIRCA para trabajar con este tipo de compuestos.

Metodología/diseño del estudio

Animales

Para los cultivos primarios de cerebelo, se utilizaron ratas Wistar de entre 6 y 8 días de edad postnatal, según la metodología descrita por García y Massieu [34]. Para los experimentos de biodisponibilidad cerebral, se utilizaron ratas machos Wistar adultos (250-300 gr) criados en el Bioterio del IIBCE en condiciones de luz-oscuridad 12:12, comida y agua *ad-libitum*. Todos los protocolos experimentales han sido aprobados por el Comité de Ética para el Uso de Animales del IIBCE, (CEUA-IIBCE)

Compuestos cannabinoides

Los compuestos CBG, CBD y THC fueron aislados, purificados y donados por Phytoplant Research, Córdoba, España (<http://www.phytoplant.es/es>).

Productos farmacéuticos a base de cannabis

EPIFRACATAN (un extracto medicinal a base de cannabis que contiene un alto nivel de CBD, terpenoides, flavonoides y niveles traza del CBDA y D9-THC) y XALEX (una formulación de CBD altamente purificada derivada de plantas) fueron donados por RAMM Pharma Corp. (Uruguay). Ambos productos farmacéuticos fueron registrados por Ministerio de Salud Pública de Uruguay. EPIFRACATAN (5%) contiene 50mg/mL de CBD, <2mg/mL de THCA, y otros compuestos no determinados de *C. sativa* (como terpenos y flavonoides). XALEX (10%) contiene 100 mg/mL de CBD. Ambos productos se preparan en el mismo vehículo de formulación que es un aceite de triglicéridos de cadena media (MCT), una fuente de lípidos comúnmente utilizada para preparar medicamentos. También el aceite MCT fue donado por RAMM Pharma Corp.

La pureza y cuantificación de CBD de los 2 productos comerciales fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD), en la Plataforma Analítica del IIBCE. La separación de los constituyentes de ambos productos farmacéuticos se logró mediante HPLC fase inversa usando una columna C18 (Kinetex) con tamaño de partícula de 5 µm. Una bomba HPLC binaria (Waters1525) con un muestreador automático Waters 717 plus y un fotodiodo detector de matriz (DAD) Waters 2998 vinculado a Software de datos de cromatografía Empower 2 (Waters). La temperatura de la columna se fijó a 30 °C. La fase móvil utilizada fue (A) acetonitrilo al 89,9%, 10% agua, 0,1% ácido fórmico, (B) 99,9% agua, 0,1% de ácido fórmico. A 1 ml/min el sistema de gradiente consistió en (min/%A): 0/90, 10/60, 12/90 y 30/90. El eluyente se controló mediante detección de matriz de fotodiodos a una longitud de onda de 210 nm, específica para determinar cannabinoides

1-Modelos celulares in vitro para evaluar neuroprotección

Cultivos celulares de neuronas granulares de cerebelo (NGC)

El cultivo de NGC es uno de los modelos neuronales in vitro más utilizado para el estudio de la neurobiología funcional y patológica de diversas enfermedades neurodegenerativas, dada la facilidad de la obtención de estos cultivos, la relativa homogeneidad y su elevada reproducibilidad. El fenotipo celular de las NGC es glutamatérgico y es relevante mencionar que estas células presentan una alta densidad CB1-Rs [35]. Datos preliminares realizados por nosotros, sugieren que NGC expresan también receptores CB2 (datos no publicados).

Luego de disecados los cerebelos, fueron chopeados e incubados en una solución con tripsina al 0,25%, y disgregados mecánicamente en una solución con DNAsa (0,08%) e inhibidor de tripsina (0,04%). Las células fueron resuspendidas en medio basal Eagle (BME) suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2mM) y KCl (25mM), y sembradas a una densidad de 200.000 céls/pocillo en placas de 96 pocillos y 625.000 céls/pocillo en placas de 24 pocillos pretratadas con poliornitina (5?g/ml). Se cultivaron a 37°C en estufa humidificada (5% CO₂) y a las 24 hs post- siembra, los cultivos fueron suplementados con glucosa (5mM) y citosina arabinosa (10?M) para inhibir la proliferación celular favoreciendo el crecimiento neuronal.

1.1-Paradigma experimental para evaluar la capacidad neuroprotectora de THC y sus combinaciones con CBD y CBG

Dado que ya contábamos con resultados obtenidos de las concentraciones efectivas de CBD y CBG, en primer lugar, se evaluó la neurotoxicidad y neuroprotección de THC solo. Los cultivos primarios de NGC fueron pretratados durante 1 hora con diferentes concentraciones de THC (0 a 20 µM) y posteriormente fueron sometidas a 40nM de rotenona durante 24 horas. Para la evaluación de las diferentes combinaciones (THC: CBD o THC:CBG) se usó el mismo tiempo de pre-tratamiento mencionado. Se evaluaron las siguientes relaciones THC = CBD (o CBG); THC(2):CBD(1) (o CBG) y THC(1):CBD(1), (o CBG). La concentración de rotenona seleccionada, es la concentración que provoca la muerte de aproximadamente el 50 % de las células en este modelo.

1.2. Análisis de la participación de los receptores CB1 y CB2 en la acción neuroprotectora de THC

Se utilizaron antagonistas selectivos de CB1-R (AM-251) y CB2-R (AM-630). Los mismos fueron incubados en cada cultivo previo al agregado de THC a diferentes concentraciones y posteriormente fueron sometidas a 40nM de rotenona durante 24 horas.

1.3. Paradigma experimental para evaluar la capacidad neuroprotectora de EPIFRACTAN y XALEX

Los cultivos primarios de NGC fueron pre-tratados durante 1 hora con diferentes concentraciones de EPIFRACTAN o XALEX (0 a 20 µM de CBD) y posteriormente fueron sometidos al estímulo neurotóxico (40 nM rotenona) durante 24hs.

-Sobrevida celular

La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT) [36]. El mismo se fundamenta en la reducción del MTT por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en una sal de formazán de color azul. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de sal de formazán formada. Brevemente, luego de los tratamientos experimentales, las células fueron incubadas con MTT (0.1 mg/mL) por 90 min a 37°C. Luego, los cristales de formazán formados fueron disueltos con DMSO, y la absorbancia fue medida a 630 nm y 570 nm utilizando un lector con un lector multimodo de barrido espectral (Varioskan Flash, Thermo Scientific). Los resultados fueron expresados como porcentaje de reducción del MTT, asumiendo la absorbancia de las células controles como 100%. La viabilidad celular fue también examinada morfológicamente por microscopia de contraste de fase.

-Evaluación de los cambios morfológicos de los cultivos (evaluación de neuritas y astrocitos) por Inmunofluorescencia
Las células se fijaron en cubreobjetos con paraformaldehído al 4% a 37 °C durante 20 min. Después de tres lavados con solución salina (PBS; pH 7,5), las células se permeabilizaron con Triton X-100 0,1% (v/v) en PBS durante 30min y bloquearon con albúmina sérica bovina 5% durante 1 h, seguido de incubación durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios anti-Tyr-tubulina (ratón 1/1000; Clonar TUB-1A2; Sigma-Aldrich, cat. T9028) y proteína ácida fibrilar antiglial (anti-GFAP; conejo 1/ 1000; Sigma-Aldrich, cat. n° G9269). Después de eso, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (1/1000; Invitrogen A32723) e IgG anti-conejo de cabra conjugada con Alexa Fluor 568 (1/1000; Invitrogen A11011). Finalmente, se realizaron tres lavados y se administró Hoechst 33258 (1 ng/mL) para visualizar núcleos.

Los cultivos inmunomarcados se observaron con un confocal. microscopio (LSM ZEISS 800) y las imágenes se capturaron con el software ZEN Blue 2.3. En cada imagen resultante, el área ocupada por neuritas, astrocitos y el nivel de intensidad de fluorescencia. de la tinción de GFAP se determinaron utilizando FIJI ImageJ software.

2. Biodisponibilidad de CBD a nivel cerebral

2.1. Mediante técnica de Microdialisis (técnica propuesta en el proyecto original)

Calibración de sondas de microdialisis.

La medida de "recovery" de la cánula de diálisis in vivo se determinó utilizando el método de retro-diálisis [37]. Consiste en un método de calibración más común. Una solución de CBD, disuelta en líquido cefalorraquídeo, de concentración conocida (0.5, 5 y 10 microg/ml, respectivamente), fue perfundida a diferentes flujos 0.5, 1 y 2 microl/min, mediante una bomba de microinyección. También fue variado el tiempo de colecta de las muestras con el fin de determinar el volumen de colecta óptimo.

La cuantificación de CBD fue mediante HPLC/DAD, técnica ya descrita previamente.

2.2. Cuantificación de CBD y sus metabolitos en muestras de plasma y de tejido de diferentes regiones cerebrales (técnica alternativa ya que por la baja recuperación de CBD por la cánula no se pudo utilizar la técnica de microdialisis)

Ratas adultas (n = 5, para cada grupo) fueron administradas de forma intranasal con CBD (10mg) en MCT(30 ul) o en PBS-tween (30 ul). Luego de 30, 60 y 90 min de la administración intranasal los animales fueron sacrificados y se obtuvieron muestras plasmáticas y de diferentes regiones cerebrales (corteza frontal, bulbo olfatorio, cuerpo estriado y cerebelo). Las muestras fueron congeladas a -80 hasta su posterior análisis por HPLC/DAD-MS.

La separación cromatográfica se llevó a cabo con un UHPLC/DAD-MS Thermo Ultimate 3000, utilizando una columna Kinetex 2,6 µm; C18; 100 Å; 100*2.1 mm con pre columna. Utilizando modo isocrático, agua (0,1% ácido fórmico): acetonitrilo (0.1% ácido fórmico) (30:70) a un flujo de 0.3 mL/min por 10 minutos. La temperatura del horno de columna se fijó a 45°C, mientras que la temperatura del inyector automático se mantuvo en 4°C. El volumen de inyección es de 70 µL. El detector de masas ISQ-EC Thermo equipado con una fuente de ionización de electrospray seteadada en modo de ionización positivo para la detección de CBD, THC (estándar interno) y los metabolitos de CBD 7-COOH CBD y 7-OH CBD. Para lo cual se monitorean los iones 315, 300, 330, 193, 259, 343 con una energía de colisión de 40 eV. Se utiliza nitrógeno como gas de colisión para el análisis cuantitativo. La temperatura del vaporizador fue seteadada a 350°C, la del ion transfer a 300°C, la fuente de iones positivos a 3000 V, la presión del gas auxiliar a 5.7 psig, la presión de gas envolvente 49.9 psig y la presión del gas de barrido 0.5 psig. El detector de arreglo de Diodos Ultimate 3000 Thermo fue seteadado para registrar en el rango de longitudes de onda de 190 a 300 nm, fijando canales extraídos a 210, 254 y 280 nm. El procesamiento de las muestras tanto de tejido como de plasma se realizó de acuerdo a [38], con modificaciones. Brevemente Se colocan 150 µL de plasma o 400 mg de tejido en un eppendorf, se agregan 15 µL de THC 0.004 mM (estándar interno). A esta mezcla se le agregan 600 µL de ACN frío y se vortexea 1 min. Luego se agregan 600 µL de H2O mili Q (tener en cuenta que la proporción final ACN: H2O sea 50:50) y se vuelve a vortexear 1 min. En el caso de los tejidos se sonica (amplitud 40% por 30 seg y 30 seg descanso x 5 pulsos). Se deja la mezcla de plasma o el homogenato, según el caso en agitador orbital 1 hora a 4°C. Se centrifuga a 1160 g, 10°C por 15 min en el caso de muestras de tejido. Luego de esto se agregan 3 mL de n-hexano, se vortexea por 5 min, se deja en reposo para que se separen las fases, se colecta la fase orgánica. La misma se seca en speedvac y se resuspende en 150 µL de ACN:agua (60:40).

Análisis de los datos

Todos los experimentos fueron realizados al menos 3 veces de forma independiente. Los resultados, fueron procesados

utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) para la obtención de estadística descriptiva a los efectos de calcular el promedio y error estándar de cada variable. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías entre los grupos y se determinaron diferencias entre los diversos grupos por test de comparaciones múltiples de Tukey o Newman-Keuls. Las diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas significativas.

Resultados, análisis y discusión

1- Evaluación de la neurotoxicidad y neuroprotección de THC en cultivos primarios de NGC frente a rotenona

Para evaluar la neurotoxicidad de THC en los cultivos primarios de NGC, a los 7 días in vitro los cultivos fueron tratados con diferentes concentraciones de THC (0 a 20 μM) durante 24hs. La viabilidad celular fue cuantificada por el método colorimétrico del MTT. Los resultados mostraron que a partir de 15 μM de THC hay una disminución significativa en la viabilidad neuronal.

Posteriormente fue evaluada la capacidad neuroprotectora de THC frente a rotenona como agente neurotóxico. Para esto los cultivos fueron pretratados durante 1h con diferentes concentraciones de THC y posteriormente expuestas a rotenona 40nM durante 24h. THC resultó ser neuroprotector a concentraciones de 2.5, 5 y 10 μM .

Si comparamos estos resultados con nuestro trabajo previo en el cual evaluamos la capacidad neuroprotectora de CBD y CBG frente a rotenona [11], observamos que las concentraciones protectoras de estos 3 cannabinoides están dentro del mismo rango.

En el mismo paradigma experimental fueron evaluadas diferentes combinaciones CBD:THC (2,5 μM CBD: 2,5 μM THC); (5 μM CBD: 5 μM THC); (2,5 μM CBD: 5 μM THC); (5 μM CBD: 2,5 μM THC); y CBG:THC (2,5 μM CBD: 2,5 μM THC); (5 μM CBG: 5 μM THC); (2,5 μM CBG: 5 μM THC); (5 μM CBGe: 2,5 μM THC) . Los resultados mostraron que ninguna de las combinaciones evaluadas muestra un efecto sinérgico o aditivo comparado con los cannabinoides individuales. Si bien CBD, CBG y THC presentan actividad neuroprotectora, con estos resultados podemos concluir que en cultivos de NGC frente a la rotenona, no hay efecto sinérgico/aditivo de estos tres cannabinoides.

Estos resultados fueron mostrados en forma de poster virtual "Evaluation of the neuroprotective capacity of isolated and combined cannabinoids (CBD, CBG, and THC) in experimental in vitro models of mitochondrial dysfunction", en congreso FALAN, Belem, Brasil, setiembre 2022

1.2. Análisis de la participación de los receptores CB1 y CB2 en la acción neuroprotectora de THC

Antagonistas específicos de los receptores canónicos del SeCB CB1 y CB2 (AM 251 y AM 630, respectivamente) fueron utilizados para evaluar la implicancia de estos receptores en el efecto neuroprotector de THC. Los resultados mostraron que la coincubación de THC con AM251 o AM630 no modifica la capacidad neuroprotectora de THC frente a rotenona. Por lo que en este paradigma experimental la neuroprotección de THC, al igual que CBD y CBG, es independiente de los receptores CB1 y CB2. Estos resultados podrían estar indicando que tanto CBD, CBG y THC comparten mecanismos similares y que por eso sus combinaciones en este paradigma no muestran sinergismo. Esto contradicen nuestra hipótesis, la cual basada en la literatura que muestra agonismo parcial de THC por CB1 y CB2, esperábamos a un efecto sinérgico entre CBD:THC y CBG:THC actuando por diferentes mecanismos.

1.3-Evaluación de la neurotoxicidad y neuroprotección de EPIFRACTAN y XALEX en cultivos primarios NGC frente a rotenonacapacidad neuroprotectora

Con el fin de seguir avanzando en el estudio del efecto sinérgico de combinaciones con otros compuestos presentes en la planta Cannabis (efecto sequito "entourage"), evaluamos la capacidad neuroprotectora de 2 extractos de Cannabis de uso médico: uno Full-spectrum de origen farmacéutico (Epifractán-EPI), y otro CBD purificado (Xalex-XAL), ambos preparados en el mismo vehículo de formulación (MCT- del inglés medium-chain triglyceride).

En primer lugar, se realizó un perfil cromatográfico para comparar el contenido químico de EPI y XAL, tomando el CBD como muestra de referencia. El análisis mediante HPLC-DAD reveló que el CBD es el componente principal presente en EPI, pero se detectaron otros compuestos como CBDA y D9-THC en una proporción muy baja en comparación con el CBD (no cuantificados). Como era de esperar, en XAL, el CBD fue el único compuesto detectado.

Para evaluar la neurotoxicidad per se de estos preparados se realizaron curvas de viabilidad celular en función de diferentes concentraciones de EPI y XAL (estandarizados a iguales concentraciones de CBD) (1.25 a 20 μM equivalentes de CBD) durante 24 horas. Estas fueron comparadas con la curva obtenida con CBD cristal. Los resultados mostraron que EPI y XAL, presentan un patrón de curva similar sin inducir neurotoxicidad por sí mismos a ninguna de las concentraciones evaluadas. En contraste, las concentraciones más altas de CBD cristal (15 y 20 μM) provocaron una reducción significativa en la viabilidad celular en comparación con el grupo de control y con las concentraciones más bajas.

A continuación, caracterizamos el efecto neuroprotector de EPI y XAL en comparación con CBD cristal. Los resultados mostraron que el pretratamiento de una hora con EPI y XAL atenuó significativamente la muerte celular inducida por la rotenona en las concentraciones de 2.5 a 20 μ M. Los perfiles de neuroprotección de EPI y XAL fueron similares.

Sin embargo, se observó una diferencia bastante interesante después de 1 hora de pretratamiento con CBD cristal. Aunque el CBD fue efectivo para prevenir la reducción de la viabilidad celular inducida por la rotenona en el rango de 2.5–10 μ M, se observó una reducción significativa de la viabilidad celular en comparación con el grupo tratado con rotenona en CBD 15 y 20 μ M.

Este perfil indica que EPI y XAL tiene un rango más amplio de dosis activas que el CBD. Como control también se evaluó el efecto del aceite de MCT (el vehículo de EPI y XAL) y el mismo no alteró por sí solo la viabilidad celular y ni atenuó el daño provocado. Estos resultados estarían indicando que el vehículo de formulación (MCT), es clave ya que elimina la toxicidad del CBD a las altas concentraciones evaluadas.

Dado que EPI (extracto full spectrum) y XAL (purificado de CBD) mostraron similar perfil de neuroprotección podemos decir que en este paradigma experimental esta propiedad se debe exclusivamente al contenido de CBD y que no existe efecto "entourage" entre los diferentes compuestos del Cannabis. Este efecto "entourage" se refiere a la idea de que múltiples compuestos pueden actuar en conjunto o de manera sinérgica para producir resultados diferentes. De hecho, Russo y McPartland [39], así como otros autores, propusieron el efecto de entourage en relación con la contribución clínica del CBD, con otros cannabinoides, terpenoides y flavonoides en la farmacéutica y la medicina del Cannabis [40]. Sin embargo, nuestros resultados no respaldaron un posible efecto sinérgico o de entourage. Nuestros hallazgos descartarían a priori la participación de otras sustancias individuales presentes en EPI, resaltando el beneficio de la formulación de aceite de MCT en el efecto neuroprotector de EPI.

El efecto neuroprotector de EPI se abordó aún más con inmunocitoquímica. Después del pretratamiento con EPI y el tratamiento con rotenona, se cuantificó el área de las neuritas de las neuronas cultivadas como indicador del daño neuronal. Además, teniendo en cuenta que si bien los cultivos de NGC están principalmente compuestos por neuronas granulares, existe un porcentaje menor de astrocitos, los cultivos también se inmunomarcaron con la GFAP. GFAP es un marcador de astrocitos maduros, y un aumento en su expresión ocurre en procesos de neuroinflamación o neurodegeneración, entre otros. Los resultados mostraron que en los cultivos de células cerebelosas primarias controles (sin tratamientos), las neuronas granulares extendían sus neuritas en forma de haces, mientras que en los cultivos de células tratados con rotenona se observó una disminución drástica en el área ocupada por las neuritas en comparación con el grupo de control. El tratamiento con EPI no alteró por sí solo el área de las neuritas y atenuó el daño neurítico provocado por la rotenona. Por otro lado, la rotenona no modificó significativamente el área de inmunorreactividad a GFAP (GFAP-IR) ni la intensidad de fluorescencia de GFAP (GFAP-ID) de este marcador astrocítico. Sin embargo, el tratamiento con EPI sí aumentó significativamente el área de GFAP-IR y los niveles de intensidad de fluorescencia de GFAP. En el tratamiento con EPI y rotenona los valores de GFAP-IR y GFAP-ID no se diferencian de los valores de los controles.

En la literatura está reportado que rotenona puede activar las células gliales en cultivos, y provocar cambios fenotípicos que podrían ser tóxicos para las neuronas [41, 42]. Sin embargo, en este paradigma, la rotenona no modificó ningún parámetro de reactividad astrocitaria evaluado.

La rotenona inhibe el complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que aumenta la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Estos eventos conducen a una disminución del ATP y disfunción mitocondrial, lo que finalmente desemboca en la muerte celular apoptótica. Una sensibilidad diferencial entre las neuronas y los astrocitos frente a la rotenona puede explicar nuestros resultados. Es posible que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo inducidos por la rotenona no puedan ser contrarrestado en las neuronas debido a su alto consumo de energía y a menos recursos energéticos en comparación con los astrocitos. Por otro lado, aunque los astrocitos tienen la capacidad de sobrevivir como células glucolíticas. Además, los astrocitos tienen una mayor capacidad de amortiguación contra el ROS que las neuronas. El aumento en los niveles de intensidad de GFAP en los cultivos pretratados con EPI fue un resultado inesperado que podría interpretarse como un efecto contrario a su efecto neuroprotector descrito anteriormente. El aumento en la expresión de GFAP se asocia con alteraciones en la morfología y reactividad de los astrocitos desencadenadas por cualquier alteración en la homeostasis cerebral. Los astrocitos están equipados con varios receptores y cascadas de señalización intracelular para responder rápidamente a los cambios ambientales. Aunque algunas señales pueden mediar efectos perjudiciales, otras pueden desencadenar consecuencias protectoras y adaptativas. Por lo tanto, el fenotipo de un astrocito reactivo no siempre se puede predecir a partir de la expresión de un solo marcador como la GFAP. Se ha informado que la astrogliosis reactiva o la proliferación de astrocitos también pueden ser neuroprotectoras, ya que, en esta condición, las células gliales podrían proporcionar factores que promueven la supervivencia celular contra lesiones graves o insultos degenerativos. Por lo tanto, algunos de estos eventos podrían subyacer al efecto neuroprotector de EPI. Estudios posteriores son necesarios para evaluar este proceso.

Estos resultados fueron recientemente publicados en la revista Cannabis and Cannabinoid Research [43] y en el 11vo Congreso Mundial de Neurociencias, IBRO en setiembre 2023.

2. Biodisponibilidad de CBD a nivel cerebral

Inicialmente la técnica de microdiálisis cerebral fue la metodología propuesta para determinar la biodisponibilidad de CBD a nivel cerebral. Para esto, realizamos la calibración de la cánula calculando el recovery in vitro de CBD modificando diferentes variables como flujo, tiempo de colecta y diferentes tipos de cánulas. En todos los casos el recovery fue menor al 1%, insuficiente para pasar a los estudios in vivo. Esto llevo a tener que seleccionar plasma y tejido cerebral para evaluar la biodisponibilidad del CBD y sus metabolitos mediante HPLC/DAD-MS. Otro cambio introducido fue la vía de administración. Dadas las ventajas que presenta la vía intranasal como el rápido pasaje al sistema nervioso central y la poca invasividad de la manipulación, se decidió cambiar la vía intraperitoneal propuesta en el proyecto por esta otra vía. Todo esto ha producido cambios en el tiempo planificado, dado que se necesitó un mayor número de animales y un mayor procesamiento de las muestras.

Hasta el momento han sido realizados todos los grupos experimentales administrados con CBD en MCT y procesadas las muestras plasmáticas luego de 30, 60 y 90 minutos post administración. Falta analizar las diferentes regiones cerebrales disecadas y realizar los mismos grupos experimentales, pero con CBD en PBS-tween. Las muestras plasmáticas mostraron que el pico máximo se obtiene a los 60 min post administración ($0.62 \pm 0.1 \mu\text{M}$). A los 90 min se encontraron aun concentraciones elevadas de CBD ($0.40 \pm 0.15 \mu\text{M}$).

Conclusiones y recomendaciones

En primer lugar observamos que en el paradigma experimental propuesto no hay efecto sinérgico entre THC:CBD ni entre THC:CBG. Los receptores canónicos del SECB, CB1 y CB2, no estarían participando del efecto neuroprotector de estos tres cannabinoides. Resta por seguir investigando si la razón de no observarse sinergia es porque los 3 cannabinoides comparten el mismo mecanismo de acción.

Además, demostramos que EPI y XAL son neuroprotectores en un amplio rango de concentraciones sin efectos neurotóxicos. Un perfil de acción similar entre EPI y XAL sugiere fuertemente que la propiedad beneficiosa de EPI se debe principalmente a su contenido de CBD, descartando un efecto de sinérgico también entre los diferentes compuestos presentes en la planta Cannabis. Además, aunque EPI disminuyó el daño neuronal y restauró la morfología, se podría plantear un mecanismo de neuroprotección que involucra a los atrociitos. Nuestros resultados resaltan los posibles beneficios de EPI en enfermedades neurodegenerativas que involucran disfunción mitocondrial. Al considerar el uso clínico de extractos farmacéuticos basados en cannabis, la pureza y la concentración de CBD podrían ser factores críticos. Este estudio también demostró que MCT podría representar una buena fuente de lípidos para la formulación de aceites a base de cannabis con fines médicos. Por lo tanto, la selección de una formulación farmacéutica adecuada podría ser crucial para la eficacia del producto en ensayos clínicos. Los resultados finales de biodisponibilidad van a ser cruciales para la determinación de la importancia de los vehículos de formulación de este tipo de productos.

Estos resultados como fue mencionado anteriormente fueron presentados en congresos internacionales y publicados en revista internacional

Este proyecto aportó información básica y de aplicabilidad médica, sobre las propiedades neuroprotectoras de cannabinoides y sus posibles combinaciones. Esto se hizo a través de la difusión de nuestros resultados en diferentes eventos, tales como:

- Conferencia por invitación: "Propiedad neuroprotectora de cannabinoides no psicomiméticos". Curso integral sobre cannabis medicinal organizado por Asociación de Química y Farmacia del Uruguay (AQFU), 3 de junio 2021, por zoom.
- Conferencia por invitación "Uso medicinal de Cannabis: estudio de la capacidad neuroprotectora de sus principales cannabinoides". MicrofoNeo, Departamento de Neonatología, Hospital de Clínicas, 12 de noviembre de 2021, por zoom.
- Conferencia por invitación "Capacidad neuroprotectora de extractos de Cannabis y sus cannabinoides". 8va edición de Expocannabis Uruguay, Latu, 4 de diciembre 2021
- Conferencia por invitación en el Curso de Endocannabinología porganizado por la JND "Neuroproteccion y Cannabinoides", 6 de junio de 2022
- Conferencia por invitación en el Curso ISN-CannaLatan a realizarse en junio 2022 en Madrid, España,
- Conferencia por invitación "Propiedad neuroprotectora de extractos de Cannabis y Cannabinoides: estudios in vitro" en Congreso de Endocannabinología organizado por Cannabis Business Hub EVENT, 12 de agosto 2022.- Conferencia por invitación "Neuroprotección y Cannabinoides" en Congreso Uruguayo de Cannabis Medicinal. II edición, en WTC Torre 4 Sala Tempus, Montevideo, 15 de marzo 2023.
- Parte del panel del evento: "Desafío BioImpacta: Cannabis y Salud" que se realizó en el mercado Ferrando, 18 de abril de

2023.

Además, este proyecto afianzo la colaboración comenzada entre nuestro Departamento y el grupo de investigación del Departamento de Neurofarmacología Experimental del IIBCE y fortaleció la Red CYTED CannaLatan "Desarrollo de cannabinoides para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas" junto a investigadores de España, México, Brasil, Argentina, Bolivia y Uruguay.

Durante el desarrollo del proyecto se contribuyó también a la formación académica de investigadores jóvenes en las disciplinas de la neurociencia, neurofarmacología y neurobiología de las patologías neurodegenerativas. Específicamente fue contratada una becaria durante el primer año (Jimena Faggeti), y en el segundo año otro estudiante (Federico Sturla) comenzó a realizar su tesina de grado, centrado en la biodisponibilidad cerebral de CBD en diferentes vehículos de formulación.

Referencias bibliográficas

1. Mechoulam R. *Science* 168:1159-1166, 1970.
2. El-Sohly MA. et al. *Life Sci.* 78:539-48, 2005.
3. Echeverry C, et al. *Adv Exp Med Biol.* 1297:1-9, 2021.
4. Di Marzo V. et al. *Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids* 53:1-11, 1995.
5. Xiangjun C , Weidong P., *Integr Med Int .*1:223–225, 2014
6. Youdim MB, Buccafusco JJ. *J Neural Transm.* 112:519-37, 2005.
7. Fernández-Ruiz J et al. *Br J Clin Pharmacol* 75, 323-33, 2013.
8. Velayudhan L. et al. *Curr Pharm Des.*20,2218-30, 2014.
9. Scotter EL. Et al. *Br J Pharmacol.* 160: 480–498, 2010.
10. Hampson AJ. et al. *Proc Natl Acad Sci,* 95:8268-73, 1998.
11. Echeverry C. et al. *Neurotox Res.* 39(2):335-3482021.
12. El-Remessy AB. et al. *Am J Pathol.* 163, 1997?2008, 2003
13. Chen J. et al. *Brain Res Mol Brain Res.* 134, 215-25, 2005.
14. Valdeolivas S. et al. *ACS Chem Neurosci.* 3, 400?406, 2012
15. Maroon J, Bost J. *Surg Neurol Int.* 9,91, 2018.
16. Valdeolivas S. et al. *Neurotherapeutics,*12, 185?199,2015.
17. Díaz-Alonso J. et al. *Sci Rep.* 6:29789, 2016.
18. Russo E, Guy GW. *Med Hypotheses,* 66, 234?246, 2006.
19. Torres S. et al. *Molecular CancerTherapeutics,* 10, 90–103, 2011.
20. Dajas F. et al. *Funct Neurol,* 17, 37– 44, 2002.
21. Dajas F. et al. *Neurotox Res,* 5, 425-32, 2003.
22. Dajas F. et al. Libro: HERBAL MEDICINES FOR HUMAN HEALTH: Development and Evaluation of Plant-Derived Medicines. Editorial: Taylor&Francis, 339-354, 2011.
23. Dajas F. et al. *Curr Med Chem Central Nervous System Agents,*13, 30–35, 2013.
24. Dajas F. et al. *Neurochem Int.* 89, 140-8, 2015.
25. Echeverry C. et al. *Agric Food Chem.* 58, 2111-5, 2010.
26. Echeverry C. et al. *Neurotox Res.* 27, 31-42, 2015.
27. Arredondo F. et al. *FreeRadic Biol Med.* 49, 738-47, 2010.
28. López-Hill X et al. *Behavioural Brain Research,* 221,134-141, 2011.
29. Meikle MN. et al. *Pharmacol Biochem Behav.* 110,216-223, 2013.
30. Prieto JP. et al. *American Journal on Addictions.* 24,475-481, 2015.
31. Prieto JP. et al. *Psychopharmacology,* 233,2879-89,2016.
32. Galvalisi M. et al. *Neurotox Res.* 31, 90-98, 2017.
33. Prieto JP. Et al., 2020 May 15]. *Neurotox Res.,*10.1007, 2020.
34. García O, Massieu L. *J Neurosci Res.* 64418-28, 2001
35. Suárez J. et al. *J Comp Neurol.* 509:400-21, 2008
36. Denizot F, Lang, R. *J Immunol. Methods* 89:271-277, 1986
37. Thiollier T. et al. *Animal Model Exp Med.* 1:314-321, 2018
38. Zgair A. et al. *J Pharm Biomed Anal.* 114:145-151, 2015.
39. Russo EB, McPartland JM. *Psychopharmacology (Berl);*165(4):431–434; 2003
40. Russo EB. *Br J Pharmacol* 163(7):1344–1364, 2011.
41. Swarnkar S, et al. *Arch Toxicol;*86(9):1387–1397; 2012
42. Yu YX, et al. *Acta Pharmacol Sin;*37(9):1178–1189; 2016
43. Echeverry C, et al. *Cannabis Cannabinoid Res.*10.1089/can.2022.0289; 2023.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)