2017

EFECTOS DEL CANNABIS SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR Y EL CICLO SUEÑO VIGILIA EN UN MODELO ANIMAL

Laluz, J.
Rios, A.
Salvo, S.
Scasso, J.
Techera, J
Vargas, G.

Orientadores: Bracesco, N. [1]
Mechoso, B. [1]
Falconi , A. [2]
García, C. [3]

[1)]Laboratorio de Radiobiología – Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina

[2)]Laboratorio de Neurobiología del Sueño – Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina

[3)]Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales – Departamento de Química Orgánica – Facultad de Química

Ciclo de Metodología Científica II – 2017 – Grupo 86

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN 2
INTRODUCCIÓN 3
OBJETIVOS 7
MATERIALES Y MÉTODOS 8
RESULTADOS 11
DISCUSIÓN 15
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS 18
BIBILIOGRAFÍA 20
AGRADECIMIENTOS 21
ANEXOS 23

RESUMEN

El cannabis ha sido utilizado a lo largo de la historia por diferentes culturas con fines tanto religiosos como recreacionales y medicinales. La investigación básica en nuestro país en relación a los efectos biológicos de la misma 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 referente a la regulación y el control del cannabis que se logró un marco regulatorio amplio que realmente impulsase la concreción de programas científicos en diferentes áreas de conocimiento.

En presente trabajo se expone la aproximación durante el curso de Metodología Científica II del sexto año de la carrera Doctor en Medicina a la labor realizada por diferentes servicios de la Universidad de la República (UdelaR) que integran el Núcelo Interdisciplinario de Estudios sobre Cannabis (NIEC).

Se presentan ensayos realizados sobre la viabilidad celular tras la exposición a extractos de cannabis y se presentan los resultados obtenidos por integrantes del laboratorio de Neurofisiología 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 sobrevida con concentraciones bajas de canabinoides (1,0μM), mientras cuando las líneas celulares fueron expuestas concentraciones más elevadas (10μM y 100μM), 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.

Palabras clave: cannabis, trabajo interdisciplinario, viabilidad celular, ciclo sueño-vigilia.

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 2727a.C.(1).

El empleo de esta planta dependía de la cosmovisión de la civilización estudiada; enteramente religiosos en ceremonias de guerreros synthios (civiliación 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) y no es sino hasta la década de 1940 que comienzan a realizarse estudios sobre las propiedades farmacológicas de los canabinoides (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. Japonica* (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 canabinoides que presentan. El principal canabinoide 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, variando 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 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 canabinoides y, de hecho, es un receptor presináptico cuya función principal es la modulación de la liberación de diversos neurotransmisores. El receptor CB2 se encuentra a nivel de células tipo 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 endocanabinoides existen los fitocannabinoides y canabinoides sintéticos. Los exocannabinoides son moléculas totalmente diferentes a las anteriores, derivadas casi en su totalidad por la planta de cannabis. 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. Por la distribución de estos receptores tienen diversas

funciones en el sistema nervioso central como la memoria, los procesos cognitivos, la actividad motriz e induce efectos 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 los humanos así como en la mayoría de los mamíferos y aves, se pueden distinguir tres estados conductuales diferentes; la vigilia (W), movimiento oculares no rápidos (NREM) y movimientos oculares rápidos (REM). La polisomnografía (PSG) es la herramienta básica para diferenciar 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.
La vigilia permite una óptima interacción con el ambiente para poder desarrollar comportamientos necesarios para sobrevivir. El registro del EEG de este estado está marcada por la presencia de alta frecuencia y pequeña amplitud de las ondas, lo que confirma la actividad cortical.

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. El sueño REM ocurre periódicamente y está siempre precedido por el sueño NREM. Éste es un estado profundo de sueño que se ve similar al estado de vigilia en el EEG, por lo que también es llamado sueño paradojal. 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 no REM 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 silente excepto por 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 en 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 canabinoides 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.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Contribuir desde un enfoque interdisciplinario al desarrollo del conocimiento del potencial medicinal del cannabis mediante ensayos en cultivos celulares y modelos animales.

Objetivos específicos:

- Tomar contacto con el Laboratorio de Farmacognosia de Facultad de Química a los efectos de interiorizarse en la elaboración de los extractos que serán utilizados.
- Poner a punto y diseñar protocolos con líneas celulares de mamíferos.
- Determinar las concentraciones a utilizar de los extractos de cannabinoides.
- Llevar a cabo ensayos de medición de supervivencia celular en el Laboratorio de Radiobiología.
- Conocer el funcionamiento de los experimentos in vivo en el Laboratorio de Neurofisiología del Sueño.
- Comunicar los resultados obtenidos en los ensayos llevados a cabo en el Laboratorio de Neurofisiología del Sueño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracto de cannabis:

El extracto se realizó mediante la extracción de 0.8529g de cannabis sativa en 20,00mL de etanol. Luego del filtrado se llevó a 25mL se etanol. Mediante cromatografía gaseosa se determinó el contenido de THC y CBD de las muestras. Se utilizaron las muestras con alto contenido de THC.

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 37ºC(15), luego de lo cual se procedió a la siembra en frascos estériles de 25 cm^2.

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 37ºC con 5% de CO_2. Se mantuvieron las células en estufa por 24 horas, controlando que no existiera crecimiento microbiano. Para esto se agregó al medio penicilina y estreptomicina.

Se controló el crecimiento celular mediante observación directa al microscopio óptico invertido.

Conteo:

Pasadas 48 horas de cultivo se contaron las células presentes en cada frasco para el posterior sembrado en las placas de 96 pocillos. El conteo se realizó mediante cámara Neubauer y del total de células de cada frasco se obtuvo el volumen necesario de cada una para obtener una siembra de 10.000 células en cada pocillo.

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 (fig. 1).

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, 10,0 µM y 1,00µM.

El extracto fue realizado en Facultad de Química, por el Laboratorio de Farmacognosia.

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

Figura 1. Diseño de la placa utilizado.

El vehículo utilizado para el mismo fue etanol al 1%.

Todos los pasos hasta el momento fueron realizados bajo condiciones de estricta esterilidad en cámara de flujo laminar vertical.

Tras la exposición al extracto se mantuvieron en estufa a 37ºC con 5% de CO_2 durante 24 horas. 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 -20ºC.

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, en el Laboratorio de Neurofisiología del sueño se utilizaron ratas con implantes cerebrales para realizar un electroencefalograma y electromiograma continuos. Las mediciones se realizaron de a 6 horas, con y sin exposición a la vaporización de las muestras de cannabis. Los resultados se analizaron en el laboratorio según 7 registros (fig. 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.

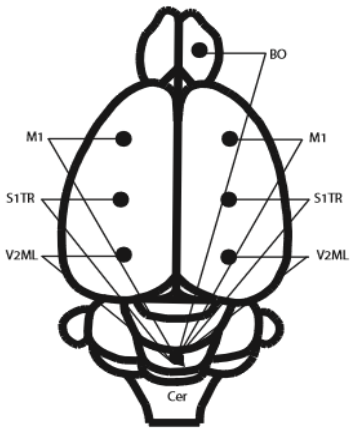

Figura 2. Esquema de los implantes utilizados para obtener los registros del sueño y la vigilia.

Se realizó, además del análisis del sueño, la medida en los efectos sobre la potencia, que analiza las ondas que componen el registro encefalográfico completo. Los animales fueron tratados con 0 mg (sham), 40 mg y 80mg 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 sobrevida. 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.

Tras el estudio de las muestras de cannabis por cromatografía gaseosa se obtuvieron los resultados que se observan en la Figura 3. De las muestras estudiadas por el Laboratorio de Farmacognosia del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química se obtuvo la AS002, de alto contenido en CBD.

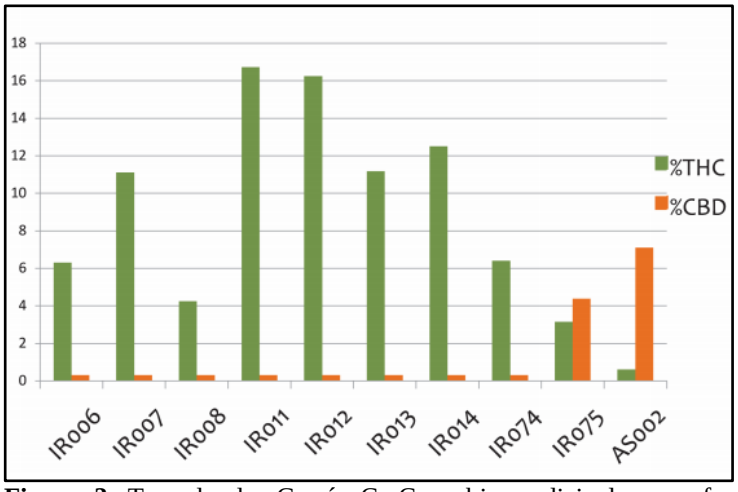

Figura 3. Tomado de: García C. Cannabis medicinal: un enfoque farmacognóstico en un contexto interdisciplinario. :12–22.

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 (fig. 4)

Figura 4. Se observa fotografía de microscopía óptica donde se ve crecimiento de la línea V79.

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.

	100 μM	**10 μM**	**1 μM**	**CONTROL**
V79	0,67	0,69	0,25	1,0
T24	1,0	1,0	0,80	1,0

Tabla 1. Promedios de absorbancia de medidas realizadas por tutor

	100 μM	**10 μM**	**1 μM**	**CONTROL**
V79	1,0	1,0	1,0	1,0
T24	1,0	1,0	0,1	1,0

Tabla 2. Promedios de absorbancias de medidas realizadas por estudiantes

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 trabaja con los porcentajes de supervivencia de cada línea celular (tablas 3 y 4).

	100 μM	10 μM	1 μM
V79	67%	69%	25%
T24	100%	100%	80%

Tabla 3. Porcentaje de sobrevida de la medida realizada por el tutor

	100 μM	10 μM	1 μM
V79	100%	100%	100%
T24	100%	100%	10%

Tabla 4. Porcentajes de sobrevida de medidas realizadas por estudiantes

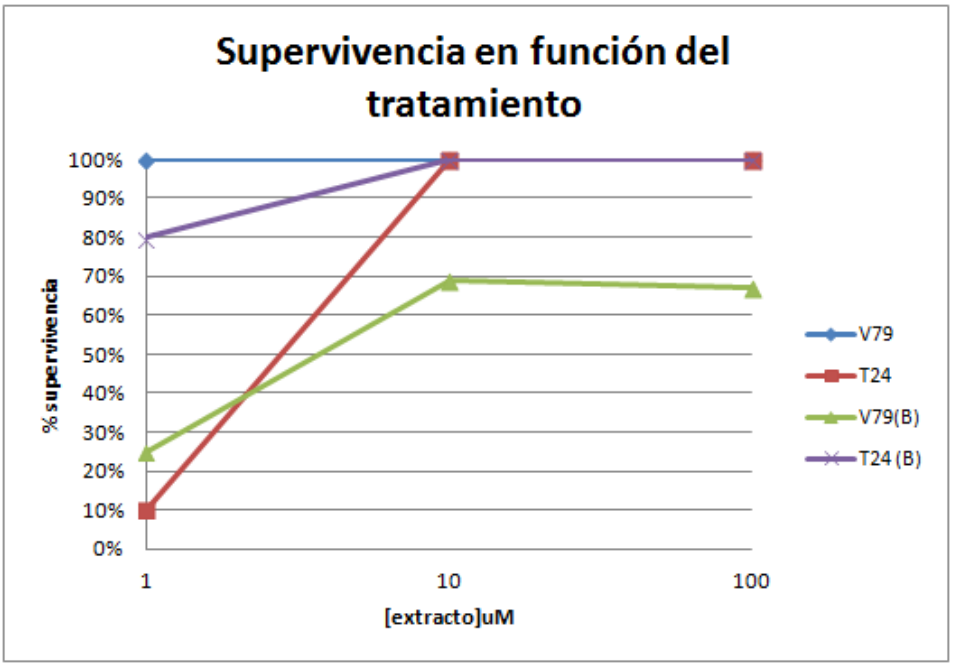

Gráfico 1. Supervivencia en función del tratamiento. La (B) hace referencia a los valores obtenidos por el tutor.

A continuación se presentan los resultados obtenidos por el Laboratorio de Neurofisiología 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 (fig. 5).

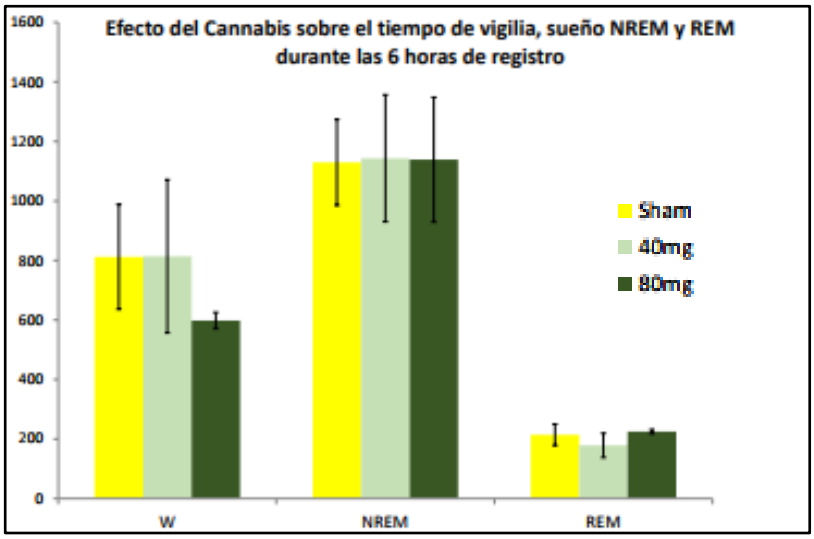

Figura 5. Tomado de: Mondino A. Efecto de la administración aguda de Cannabis mediante vaporización sobre el ciclo sueño-vigilia y la potencia de las bandas de frecuencia del EEG

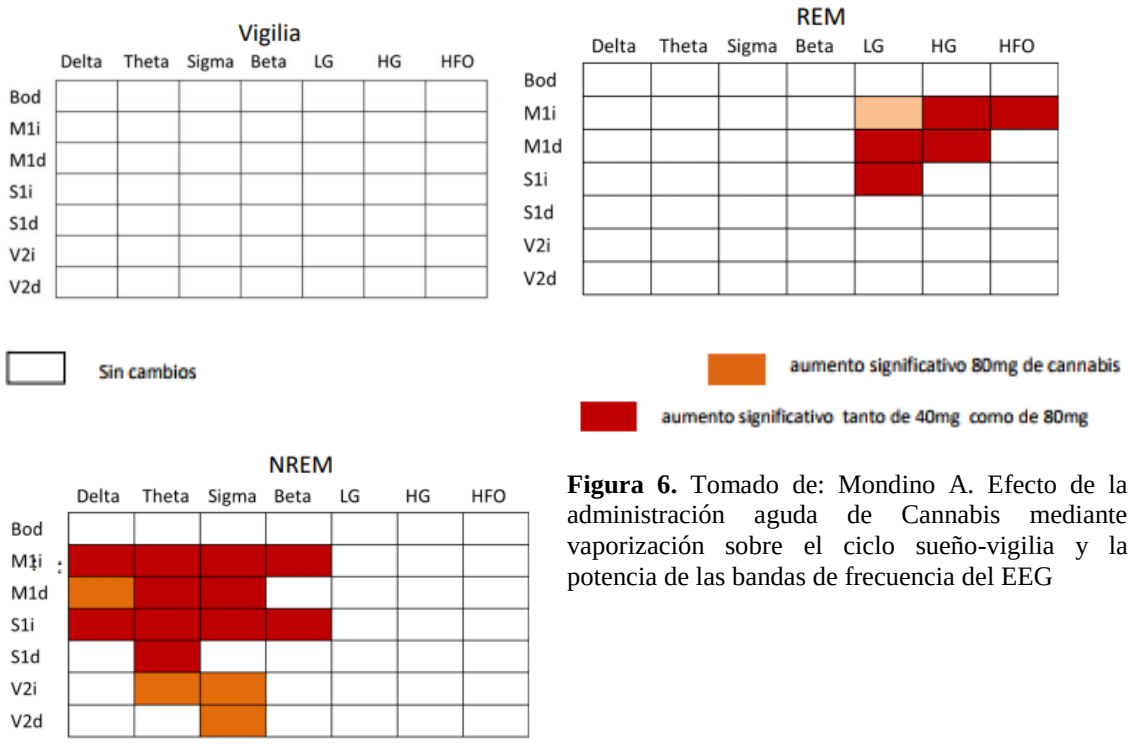

Figura 6. Tomado de: Mondino A. Efecto de la administración aguda de Cannabis mediante vaporización sobre el ciclo sueño-vigilia y la potencia de las bandas de frecuencia del EEG

En la figura 6 se observan los resultados obtenidos en los ensayos realizados en cuanto 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.

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 sobrevida 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 sobrevida 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. 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).

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.

De estas observaciones resulta interesante la propuesta de los diferentes mecanismos que podrían estar implicados en la disminución de la sobrevida frente a la exposición a extractos con menores concentraciones de canabinoides. 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. Apoyando esta hipótesis se encuentran resultados obtenidos por el Laboratorio de Radiobiología realizando ensayos de viabilidad con yerba mate (*ílex paraguariensis*), en los que se observó que a menores concentraciones la rutina presentaba mayor citotoxicidad que a concentraciones más elevadas (17).

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 canabinoides 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, 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 (18), 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. (19)

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 tema 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 canabinoides 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.

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 con la salud humana sino con el bienestar colectivo.

BIBILIOGRAFÍA

1. Garc C, Cairab CS. Carlos García Carnelli. Asoc Química y Farm del Uruguay. 2017;76:12–22.

2. Covarrubias-gómez A. Utilidad de la Cannabis sp. en medicina: Una perspectiva basada en la historia. 2011;34(2):138–40.

3. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology : the first 66 years. Br J Pharmacol. 2006;147:163–71.

4. Sawler J, Stout JM, Gardner KM, Hudson D, Vidmar J, Butler L, et al. The Genetic Structure of Marijuana and Hemp. 2015;(2005):1–9.

5. Canadá H. Information for Health Care Professionals. 2013;

6. Andre CM, Hausman J, Guerriero G. Cannabis sativa : The Plant of the Thousand and One Molecules. 2016;7(February):1–17.

7. Pertwee RG. Handbook of Cannabis. 1st ed. OXFORD; 2014. 115-136 p.

8. 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. 2017.

9. Torterolo P, Monti JM, Pandi-perumal S. Neuroanatomy and neuropharmacology of sleep and wakefulness.

10. República S y cámara de representantes de la. Ley 19.172. Regulación y control del cannabis. 2013. p. 1/24.

11. Weed WIS, Constituents C. THE CANNABIS C OP WHAT IS WEED ? Nature. 2015;525.

12. Sciences NA of. Facilitating Interdisciplinary Research. In 2004. p. 26–39.

13. ATCC. Cricetulus griseus, hamster, Chinese [Internet]. Available from: https://www.atcc.org/Products/All/CCL-93.aspx

14. ATCC. Homo sapiens, human [Internet]. Available from: https://www.atcc.org/products/all/HTB-4.aspx

15. Salgado RC, Yamazaki IAK. Evaluación de la citotoxicidad de la Clindamicina en cultivos de fibroblastos gingivales humanos Evaluation of the cytotoxicity of Clindamycin in cultures of gingival human fibroblasts. 2013;32(3):302–11.

16. Escobar M, Aristizábal G, Fabio A. Redalyc.APLICACIÓN DE UN MÉTODO FLUOROMÉTRICO PARA EVALUAR LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES. 2010;

17. Mechoso b; Blanc L; Bracesco P; Sosa V; Bracesco N. Análisis de la capacidad radioprotectora de la infusión de ilex paraguariensisy sus derivados bioactivos. Congr Nac Biociencias. 2017;

18. Murillo-Rodríguez E. The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry. 2008;32(6):1420–7.

19. Thomas BF, Pollard GT, Sexton M, Thomas BF. Preparation and Distribution of Cannabis and Cannabis-Derived Dosage Formulations for Investigational and Therapeutic Use in the United States. 2016;7(August):1–6.

AGRADECIMIENTOS

A nuestros tutores Nelson Bracesco y Burix Mechoso, sin cuyo aporte y paciencia este trabajo no hubiera podido realizarse.

A Atilio Falconi yAndrea Mondino del Laboratorio de Neurofisiología del Sueño de la Facultad de Medicina, quienes nos aproximaron a todo el trabajo que allí realizan en relación a la temática.

A Carlos García y Santiago Fernández de la 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.

ANEXOS

TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS

Las líneas celulares transformadas se cultivan habitualmente en medio RPMI 5A con 10% de suero fetal bovino (SFB) en estufa con 5% de CO_2. El medio de congelamiento que preserva mejor a esta línea celular es 70% de medio de cultivo, 20% de SFB y 10 de dimetilsulfóxido.

El medio de cultivo a utilizar depende de la línea celular.

Medio completo

RMPI 5A	200 mL
Penicilina (solución 2)	0.4 mL
Estreptomicina (solución 3)	0.4 mL
Glutamina (200 mM)	2.0 mL

El suero fetal bovino generalmente se adiciona al realizar cada técnica de cultivo celular

VOLUMENES FINALES DE MEDIO COMPLETO

(medio + penicillina + estreptomicina + glutamina) + suero fetal bovino

ACONSEJADOS PARA CULTIVO EN DIFERENTES SUSTRATOS:

Sustrato	Volumen (V*)
Caja de Petri Φ 2,5 cm	2,5 mL
Caja de Petri Φ 6,0 cm	5,0 mL
Caja de Petri Φ 10 cm	10,0 mL
Frasco chico 25 cm^2	5,0 mL
Frasco mediano 75 cm^2	15,0 mL
Frasco grande 150 cm^2	25,0 mL

DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS

1) Colocar en un tubo de centrífuga estéril 5 mL de medio de cultivo RPMI 1640 completo.

2) Retirar la ampolla del freezer de -80° C o del reservorio de nitrógeno líquido (en este caso emplear guantes de protección) y colocar inmediatamente en baño maría a 37°C agitando continuamente.

3) Apenas descongelada la ampolla transferir rápidamente su contenido con pipeta Pasteur a un tubo de centrífuga con 4-5 mL de medio completo y resuspender cuidadosamente las células. Se evita de esta manera un contacto excesivo de las células congeladas con el dimetilsulfóxido (DMSO).

4) Centrifugar a 800 rev/min durante 5 min.

5) Verter el sobrenadante y resuspender las células con 5 mL de medio de cultivo completo y pasar a uno a tres frascos chicos (25 cm^2) o uno mediano (75 cm^2) o bien a una caja de Petri de 10 cm (80 cm^2) de acuerdo a la concentración de las células. Completar el volumen final de medio a 5 mL (frasco chico), 15-18 mL (frasco mediano) o 10 mL (caja de Petri). Agregar el volumen correspondiente de suero fetal bovino.

6) Controlar el cultivo a las 12 y 24 horas. Si existen numerosas células muertas puede centrifugarse (800 rev/min, 5 min) y sembrar nuevamente en el mismo frasco (cultivos en suspensión) o cambiar simplemente el medio de cultivo (cultivos en monocapa).

PASAJE DE LÍNEAS CELULARES

Cultivos en monocapa

I: Decolamiento de las células

1) Retirar completamente el medio de cultivo del frasco o caja de Petri y agregar 1/2 V* de PBS a 37° C con el propósito de efectuar un lavado de la monocapa en cultivo.

2) Retirar el PBS y colocar 1/10 V* de tripsina-EDTA (0.05/0.02%)

3) Incubar en estufa a 37° C permitiendo que la solución de tripsina-EDTA actúe durante 5 min, y controlar en el microscopio invertido hasta un completo decolamiento de la células.

4) Neutralizar con medio de cultivo completo sin suero fetal bovino (al menos 1/5 de V*) y resuspender con pipeta Pasteur.

II: Siembra

5) Sembrar las células al 1/2, 1/3, 1/4, etc. de acuerdo la densidad celular que se desee obtener. Completar con el volumen correspondiente de medio completo. Agregar suero fetal bovino en una proporción 1/10 V*, o

6) Si se desea conocer la cantidad de células a sembrar, contar las células previamente mediante cámara cuentaglóbulos de Neubauer (ver técnica) pudiendo emplear azul trypan a fin de determinar la proporción de células muertas (coloración de exclusión). Luego de sembrar las células de acuerdo al resultado del conteo, completar con el volumen correspondiente de medio completo. Agregar suero fetal bovino en una proporción 1/10 V*.

Cultivos en suspensión

1) Resuspender suavemente las células.

2) Sembrar las células al 1/2, 1/3, 1/4, etc. de acuerdo la densidad celular que se desee obtener. Completar con el volumen correspondiente de medio completo. Agregar suero fetal bovino en una proporción 1/10 V*, o

3) Si se desea conocer la cantidad de células a sembrar, contar las células previamente mediante cámara cuentaglóbulos Neubauer (ver técnica) pudiendo emplear azul trypan a fin de determinar la proporción de células muertas (coloración de exclusión). Completar con el volumen correspondiente de medio completo luego de sembrar las células según el resultado del conteo. Agregar suero fetal bovino en una proporción 1/10 V*.

CAMBIO DE MEDIO EN CULTIVOS DE LÍNEAS CELULARES

A) Cultivos en suspensión

1) Para sustituir parcialmente el medio de cultivo sin centrifugar las células proceder de la siguiente manera:

a) Retirar cuidadosamente los frascos en forma vertical de la estufa de cultivo y colocarlos durante arpximadamente 20 min en la cámara de flujo laminar a fin de permitir la sedimentación de las células.

b) Retirar con pipeta de 5 mL (frascos medianos) o de 2 mL (frascos pequeños) el medio de cultivo manteniendo la pipeta en la superficie del líquido. Sustituir como máximo el 50% del medio de cultivo pues se corre el riesgo de perder células.

c) Reponer el volumen eliminado con medio completo a 37°C y adicionar suero fetal bovino (1/10 del volumen retirado de medio de cultivo).

2) Para cambiar completamente el medio de cultivo, el procedimiento es el siguiente:

a) Resuspender con cuidado las células y transferirlas a un tubo de centrífuga estéril.

b) Centrifugar a 800 rev/min durante 5 min y verter el sobrenadante.

c) Resuspender en un volumen semejante de medio fresco y resembrar las células en el mismo frasco de cultivo. Adicionar suero fetal bovino (10%) y colocar el frasco en la estufa en posición vertical.

B) Cultivos en monocapa

1) La sustitución del medio de cultivo en este caso es sencilla y se realiza de la siguiente manera:

a) Eliminar completamente el medio de cultivo evitando tocar con la pipeta la cara celular del frasco o la caja de Petri.

b) Colocar el frasco en posición horizontal o tapar la caja de Petri para evitar que las células se desequen.

c) Reponer el volumen eliminado con medio fresco precalentado a 37°C y añadir suero fetal bovino (1/10 de V*).

CONTEO DE CÉLULAS (Cámara NEUBAUER)

I: Decolamiento de las células

1) Retirar completamente el medio de cultivo del frasco o caja de Petri y agregar 1/2 V* de PBS a 37°C con el propósito de efectuar un lavado de la monocapa en cultivo.

2) Retirar el PBS y colocar 1/10 V* de tripsina-EDTA a 37ºC (0.05/0.02%).

3) Incubar en estufa a 37°C permitiendo que la solución de tripsina-EDTA actúe durante 5 min. Controlar en el microscopio invertido hasta un completo decolamiento de la células.

4) Neutralizar con medio completo (≅1/5 de V*) y resuspender con pipeta Pasteur.

5) Transferir a tubo de centrífuga de 15 mL y centrifugar las células a 800 rev/min durante 5 min.

6) Eliminar completamente el sobrenadante (pellet seco), resuspender cuidadosamente las células golpeando repetidas veces el fondo del tubo y agregar 5 o 10 mL de medio de cultivo completo.

II: Conteo

1) Colocar 0,9 mL de PBS en un tubo de hemólisis y agregar 0,1 mL de la muestra celular.

2) Cargar la cámara Neubauer con pipeta Pasteur.

3) Contar el número total de células en 10 cuadrantes (5 cuadrantes grandes por retícula) y se realiza el siguiente cálculo:

III: Cálculo

1 cuadrado = 1mm x 1mm x 0.1mm = 0.1mm^3 (altura entre retícula y cubreobjeto)
10 cuadrados = 0.1mm^3 x 10 = 1mm^3
1 mm^3 = 10^{-3} cm^3 ó 1 mL

Para conocer la cantidad de células por mL de la muestra:

Multiplicar por 1.000 (de mm^3 a cm^3 o mL) y luego por 10 (dilución en el tubo de hemólisis).

Para saber la población celular total en la muestra:

Multiplicar el Nº de células por mL por el volumen total de la muestra.

EN RESUMEN:

Al total de células contadas (10 cuadrados) se lo multiplica por 10.000 (N° de células por mL) y luego por el volumen de la muestra para saber el N° total de células.

CONGELAMIENTO DE CÉLULAS

(Células en monocapa y suspensión)

I: Medio de congelamiento

1) Preparar el medio de congelamiento y colocarlo a 4ºC (RPMI: 70%, suero fetal bovino: 20% y DMSO: 10%). Calcular 10-15 millones de células y 1-1,5 mL de medio por ampolla.

II: Decolamiento de las células

2) Retirar completamente el medio de cultivo del frasco o caja de Petri y agregar 1/2 V* de PBS a 37° C con el propósito de efectuar un lavado de la monocapa en cultivo.

3) Retirar el PBS y colocar 1/10 V* de tripsina-EDTA a 37ºC (0.05/0.02%).

4) Incubar en estufa a 37°C permitiendo que la solución de tripsina-EDTA actúe durante 5 min, y controlar en el microscopio invertido hasta un completo decolamiento de las células.

5) Neutralizar con medio completo (al menos 1/5 de V*) sin suero fetal bovino y . resuspender con pipeta Pasteur.

6) Centrifugar a 800 rev/min durante 5 minutos.

7) Escribir entretanto en forma indeleble en la ampolla el tipo o línea celular que se congelará, la fecha y las iniciales del técnico y colocarla en hielo.

III: Congelamiento de las células

8) Verter completamente el sobrenadante y agregar rápidamente 1-1,5 mL de medio de congelamiento preparado en el momento y mantenido a 4°C y resuspender las células; pasar inmediatamente el contenido del tubo de centrífuga a la ampolla de congelamiento (sin introducir la pipeta). Cerrar firmemente la ampolla. Es posible sellar la ampolla en este momento con tubuladura Cryoflex para seguridad del operador en el futuro descongelamiento.

9) Congelar durante 90 min en freezer a -20° C.

10) Pasar la(s) ampolla(s) a freezer a -80° C o a un reservorio de nitrógeno líquido.

11) Inscribir los datos y la ubicación de la(s) ampolla(s) en el libro de congelamientos.

NOTA: Para los cultivos en suspensión resuspender cuidadosamente las células e iniciar la técnica de congelamiento en el punto **(6)**.

CULTIVOS EN MICROCARRIERS

1) Decolar las células y contarlas siguiendo el protocolo respectivo.

2) Colocar 2 mL de medio de cultivo completo en un frasco de 25 cm^2.

3) Agregar 50 □L de una suspensión de microcarriers Cytodex 1 (100 mg en 10 mL de PBS pH 7,0 esterilizado por autoclave).

4) Colocar el frasco en posición vertical y dejar sedimentar los microcarriers durante 10 min.

5) Agregar suavemente 4,0 x 10^5 células resuspendidas en 2,5 mL de medio de cultivo en la superficie del líquido. Completar a 5 mL con suero fetal bovino. Colocar el frasco en forma vertical en la estufa a 37ºC y 5% CO_2.

6) Controlar a las 24 horas y observar la adhesión de las células a los microcarriers.

Nota: Los microcarriers Cytodex 1 están constituidos por dextran parcialmente sustituido por grupos cargados positivamente N,N-dietilaminoetil (DEAE) lo que proporciona una superficie óptima para la adhesión y el crecimiento celular. Poseen en promedio 180 micras de diámetro y aportan una superficie de 6.000 cm^2 por gramo de Cytodex 1. El Nº de microcarriers por gramo de Cytodex 1 se estima en 6.8 x 10^6.

ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS

1) Esterilizar las cubetas de electroporación (y tapas de las cubetas) dentro de la cámara de flujo laminar sumergiéndolas en etanol 70% durante 10 min. Secar las cubetas en la cámara de flujo laminar y colocar las tapas. Rotularlas de acuerdo al esquema experimental.

2) Decolar las células (cultivos en monocapa) o centrifugarlas (cultivos en suspensión).

3) Contar las células de acuerdo al protocolo habitual.

4) Resuspender las células a una concentración de 2.5 x10^6 células por mL.

5) Colocar 800 □L de la supensión celular en cada cubeta. Agregar 20 U de la restrictasa *Alu*I en las cubetas tratadas y buffer de *Alu*I en las cubetas control. Colocar 10 min en hielo.

6) Encender el electroporador y setear el voltaje a 400 V y la capacitancia en 25 □F.

7) Secar con cuidado los electrodos de la cubeta y realizar la electroporación anotando en cada caso el voltaje real (Actual Volts) y el tiempo de pulso (Time Constant).

8) Colocar las cubetas 10 min en hielo. Preparar cajas de Petri chicas (Φ 2,5 cm) colocando 2,5 mL de medio de cultivo completo + 0,5 mL de suero fetal bovino y rotularlas de acuerdo al experimento.

9) Pasar el contenido de cada cubeta a tubos de centrífuga de 15 mL conteniendo 5 mL de medio completo. Centrifugar a 800 rev/min durante 5 min. Descartar completamente el sobrenadante. Resupender en 2 mL de medio de cultivo +AB.

10) Sembrar en las cajas de Petri y colocar en estufa a 37ºC y 5% de CO_2. Agregar 50 □L de Colcemid (veneno mitótico que detiene a las células en metafase) a cada caja de Petri 2 horas antes de la recolección de las células. Recolectar las células a las 12 o 18 horas de la resiembra, realizar el choque hipotónico, 3 fijaciones en metanol-acético (3:1) y extendidos cromosómicos. Analizar la fecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por la restrictasa *Alu*I.

Nota: La electroporación produce pequeños porostransitorios en la membrana celular. Este importante aumento de la permeabilidad con caída del potencial de membrana permite el ingreso de macromoléculas como las endonucleasas.

EVALUACION de MUERTE CELULAR (NECROSIS y APOPTOSIS)

1) Protocolo de triple tinción (microscopía de fluorescencia)

Encender microscopio de fluorescencia, preparar porta- y cubreobjetos, tubos de centrífuga (15 mL), papel aluminio y la mezcla de fluorocromos. Para 4 puntos experimentales, se preparan 50 µL de la siguiente manera:

STOCK	Vol (µL)
PI (1 mg/mL)	2,5
Hoechst 33342 (1 mg/mL en agua)	7,5
FDA (1,5 mg/mL en DMSO)	4,0
PBS	36,0

Para cajas de Petri de 2,5 mL:

1) Quitar el medio y guardar en tubo de centrífuga

2) Lavar con 1 mL de PBS y guardar en el mismo tubo

3) Tripsinizar con 250 µL de Tripsina-EDTA (0.05 %/0.02%) durante 5 min

4) Neutralizar con el medio que se había guardado

5) Centrifugar 10 min a 3000 RPM

6) Descartar sobrenadante y "secar" el pellet

7) Resuspender el pellet en 100 µL de PBS

Separar 50 µL para triple tinción y 50 µL para citometría de flujo

Triple tinción

8) A la alícuota de la suspensión celular de 50 µL, agregar 5 µL de mezcla de fluorocromos

9) Incubar en estufa por 6 min a 37º protegido de la luz

10) Sembrar 10 µL/portaobjeto y cubrir con cubreobjetos de 24x24mm

11) Contar bajo microscopio de fluorescencia, en los siguientes 20 min, 200 células/tratamiento

Para citometría de flujo

Se realiza el análisis del contenido de ADN buscando la presencia de un pico sub-G1 que denota la existencia de células apoptóticas de acuerdo al siguiente protocolo:

1) A la alícuota, agregar 50 µL de PBS
2) Agregar vigorosamente 1 mL de etanol Baker ppa al 70% en agua destilada
3) Dejar al menos 30 minutos y hasta varios días (2 semanas) a -20ºC.
4) Centrifugar a 3000 RPM 10 min
5) Descartar el sobrenadante y resuspender en 430 µL de PBS
6) Realizar el ajuste del citómetro de flujo
7) Agregar 50 µL de RNAsa (Stock 1 mg/mL) y 20 µL de IP (Stock 1 mg/mL)
8) Analizar 10.000 células en el citómetro de flujo en un gráfico FL2-A/FL2-SSC-H e histograma FL2-A

Calibración del citómetro

General

Alineación de la columna líquida respecto del haz de luz láser para lograr el enfoque hidrodinámico utilizando CRBC (Chicken Red Blood Cells) en gráficos FSC-H/SSC-H, SSC-H/FL1-H e histogramas FSC-H, SSC-H, FL1-H y FL2-H.

Para contenido de ADN

1) Ajuste de la linearidad con CEN (Chicken Erythrocyte Nuclei) teñidos con IP en un histograma FL2-A para lograr:

a) un índice de ADN entre 1.95 y 2.05. Este índice se obtiene como cociente entre la media de la población de dobletes (M2) y la media de núcleos individuales (M1).

b) un coeficiente de variación (CV) de M1 inferior al 3 %.

2) Discriminación de células únicas vs acúmulos con CTN (Calf Thymocyte Nuclei) en un gráfico FL2-W/FL2-A e histograma FL2-A. En este caso el CV en el pico de células diploides (M1) no debe superar el 5%.

3) Ajuste final con bolillas de 2□ para obtener la máxima discriminación del citómetro (CV<2%)

CRITERIOS DE CONTEO DE TRIPLE TINCION

La triple tinción es una técnica que utiliza 3 fluorocromos:

Fluorocromo	Color	Mecanismo	Indicador de
Ioduro de propidio (IP)	rojo	Intercalante.Tiñe el ADN y el ARN. Sólo atraviesa membranas dañadas.	Ruptura de membrana plasmática
FluoresceínA diacetato (FDA)	Activado: verde	Transformado en sustancia fluorescente por enzima activa en células con membrana íntegra	Integridad de membrana plasmática
Hoechst 33342 supravital	azul	Intercalante de ADN. Estructura nuclear (eu vs heterocromatina)	Morfología nuclear. 1. morfología normal vs. apoptótica 2. presencia de micronúcleos 3. presencia de múltiples núcleos

Por lo tanto, todas las células se observan teñidas de verde o rojo, y con su núcleo además en azul.

1) Sólo se registran células teñidas de 2 colores.

2) Para clasificar las células en vivas, apoptóticas o necróticas:

VIVAS	Célula verde y núcleo azul normal
APOPTOTICAS tempranas	Célula verde y núcleo de tamaño igual o menor al normal, con gránulos heterocromáticos
APOPTOTICAS tardías	Célula roja y núcleo de tamaño igual o menor al normal, con gránulos heterocromáticos
NECROTICAS	Célula roja y núcleo de apariencia normal

Del ciclo celular, se puede distinguir las células mitóticas profásicas y meta-ana-telofásicas (cromosomas condensados)

3) Para clasificar las células según presenten o no daño en el ADN:

Con MICRONUCLEO/S	Presentan al menos un punto azul dentro del citoplasma verde
MULTINUCLEADAS	Son células de mayor diámetro Presentan varios núcleos de tamaño similar entre sí que pueden ser normales o apoptóticos y que se encuentran dentro de un único citoplasma verde o rojo

Al finalizar el conteo, debe ser posible clasificar las células según su estado vital y según el daño que presenten.

TECNICA DE SULFORODAMINA

1 - Se emplean placas de 96 pocillos de fondo plano, se siembran 10.000 células por pocillo en 100 µL demedio.
2 - Los cultivos se mantienen en incubación a 37 ºC y 5% de CO 2 durante 24 horas.
3 - Se preparan las soluciones stock de las muestras a evaluar disueltas en DMSO (o EtOH).
4 - Se preparan las diluciones de trabajo en medio de cultivo fresco, DMSO ≤ 1%.
5 - Se retira el medio de cultivo y se adicionan las muestras.
7- La duración del tratamiento es de 24 o 48 horas con incubación a 37 ºC y 5% de CO 2.
Los siguientes pasos se realizan fuera del flujo laminar:
8 - Una vez tratadas las células, se elimina el medio junto con el producto mediante vuelco (1 vez fuerte).
9 - Se lavan los pocillos dos veces con 200 µL de PBS a temperatura ambiente o una vez si hizo antes latécnica de Resazurina.
10- Fijar las células con 200 µL de 1% ácido acético en metanol frío a cada pocillo. Mover la placa lomenos posible e incubar a -20ºC al menos 3 horas u overnight.
11 – Descartar la solución fijadora y secar en estufa a 37ºC a 1 hora.
12 – Adicionar 100 µL de solución SRB en cada pocillo e incubar 1 hora a 37ºC.
13 – Descartar la solución de SRB y lavar las células rápidamente las placas 3 veces con 200 µL de ácidoacético al 1% en agua MiliQ y se dejan secar durante 1 hora u overnight.
(Nota: la insuficiente remoción de exceso de SRB produce la sobreestimación de la masa celular,mientras que el lavado excesivo conduce al resultado opuesto. Los lavados deben ser realizado lo másrápido posible. Las placas teñidas y secas pueden ser guardadas indefinidamente).
14 - El colorante que permanece en el pocillo se disuelve en 100 µL de Tris-base 10 mM, pH 10.5, seagitan las placas para total disolución en shaker giratorio durante 5 min o sin agitación durante 50 min.
14 - Se realiza la lectura en espectrofotómetro a 510 nm y la medida del background a 620 nm.
Porcentaje de supervivencia= (Absorbancia de células tratadas) x 100
(Absorbancia de células control)

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Para la preparación de cada solución, use agua ultrapura MiliQ para minimizar la contaminación coniones metálicos.

Solución de ácido acético en metanol 1% (v/v). Adicionar 5 mL de ácido acético a 495 mL de metanol.
Homogeneizar la solución y guardar a -20ºC hasta por 1 año.

Solución de ácido acético en agua miliQ 1% (v/v). Mezclar 10 mL de ácido acético con 990 mL deagua miliQ y guardar a temperatura ambiente.

Solución de SRB .0.5% (p/v). Disolver 0.25 g de Sulforodamina (SRB, Sigma Cat. No. S9012) en 500 mLde ácido acético en agua miliQ al 1% y proteger de la luz con papel aluminio. Guardar esta solución a 4ºChasta por un año.

Solución de Tris-base 10 mM pH10.5. Disolver 0.64 g de Tris base en 400 mL de agua miliQ. Ajustar elpH a 10.5 con NaOH 1M y llevar la solución a un volumen de 500 mL con agua miliQ. Guardar estasolución a temperatura ambiente hasta por un año.