



**ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN EN LÍNEAS
CELULARES TUMORALES EXPUESTAS A EXTRACTOS
DE CANNABIS.**

Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina UdelaR, Montevideo Uruguay, 2018

Ciclo de Metodología Científica II – 2018. Grupo 94

Nelson Bracesco, Burix Mechoso, Ramiro García

Facundo Nalerio

Nicolas Gambetta

Tamara Aguilar

Betiana Ojeda

Contenido

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 3 |
| PALABRAS CLAVES..... | 3 |
| INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| OBJETIVOS | 11 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 11 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 11 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| Material Vegetal:..... | 12 |
| Determinación de la actividad antiproliferativo | 12 |
| RESULTADOS | 15 |
| DISCUSIÓN..... | 19 |
| CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA..... | 21 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 22 |

RESUMEN

Dado el aumento del consumo de cannabis y sus derivados con fines terapéuticos y recreativos, es imprescindible el correcto estudio de la totalidad de sus cualidades y efectos. Los cannabinoides han sido utilizados a lo largo de los años como coadyuvante frente a un sinnúmero de patologías, evidenciando grandes resultados como analgésicos, antieméticos y como terapia paliativa, por otra parte, son muchos los estudios realizados donde se ha evaluado la real posibilidad de su uso como terapia antitumoral, presentando resultados controversiales. En la actualidad se ha demostrado que el THC inhibe la proliferación del adenocarcinoma de pulmón *in vitro*, generándose una gran cantidad de datos que versan sobre las características antiproliferativas de los cannabinoides. Teniendo como punto de partida estos estudios, el propósito del presente trabajo se centró en estudiar los efectos de los derivados del cannabis sobre la proliferación celular *in vitro*. Se utilizaron líneas celulares tumorales de carcinoma de útero (HeLa) y vejiga (T24), las cuales fueron expuestas a los diferentes extractos cannábicos, posteriormente se analizó la proliferación utilizando la técnica de incorporación de análogos de la timina, con posterior diferenciación de cromátides hermanas en cromosomas mitóticos. Los resultados fueron analizados mediante el test estadístico χ^2 . Se logró demostrar que los diferentes extractos de cannabis influyeron en el crecimiento en los cultivos, inhibiendo en diferente medida la proliferación celular, no pudiéndose establecer que esto se deba al THC, CBD, o la combinación de ambos.

PALABRAS CLAVES

Cannabis; Usos terapéuticos; Proliferación celular; Biología tumoral.

INTRODUCCIÓN

Las preparaciones de *Cannabis sativa* L. (marihuana) han sido utilizadas por muchos milenios tanto a nivel medicinal, industrial, recreacional como religioso. No obstante, la estructura química de sus componentes activos característicos -los cannabinoides- no fueron elucidados hasta los 1960s (Gaoni et al., 1964)¹. Tres décadas después fueron establecidas las primeras pistas sólidas sobre la acción molecular de los cannabinoides, lo que condujo a una impresionante expansión de la investigación básica de estos y a un renacimiento en el estudio del efecto terapéutico de los mismos en varios campos, incluyendo las bases de la biología tumoral y aunque más tímidamente en la oncología clínica (Śledziński et al., 2018)².

Si bien el uso medicinal del cannabis tiene larga historia apareciendo las primeras referencias en una farmacopea china escrita originalmente en el 2727 a. C. (Wills, 1998)³ no es hasta mediados del siglo XIX y hasta avanzado el siglo XX que se produjo un aumento del consumo del cannabis y derivados con fines terapéuticos, integrando esta droga vegetal las farmacopeas de varios países. A principios del siglo XX fue uno de los medicamentos más recetados, principalmente como tintura para afecciones como el asma y el dolor. Pero un problema serio era su actividad muy variable y resultados inconsistentes, debido a que las preparaciones de *Cannabis sativa* no estaban estandarizadas. Esto sumado a la prohibición de la planta por diversos motivos sociopolíticos, llevó a la desaparición casi total de la *C. sativa* con fines medicinales. Recién en la década del setenta comenzó a retomarse la posibilidad del cannabis como medicina (Flemming et al., 2007)⁴. Desde ese momento, la investigación sobre la marihuana medicinal creció y, tras el descubrimiento de los receptores endocannabinoides específicos, la cantidad de literatura científica se multiplicó, no solo estableciendo nuevas indicaciones potenciales, sino también aclarando los mecanismos de los efectos ya conocidos (García y Cairabú, 2012)⁵. No obstante, todavía hay una falta evidente de información objetiva sobre los cannabinoides, probablemente como consecuencia del retraso de la investigación básica y aplicada sobre estas sustancias comparadas con los principios activos de otras drogas que también presentan dos caras de una misma moneda, es decir, potencial uso recreacional y utilidad terapéutica.

Los cannabinoides son diversos compuestos lipofílicos que interactúan con receptores cannabinoides (CBR) en los mamíferos. Se pueden dividir en tres clases principales: fitocannabinoides, endocannabinoides y cannabinoides sintéticos. Los fitocannabinoides se producen naturalmente en plantas del género *Cannabis*. Más de 60 cannabinoides se identifican en *Cannabis sativa L.*, de las cuales las más abundantes son Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabicromeno (CBC) y cannabigerol (CBG). El THC es el principal componente psicoactivo de la marihuana - producto natural obtenido por secado de flores y hojas de *C. sativa* y *C. indica* (Pertwee, 2008)⁶. El THC tiene un gran impacto en el sistema nervioso central (SNC) mediante unión a los receptores CB tipo 1 (CB1) y exhibe propiedades euforizantes, analgésicas y antieméticas. Otro constituyente importante del cannabis, el cannabidiol (CBD), tiene baja afinidad por los receptores CBs y no muestra características psicoactivas. Sus efectos están mediados por otro tipo de receptor. El segundo grupo principal de cannabinoides incluye ligandos endógenos de receptores CB que son parte del sistema endocannabinoide. Este sistema presente en el cuerpo de los vertebrados está involucrado en la modulación de muchos procesos fisiológicos. Los mejores endocannabinoides caracterizados son anandamida (AEA) y 2-arachidonoylglycerol (2-AG). El tercer grupo está constituido por cannabinoides sintéticos, compuestos que imitan las propiedades naturales de los cannabinoides.

Los cannabinoides afectan a las células principalmente a través de dos receptores clásicos que pertenecen a la superfamilia del receptor acoplado a proteína G (GPCR): CB1 y CB tipo 2 (CB2), que son parte del sistema endocannabinoide, que implica receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos (endocannabinoides) y enzimas dedicadas a la síntesis, transporte y degradación de los cannabinoides. (Hermanson y Marnett, 2011)⁷. La activación de receptores CBs conduce a la inhibición de adenylyl ciclasa, que causa disminución en la producción de la adenosina monofosfato cíclica (cAMP) y, a su vez activación de proteína activada por mitógeno quinasas (MAPK) y fosfoinositida 3-las rutas de quinasa (PI3K) (Bowles et al. 2012)⁸.

Los endocannabinoides actúan como transmisores retrógrados: son sintetizados por células postsinápticas en respuesta a neurotransmisores de unión y se difunden a través de la hendidura sináptica a la membrana presináptica donde se unen a los receptores CBs, lo que a su vez conduce a una disminución en la liberación de neurotransmisores. Es de destacar que los cannabinoides endógenos no se almacenan en vesículas como otros neurotransmisores, derivan del ácido araquidónico de las membranas plasmáticas (Stella et al., 1997)⁹.

Tanto los fitocannabinoides como los cannabinoides sintéticos ejercen una amplia variedad de efectos biológicos imitando sustancias endógenas.

Hasta aquí, dos receptores cannabinoides mayores -CB1 y CB2- han sido clonados y caracterizados en tejidos de mamíferos (Matsuda et al., 1990¹⁰; Munro et al., 1993)¹¹.

La mayoría de los efectos producidos por los cannabinoides en el sistema nervioso y en tejidos no neurales dependen de la activación del receptor CB1. Por el contrario, el receptor CB2 fue inicialmente descripto presente en el sistema inmune (Pertwee, 2010)¹², pero más recientemente se ha mostrado que también existe expresión en células de otros orígenes (Atwood y Mackie, 2010¹³; Fernández-Ruiz et al., 2007)¹⁴. Es de notar que la expresión de los receptores CB1 y CB2 han sido hallados en muchos tipos de células tumorales, las cuales no necesariamente se correlacionan con la expresión de estos receptores en el tipo de tejido de origen (Fernández-Ruiz, 2007¹⁴; Guzmán et al, 2006;¹⁵ Sarfaraz et al, 2008)¹⁶.

Los primeros informes sobre propiedades anti proliferativas del THC proviene de los años 1975 y 1976. Se ha demostrado que el THC inhibe la proliferación del adenocarcinoma de pulmón *in vitro* y crecimiento tumoral en un modelo murino (Munson et al. 1975¹⁷, White et al. 1976)¹⁸. Desde eso tiempo se ha recopilado una gran cantidad de datos refiriéndose a las características anticancerígenas de cannabinoides, tanto *in vitro* como *in vivo* en casos de glioblastoma multiforme, cáncer mama, próstata, tiroides, colon y páncreas o leucemia y linfoma (Pisanti et al. 2009)¹⁹. Incluye acción de endocannabinoides (AEA, 2-AG), fitocannabinoides (THC, CBD) también como cannabinoides sintéticos (JWH-133, WIN 55,2121-2). Muchos estudios tienen demostrado que estos pueden inhibir la proliferación de células cancerígenas, inducir apoptosis / autofagia, inhibir angiogénesis y formación de metástasis (Velasco et al., 2012)²⁰. Los mecanismos de acción de los cannabinoides contra el cáncer son reconocidamente complejos y muchos de sus componentes todavía están esperando para ser completamente elucidados.

La proliferación celular se refiere a un aumento en el número de células debido al crecimiento y la división celular, es necesaria para la función normal de los tejidos, aunque el descontrol de este proceso determina la formación de los diferentes tumores. Desde el desarrollo embriológico hasta la senescencia, la proliferación celular se mantiene mediante una coordinación estricta de señales celulares y la desregulación de la proliferación celular es la característica definitoria de todos los tumores. Los mecanismos de desregulación varían, pero son inevitablemente a través de perturbaciones en la transducción de señales dentro de la célula. Muchas de estas perturbaciones se encuentran en las vías de señalización importantes para la proliferación, las

que regulan señales de crecimiento, diferenciación y desarrollo, y son el resultado de mutaciones, amplificaciones, sobreexpresión de genes o deleciones cromosómicas (Blume-Jensen y Hunter, 2001)²¹. Por lo tanto, la manipulación de las vías de proliferación celular puede disminuir el potencial maligno de los tumores, convirtiendo estas vías en un objetivo atractivo para nuevas terapias. La diferenciación y la proliferación son procesos separados pero concurrentes que están regulados independientemente por vías de señalización, aunque algunas de ellas se superponen y/o se interconectan (Brown G et al., 2003)²².

Hasta la fecha, poco se conoce acerca del rol biológico del sistema endocannabinoide en la fisiopatología del cáncer. Aunque hay muchas excepciones que pueden ser tejido específicas, tanto los receptores cannabinoides como sus ligandos endógenos están en general sobre regulados en tejidos tumorales comparado con tejidos no tumorales (Caffarel et al, 2006²³; Guzmán, 2003²⁴; Malfitano et al, 2011²⁵; Sánchez et al, 2001)²⁶. Además, estudios diferentes han asociado los niveles de expresión de los receptores cannabinoides, endocannabinoides, y/o enzimas metabolizantes de los cannabinoides con la agresividad tumoral (Malfitano et al, 2011²⁵; Nomura et al, 2010²⁷; Thors et al, 2010)²⁸, lo que sugiere que el sistema endocannabinoide puede ser sobreactivado en el cáncer, favoreciendo el crecimiento tumoral (Malfitano et al, 2011)²⁵. En apoyo de esto, en modelos de cáncer en ratones, la ablación genética de los receptores CB1 y CB2 reduce la carcinogénesis de piel inducida por luz ultravioleta (Zheng et al, 2008)²⁹, y la sobreexpresión del receptor CB2 potencia la predisposición a leucemias después de la infección de virus que predisponen a dicha patología (Joosten et al, 2002)³⁰.

Existe evidencia de que los niveles de endocannabinoides y sus receptores aumentan en determinados procesos tumorales, una situación que con frecuencia se correlaciona con la agresividad del tumor (Malfitano et al., 2011)²⁵. Se ha demostrado que anandamida y 2-AG se sobre expresan en varios tipos de tumores, incluyendo glioblastoma multiforme (GBM), meningioma, adenoma hipofisario, carcinoma de próstata y de colon y sarcoma de endometrio (Pisanti et al., 2013)³¹. Además, los niveles de endocannabinoides circulantes se han asociado con aumento de la progresión de la enfermedad en un modelo murino de melanoma metastásico y en muestras humanas de esta patología (Sailer et al., 2014)³². Se ha encontrado que el receptor CB1 está regulado positivamente en células de linfoma de Hodgkin (Benz et al., 2013)³³ y en el hepatocarcinoma celular químicamente inducido (Mukhopadhyay et al., 2015)³⁴. Los niveles del receptor CB1 se incrementan y se correlacionan con gravedad de la enfermedad en los tumores ováricos epiteliales humanos (Messalli et al., 2014)³⁵ y se han propuesto como un

factor de mal pronóstico en neoplasias colorrectales en etapa IV (Jung et al., 2013)³⁶. Con respecto al receptor CB2, se ha demostrado una correlación entre su expresión, grado histológico y pronóstico en tumores de mama (Caffarel et al., 2006)²³ y glioma (Sánchez et al., 2001)²⁶. En este último tipo de tumor, se ha propuesto que se produzca una regulación combinada de los receptores CB1 y CB2 junto con una disminución de los niveles de las enzimas implicadas en la degradación endocannabinoide en comparación con los controles sanos (Wu et al., 2012)³⁷.

Recientemente, se ha descrito un papel para el receptor cannabinoide no canónico GPR55 en el desarrollo de diferentes tumores. Se han notificado grados histológicos más altos de glioblastomas humanos, cáncer de mama, de páncreas y de piel en asociación con una expresión de GPR55 incrementada. Además, el silenciamiento de GPR55 redujo la proliferación de células tumorales en un modelo de ratón heterólogo para glioblastoma (Andradas et al., 2011³⁸; Pérez-Gómez et al., 2013)³⁹. En conjunto, estos datos sugieren que el sistema endocannabinoide puede jugar un papel protumorigénico y de acuerdo con esta hipótesis la ablación genética de los receptores CB1 y CB2 disminuye la carcinogénesis cutánea inducida por luz UV (Zheng et al., 2008)²⁹ y la sobreexpresión del receptor CB2 aumenta la predisposición a la leucemia después de la infección por un virus vinculado a la leucemia (Joosten et al., 2002)³⁰. Además, la ablación genética del receptor CB1 suprime el crecimiento del carcinoma hepatocelular (Mukhopadhyay et al., 2015)³⁴. Sin embargo, diferentes observaciones también respaldan que el sistema endocannabinoide desempeña un papel supresor tumoral en diferentes tipos de cáncer. Por lo tanto, la inactivación genética del receptor CB1 aumenta el crecimiento tumoral intestinal en un modelo genético de ratón con carcinoma de colon (Wang et al., 2008)⁴⁰. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que la monoacilglicerol lipasa (MAGL, la enzima degradadora 2-AG) está altamente expresada en varios tipos de tumores, lo que está asociado con una mayor migración, invasión, supervivencia y crecimiento tumoral (Nomura et al., 2010)²⁷.

Estos datos están en línea con las evidencias acumulativas que demuestran que los cannabinoides (endógenos, fitocannabinoides o sintético) actúan como agentes antitumorales eficientes en una amplia gama de células cancerosas. Por lo tanto, se necesitan más estudios, incluidos los que analicen la activación de los mecanismos de señalización precisos implicados en la regulación de la muerte celular inducida por cannabinoides o la proliferación celular tras la manipulación genética o farmacológica del sistema endocannabinoide, para aclarar cuáles son los factores determinantes para que este sistema actúe como oncogénico o supresor tumoral.

Dado el potencial terapéutico del cannabis frente a la patología tumoral y ante las controversias existentes en la literatura se impone estudiar el efecto antiproliferativo *in vitro* de diferentes extractos de cannabis, sea de productos completos de la planta como de fracciones de sus principales componentes, haciendo ensayos bioguiados que incluyan cannabinoides. Se permitiría así acumular más evidencias que podrían demostrar que diversos cannabinoides y compuestos asociados ejercen efectos antitumorales como en otros modelos experimentales (Armstrong et al., 2015⁴¹; Fowler, 2015⁴²; Pérez de la Ossa et al., 2013⁴³; Torres et al., 2011)⁴⁴.

El problema del cáncer es uno de los desafíos más relevantes de nuestra época. Como consecuencia de la transición demográfico-epidemiológica, el cáncer es actualmente una de las principales causas de muerte en el mundo y en Uruguay. Debido a que la dinámica de esta transición está aun en curso y con diferentes comportamientos alrededor del mundo, el problema del cáncer está cambiando en su escala y perfil. Se estima que el número de casos nuevos anuales pasará de alrededor de 14 millones en 2012 a más de 20 millones en 2030, y que casi dos tercios de esos casos ocurrirán en los países menos desarrollados. Uruguay exhibe en general tasas de incidencia comparables al conjunto de los países desarrollados, pero tasas de mortalidad más elevadas (CHLCC, 2018)⁴⁵. Los países menos desarrollados al no contar con recursos similares a aquellos de los países desarrollados para enfrentar la enfermedad hace que la situación plantee un desafío dramático para gobiernos y autoridades sanitarias. En Uruguay se diagnostican unos 13000 casos nuevos de cáncer en general (exceptuando al cáncer de piel distinto al melanoma), y más de 8000 pacientes mueren por esta enfermedad anualmente (Barrios y Garau, 2017)⁴⁶. Según datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer las tasas estandarizadas por edad de mortalidad por cáncer (todos los sitios reunidos) muestran un descenso sostenido en las últimas décadas.

Uruguay ha aprobado la Ley No 19.172 (2014)⁴⁷, que legaliza diversas vidas reguladas de acceso a cannabis con fines recreativos entre otros, posicionándose como el primer país del mundo en regular de forma íntegra el mercado de cannabis. Esta iniciativa mundialmente novedosa, que se plantea como una alternativa a las políticas prohibicionistas, le atribuye a nuestro país la necesidad de generar nuevos conocimientos en el área que brinden seguridad en la toma de decisiones y en el diseño de políticas públicas eficientes y eficaces, basadas en evidencia científica que tiendan a reducir los riesgos y mitigar los daños del uso frecuente de la

sustancia como también generar nuevo conocimiento científico que pueda aportar en sus potenciales usos medicinales.

Dado el potencial terapéutico del cannabis frente a la patología tumoral y ante las controversias existentes en la literatura se impone estudiar el efecto antiproliferativo *in vitro* de diferentes extractos de cannabis, sea de productos completos de la planta como de fracciones de sus principales componentes, haciendo ensayos bioguiados que incluyan cannabinoides. Se permitiría así acumular más evidencias que podrían demostrar que diversos cannabinoides y compuestos asociados ejercen efectos antitumorales como en otros modelos experimentales (Armstrong et al., 2015⁴¹; Fowler, 2015⁴²; Pérez de la Ossa et al., 2013⁴³; Torres et al., 2011)⁴⁴

Con la aprobación por parte del Parlamento uruguayo de la Ley de Regulación y Control del Mercado de Marihuana, se ha generado un hecho de relevancia nacional y mundial al disponerse de un nuevo marco legal abarcativo e innovador relacionado al consumo, producción y distribución de marihuana. Además, dicho contexto legal facilita la investigación sobre este tópico, permitiendo la creación de conocimiento sobre un tema cuyo abordaje desde las ciencias naturales y exactas ha sido prácticamente nulo en el país.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el potencial antiproliferativo de extractos provenientes de plantas pertenecientes a las variedades cultivadas y comercializadas por el estado uruguayo a nivel *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Utilizar un panel de línea celulares relacionadas a los canceres más frecuentes en el país provenientes de la ATCC (American Type Cell Collection de Estados Unidos, ATCC).
- 2- Realizar ensayos de viabilidad celular (SRB) en las líneas elegidas a los efectos de encontrar las concentraciones óptimas de cannabinoides en extractos completos de las variedades estatales.
- 3- Estudiar en función de los ensayos de viabilidad previos el efecto biológico de las diferentes presentaciones estatales de cannabis, para medir la proliferación celular mediante la técnica de diferenciación de cromátidas hermanas a nivel cromosómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal:

La primera etapa implicó la selección y obtención del material vegetal a estudiar. Como se mencionó, se estudiaron las variedades que están a la venta en farmacias por parte del Estado. Se tomaron en cuenta los análisis preliminares realizados en el laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química con el que conformamos entre otros el Núcleo Interdisciplinario de Estudios sobre Cannabis (NIEC) del Espacio Interdisciplinario de UdelaR.

La maceración dinámica con etanol fue la elegida para esta etapa, debido a la sencillez de la técnica y el bajo costo, poca toxicidad y la relativa compatibilidad de dicho solvente con los bioensayos. Se recibieron los extractos de las inflorescencias de cada uno de los tipos de cannabis que se venden en farmacias ya caracterizados cromatográficamente por los integrantes del laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química. Los extractos obtenidos se valoraron en cuanto a su contenido de cannabinoides para cada situación según protocolo a utilizar, datos también obtenidos como insumos de la labor interdisciplinaria establecida previamente.

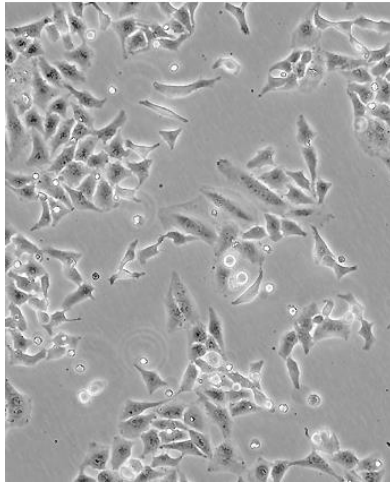
Determinación de la actividad antiproliferativa:

Se estudió la forma más adecuada de agregar los extractivos al medio acuoso donde se desarrollaron las células. Debido a la alta lipofilia de los cannabinoides, se usó tensoactivos para asegurar la dispersión homogénea de los productos en el medio de cultivo.

Para los bioensayos se utilizaron líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos, HeLa (carcinoma de cuello uterino), T24 (Carcinoma de vejiga), obtenidas de la ATCC.

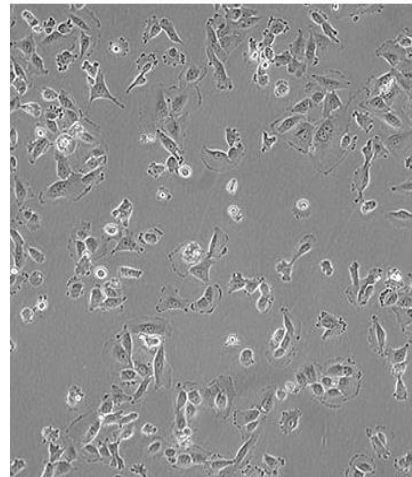
Se cultivaron en medio mínimo esencial y suplemento, 5% de suero fetal bovino, penicilina, 100 UI/mL y estreptomycin, 100 µg/ mL. Se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 85% de humedad relativa (Freshney, 2000).

ATCC Number: **CCL-2**
Designation: **HeLa**



Línea celular tumoral HeLa

ATCC Number: **HTB-4™**
Designation: **T24**

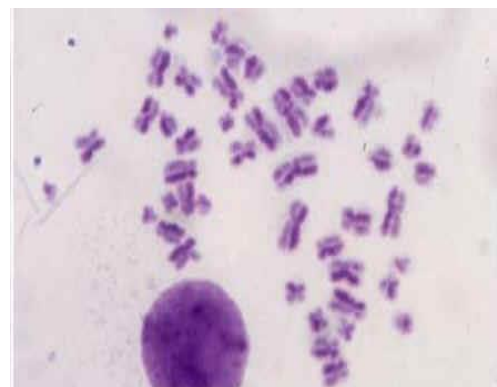


Línea celular tumoral T24

Las células se sembraron en microplaca a una concentración de 2×10^4 células por pocillo y luego del tratamiento con las concentraciones de extractos elegidas durante 24 y 48 horas se determinó la población celular viable mediante el método de tinción con sulforodamina (SRB) leyendo la absorbancia a 532 nm utilizando un lector de microplacas (iMark™ BioRad). Se calcularon los porcentajes de supervivencia celular relativos a las células control de crecimiento y se construyeron curvas de concentración versus porcentaje de supervivencia, completando tres replicas en semanas diferentes. Se consideran valores de densidad óptica de células no tratadas como el 100% de proliferación. En una etapa siguiente y



Célula en M1



Célula en M2

teniendo presentes los resultados previos de viabilidad celular procedimos a realizar ensayos de proliferación con incorporación de BrdU en cultivos que esencialmente son como en el procedimiento previo, salvo con soportes de cultivo de 25cm² de superficie con los protocolos adaptados para tales dimensiones (Fresney, 2000)⁴⁸. Se basan en la técnica de incorporación de análogos de la timina al momento de la replicación del ADN durante el ciclo celular con posterior diferenciación de cromátidas hermanas en cromosomas mitóticos como fue descrito inicialmente por Perry y Wolf (1974)⁴⁹. Se realizan los cultivos celulares con el objetivo de un análisis citogenético cuantitativo que permite estudiar los tiempos de generación celular y calcular el índice mitótico para cada ensayo. Se procede con los cultivos como en una técnica de citogenética convencional (Fresney, 2000)⁴⁸ y se realizaron los conteos en microscopio óptico utilizando lentes de inmersión de 100X. El método ha resultado ser muy eficiente para medir la proliferación celular siendo aún un método de elección en la comunidad científica especializada en el tema como lo demuestran recientes publicaciones utilizando el método tradicional de los años 1970s (Madrigal- Bujaidar et al., 2017⁵⁰) y en concordancia con los lineamientos seguidos desde la agencia EPA de los Estados Unidos (EPA, 1996).

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el test de chi cuadrado para verificar o descartar la influencia de los derivados del cannabis en la proliferación celular, con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

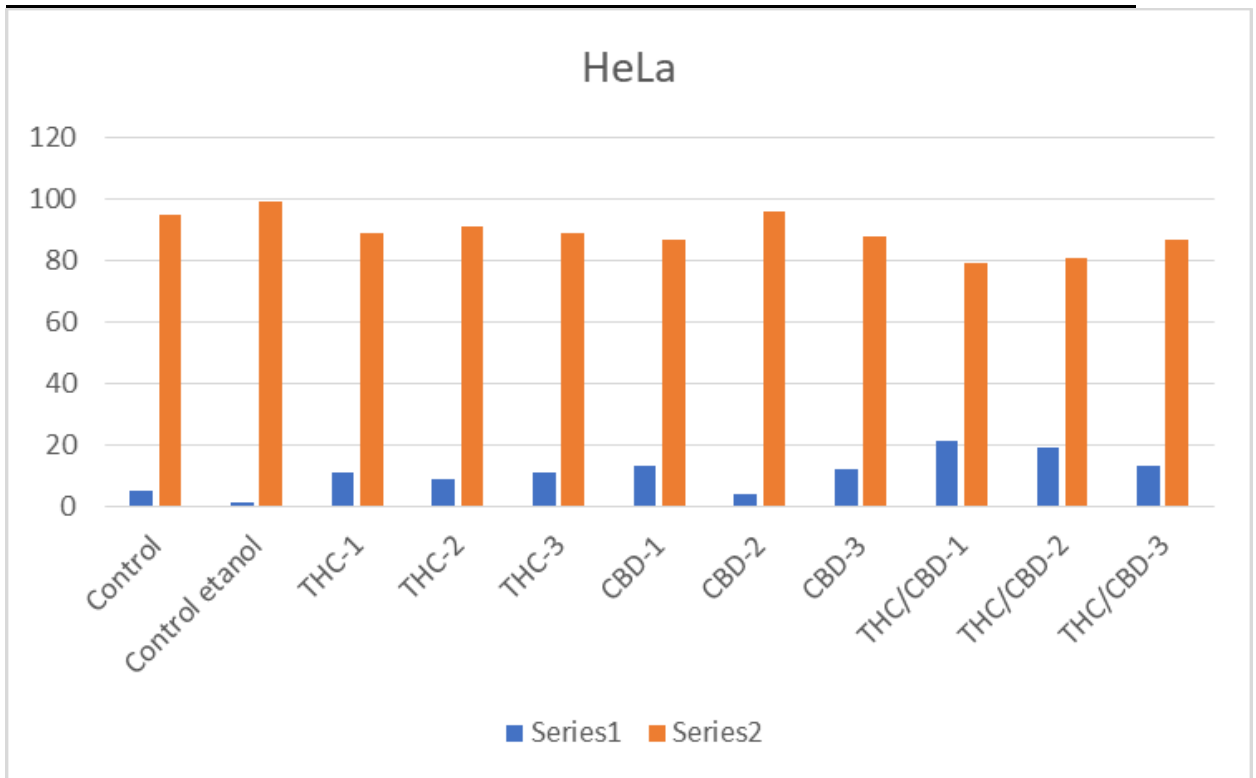
Con el fin de lograr los objetivos planteados, se llevó a cabo en el laboratorio de radiobiología de la Facultad de Medicina, el conteo de células en metafase. Se realizó la cuantificación de las células que se encontraban en la fase M1 y M2 del ciclo celular, para poder de este modo determinar si los derivados de cannabis, a las concentraciones utilizadas, tenían efecto en la proliferación celular.

Para este estudio se utilizaron líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos HeLa (carcinoma de cuello uterino) y T24 (carcinoma de vejiga).

Se realizó análisis citogenético cuantitativo para estudiar los tiempos de generación celular y calcular el índice mitótico para cada ensayo. Se procedió con los cultivos como una técnica de citogenética convencional y se realizaron los conteos con microscopio óptico.

En la totalidad de las líneas celulares expuestas a cannabinoides, no se puede afirmar que haya un efecto claro sobre las fases del ciclo celular, ni que haya un importante efecto antimitótico sobre dichas líneas celulares tumorales.

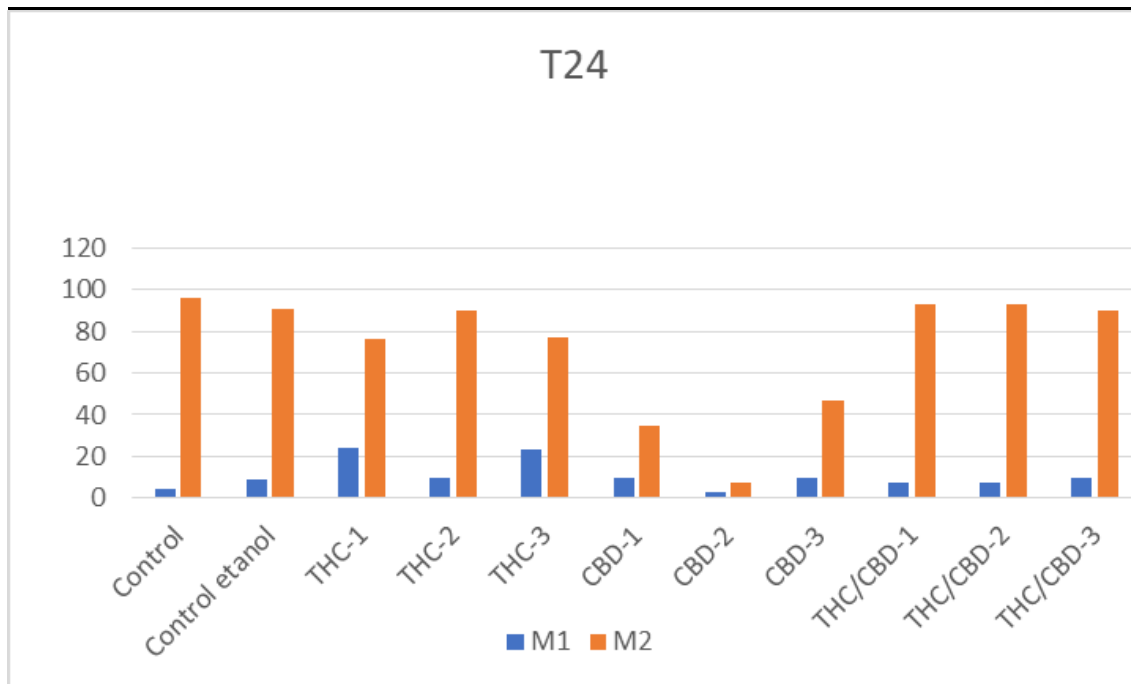
En la línea celular HeLa los resultados muestran que el THC presenta una proporción de células detenidas en M1 que varía entre 9% y 11%, con un promedio de 10,3%, evidenciando una diferencia con el control de 5,3% (respecto al promedio). El CBD evidencia resultados similares, aunque algo menores promedialmente (9,6%) con una diferencia con el control de 4,6%. Es de destacar la existencia de un valor que se aleja de los obtenidos en las demás muestras de esta línea celular tratadas con CBD, que creemos podría ser obra de algún error del observador o algún artefacto a la hora de la manipulación y/o preparado de la muestra. Con respecto a la combinación THC/CBD, la misma exhibió una detención en M1 promedial de 17,6% (valores entre 13% y 21%), con una diferencia con el control de 12,6%.



Por otra parte, en la línea celular T24, el THC mostro promedialmente una proporción de células en M1 de 19% (valores entre 10-24), con una diferencia con el control de 14%, al igual que el CBD en la línea HeLa también se presentó un valor que difiere en más del 50% con respecto a los otros, que sospechamos se deba a las mismas causas que el anterior.

En cuanto al CBD el valor promedial fue de 23%, diferenciándose del control en un 19%, las muestras expuestas a este compuesto mostraron variabilidad entre si mayores que las demás muestras.

En cuanto a la combinación de igual concentración de las dos sustancias, mostro una media de células en M1 de 8%, con una diferencia mucho menor que estos compuestos por separados cuando se las compara con el control (4%).



| H e L a | M 1 | M 2 |
|----------------|-------|-------|
| C o n t r o l | 5 % | 9 5 % |
| Control etanol | 1 % | 9 9 % |
| T H C - 1 | 1 1 % | 8 9 % |
| T H C - 2 | 9 % | 9 1 % |
| T H C - 3 | 1 1 % | 8 9 % |
| C B D - 1 | 1 3 % | 8 7 % |
| C B D - 2 | 4 % | 9 6 % |
| C B D - 3 | 1 2 % | 8 8 % |
| THC/CBD-1 | 2 1 % | 7 9 % |
| THC/CBD-2 | 1 9 % | 8 1 % |
| THC/CBD-3 | 1 3 % | 8 7 % |

| T 2 4 | M 1 | M 2 |
|----------------|-------|-------|
| C o n t r o l | 4 % | 9 6 % |
| Control etanol | 9 % | 9 1 % |
| T H C - 1 | 2 4 % | 7 6 % |
| T H C - 2 | 1 0 % | 9 0 % |
| T H C - 3 | 2 3 % | 7 7 % |
| C B D - 1 | 2 2 % | 7 8 % |
| C B D - 2 | 3 0 % | 7 0 % |
| C B D - 3 | 1 7 % | 8 3 % |
| THC/CBD-1 | 7 % | 9 3 % |
| THC/CBD-2 | 7 % | 9 3 % |
| THC/CBD-3 | 1 0 % | 9 0 % |

Todos estos resultados fueron analizados estadísticamente mediante el test de chi cuadrado, con un intervalo de confianza del 95% con un valor $p = 0,05$ y para 4 grados de libertad obteniendo un valor límite según la tabla de chi cuadrado de 9,488. En el análisis realizado para la línea de células tumorales de HeLa, obtuvimos un valor de chi cuadrado de 19,6968 y para las líneas celulares tumorales de T24, un valor de chi cuadrado de 16,4654. Podemos concluir que dentro de un rango de 0 a 9,488 el resultado que obtuvimos para cada línea de células tumorales no se



encuentra dentro de éste, por lo que rechazamos H_0 . Es decir que las proporciones de células que crecen, no son idénticas para las 5 diferentes categorías, existiendo una relación entre la condición y fase de división celular (MI y MII).

DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, los cuales han sido esquematizados en las tablas y gráficos adjuntos, se desprende el siguiente análisis.

Los resultados arrojados muestran que en la línea T24, el derivado cannábico que globalmente mostró mayor actividad antiproliferativa respecto a la población control, fue el CBD. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en estudios previos como el llevado a cabo por (Mohammed I. Khan y cols 2016)⁵¹ en el que se utilizó también un modelo tumoral de cáncer de vejiga y se comprobó que los cannabinoides retardaron el ciclo celular y por ende la progresión tumoral.

De acuerdo a los resultados para la línea tumoral HeLa, podríamos concluir que tanto el THC como el CBD actuando por separado no logran los mismos resultados antiproliferativos que actuando simultáneamente en concentraciones iguales, lo que nos permite plantear la hipótesis de la existencia de un posible efecto sinérgico entre dichos derivados.

En un análisis comparativo de ambos resultados parecería evidenciar que en la línea celular HeLa hay un mayor porcentaje de células en fase M2 que en la línea T24. Esto nos hace pensar que existe una menor inhibición de la proliferación en la línea HeLa de carcinoma de cuello uterino respecto a T24 cuando se exponen a los distintos derivados. Esto sin duda despierta algunas interrogantes: ¿Hay un impacto diferente de los cannabinoides sobre el ciclo celular dependiendo de cuál sea la línea celular involucrada? ¿Pueden los diferentes cannabinoides comportarse como antiproliferativos en algunas líneas celulares y pro proliferativos en otras? ¿De qué depende esa diferencia? Son todas interrogantes que pueden ser dilucidadas en estudios posteriores con una modalidad similar a la empleada, tal vez incluyendo más líneas celulares diferentes y comparándolas con los resultados obtenidos.

Otro de los resultados que nos llamó la atención en este estudio es que la asociación de ambos cannabinoides THC/CBD impresiona tener un mayor efecto antiproliferativo en la línea HeLa que en T24. En este último la variación respecto al control fue poco significativa. Lo cual podría servir como base para plantear la hipótesis de que sobre algunas líneas celulares los cannabinoides podrían tener un efecto sinérgico mientras que en otros el efecto antiproliferativo parece más bien atenuarse.

Si bien el objetivo general de este trabajo es estudiar el efecto antiproliferativo *in vitro* en líneas celulares tumorales expuestas a diferentes derivados de cannabis, en base a los resultados obtenidos podemos concluir que el ciclo celular se modifica en las líneas expuestas a cannabis

respecto a las de la población control.

Sin embargo, este estudio sirve como disparador de interesantes interrogantes; por una parte, nos hace cuestionar acerca de las dosis utilizadas: si hubo un efecto antiproliferativo poco importante, ¿podrá lograrse un efecto mayor a dosis superiores o inferiores? Es decir, ¿Es este resultado dosis-dependiente? A su vez también nos cuestionamos si existe diferente efecto cuando se enfrenta una misma sustancia a diferentes líneas celulares tumorales, y si así fuera ¿a qué se debería este cambio actividad antiproliferativa? ¿esto podría tener en el futuro alguna implicancia terapéutica?

Todas estas hipótesis son formuladas en base a resultados de cultivos celulares in vitro como los obtenidos en nuestro estudio o los que analizamos en la bibliografía al inicio de este trabajo. Probablemente una de las mayores interrogantes y más grandes desafíos es determinar si estos resultados son reproducibles in vivo, ya que es de gran interés saber cómo se comportarían estos mismos compuestos en un medio mucho más complejo que el de los cultivos celulares. ¿El estudio in vivo arrojaría resultados similares a los observados en el estudio in vitro? ¿De qué modo se puede lograr que los cannabinoides reconozcan las células diana o, en su defecto, un tejido en particular, actuando sobre ellas sin generar efectos indeseados sobre la proliferación de otros tejidos?

Existe evidencia de que los cannabinoides pueden inducir la apoptosis en algunos tipos de células no tumorales, especialmente en aquellas con un alto índice mitótico como por ejemplo las células endoteliales, (Blazquez et al., 2003.)⁵²

Otra publicación apoya sólidamente la justificación terapéutica para combinar THC con otros componentes presentes en el cannabis. Se refiere además a que el impacto de los terpenoides individuales sobre THC requieren de más estudios en animales y ensayos clínicos. Una mejor expectativa de la fitoquímica del cannabis puede ser un objetivo factible a través de una investigación adicional del efecto de acompañamiento en esta versátil planta que puede ayudarnos a cumplir su promesa como tesoro farmacológico, (John M. McPartland and Ethan B. Russo, 2014.)⁵³

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA

En base a los resultados obtenidos y al estudio estadístico aplicado a los mismos, dilucidamos que los diferentes extractos de cannabis agregados a las líneas celulares tumorales estudiadas, tienen un efecto antiproliferativo. Aunque no podemos afirmar con exactitud cuál de los extractos tiene una mayor importancia en dicho efecto.

Esto podría ser un aporte más, de un amplio caudal de estudios e investigaciones, en busca de la mejor manera de introducir al cannabis y sus derivados como coadyuvancia en la terapéutica antitumoral, y no limitándose solo al tratamiento paliativo.

Este estudio abre una puerta más para seguir investigando acerca de los tantos efectos de estos compuestos que han sido largamente utilizados en el correr de la historia y sobre los cuales aún se conoce tan poco, brindando nuevos lineamientos sobre los cuales partir para formular nuevas teorías acerca de los efectos de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Gaoni, Y., & Mechoulam, R. (1964). Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*, 86(8), 1646-1647.
- ² Śledziński, P., Zeyland, J., Słomski, R., & Nowak, A. (2018). The current state and future perspectives of cannabinoids in cancer biology. *Cancer medicine*, 7(3), 765-775.
- ³ Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., & Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *science*, 282(5397), 2258-2261.
- ⁴ Flemming, T., Muntendam, R., Steup, C., & Kayser, O. (2007). Chemistry and biological activity of tetrahydrocannabinol and its derivatives. In *Bioactive Heterocycles IV* (pp. 1-42). Springer, Berlin, Heidelberg.
- ⁵ Carnelli, Carlos. García., & Cairabú, S. (2012). Aspectos farmacognósticos del cannabis. *Aporte universitario al Debate Nacional sobre Drogas*.
- ⁶ Pertwee, R. G. (2008). The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. In *Drug Addiction* (pp. 637-686). Springer, New York, NY.
- ⁷ Hermanson, D. J., & Marnett, L. J. (2011). Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer and metastasis reviews*, 30(3-4), 599-612.
- ⁸ Bowles, D. W., O'Bryant, C. L., Camidge, D. R., & Jimeno, A. (2012). The intersection between cannabis and cancer in the United States. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 83(1), 1-10.
- ⁹ Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S. Y., Makriyannis, A., & Piomelli, D. (1997). Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science*, 277(5329), 1094-1097.
- ¹⁰ Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., & Bonner, T. I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 346(6284), 561.

- ¹¹ Munro, S., Thomas, K. L., & Abu-Shaar, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), 61.
- ¹² Pertwee, R. G., Howlett, A. C., Abood, M. E., Alexander, S. P. H., Di Marzo, V., Elphick, M. R., ... & Mechoulam, R. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacological reviews*, 62(4), 588-631.
- ¹³ Atwood, B. K., & Mackie, K. (2010). CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *British journal of pharmacology*, 160(3), 467-479.
- ¹⁴ Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Velasco, G., Tolón, R. M., Ramos, J. A., & Guzmán, M. (2007). Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival?. *Trends in pharmacological sciences*, 28(1), 39-45.
- ¹⁵ Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., ... & Guzmán, M. (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *The FASEB Journal*, 20(13), 2405-2407.
- ¹⁶ Sarfaraz, S., Adhami, V. M., Syed, D. N., Afaq, F., & Mukhtar, H. (2008). Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer research*, 68(2), 339-342.
- ¹⁷ Munson, A. E., Harris, L. S., Friedman, M. A., Dewey, W. L., & Carchman, R. A. (1975). Antineoplastic activity of cannabinoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(3), 597-602.
- ¹⁸ White, A. C., Munson, J. A., Munson, A. E., & Carchman, R. A. (1976). Effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in Lewis lung adenocarcinoma cells in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute*, 56(3), 655-658.
- ¹⁹ Pisanti, S., & Bifulco, M. (2009). Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacological research*, 60(2), 107-116.
- ²⁰ Velasco, G., Sánchez, C., & Guzmán, M. (2012). Towards the use of cannabinoids as antitumour agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(6), 436.
- ²¹ Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835), 355.

- ²² Brown, G., Hughes, P. J., & Michell, R. H. (2003). Cell differentiation and proliferation—simultaneous but independent?. *Experimental cell research*, 291(2), 282-288.
- ²³ Caffarel, M. M., Sarrió, D., Palacios, J., Guzmán, M., & Sánchez, C. (2006). Δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer research*, 66(13), 6615-6621.
- ²⁴ Guzman, M. (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 745.
- ²⁵ Malfitano, A. M., Ciaglia, E., Gangemi, G., Gazzero, P., Laezza, C., & Bifulco, M. (2011). Update on the endocannabinoid system as an anticancer target. *Expert opinion on therapeutic targets*, 15(3), 297-308.
- ²⁶ Muñoz Sánchez, J., & Soto Navarro, S. (2001). El uso terapéutico del cannabis y la creación de establecimientos para su adquisición y consumo.
- ²⁷ Nomura, D. K., Dix, M. M., & Cravatt, B. F. (2010). Activity-based protein profiling for biochemical pathway discovery in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(9), 630.
- ²⁸ Thors, L., Bergh, A., Persson, E., Hammarsten, P., Stattin, P., Egevad, L., ... & Fowler, C. J. (2010). Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. *PloS one*, 5(8), e12275.
- ²⁹ Zheng, D., Bode, A. M., Zhao, Q., Cho, Y. Y., Zhu, F., Ma, W. Y., & Dong, Z. (2008). The cannabinoid receptors are required for ultraviolet-induced inflammation and skin cancer development. *Cancer research*, 68(10), 3992-3998.
- ³⁰ Joosten, M., Valk, P. J., Jordà, M. A., Vankan-Berkhoudt, Y., Verbakel, S., Van Den Broek, M., ... & Delwel, R. (2002). Leukemic predisposition of pSca-1/Cb2 transgenic mice. *Experimental hematology*, 30(2), 142-149.

- ³¹ Pisanti, S., Picardi, P., D'Alessandro, A., Laezza, C., & Bifulco, M. (2013). The endocannabinoid signaling system in cancer. *Trends in pharmacological sciences*, 34(5), 273-282.
- ³² Sailler, S., Schmitz, K., Jäger, E., Ferreiros, N., Wicker, S., Zschiebsch, K., ... & Lötsch, J. (2014). Regulation of circulating endocannabinoids associated with cancer and metastases in mice and humans. *Oncoscience*, 1(4), 272.
- ³³ Benz, A. H., Renné, C., Maronde, E., Koch, M., Grabiec, U., Kallendrusch, S., ... & Dehghani, F. (2013). Expression and functional relevance of cannabinoid receptor 1 in Hodgkin lymphoma. *PloS one*, 8(12), e81675
- ³⁴ Mukhopadhyay, B., Schuebel, K., Mukhopadhyay, P., Cinar, R., Godlewski, G., Xiong, K., ... & Kunos, G. (2015). Cannabinoid receptor 1 promotes hepatocellular carcinoma initiation and progression through multiple mechanisms. *Hepatology*, 61(5), 1615-1626.
- ³⁵ Messalli, E. M., Grauso, F., Luise, R., Angelini, A., & Rossiello, R. (2014). Cannabinoid receptor type 1 immunoreactivity and disease severity in human epithelial ovarian tumors. *American journal of obstetrics and gynecology*, 211(3), 234-e1.
- ³⁶ Jung, C. K., Kang, W. K., Park, J. M., Ahn, H. J., Kim, S. W., Oh, S. T., & Choi, K. Y. (2013). Expression of the cannabinoid type I receptor and prognosis following surgery in colorectal cancer. *Oncology letters*, 5(3), 870-876.
- ³⁷ Wu, X., Han, L., Zhang, X., Li, L., Jiang, C., Qiu, Y., ... & Fu, J. (2012). Alteration of endocannabinoid system in human gliomas. *Journal of neurochemistry*, 120(5), 842-849.
- ³⁸ Andradas, C., Caffarel, M. M., Perez-Gomez, E., Salazar, M., Lorente, M., Velasco, G., ... & Sánchez, C. (2011). The orphan G protein-coupled receptor GPR55 promotes cancer cell proliferation via ERK. *Oncogene*, 30(2), 245.
- ³⁹ Pérez-Gómez, E., Andradas, C., Flores, J. M., Quintanilla, M., Paramio, J. M., Guzman, M., & Sanchez, C. (2013). The orphan receptor GPR55 drives skin carcinogenesis and is upregulated in human squamous cell carcinomas. *Oncogene*, 32(20), 2534.

⁴⁰ Wang, D., Wang, H., Ning, W., Backlund, M. G., Dey, S. K., & DuBois, R. N. (2008). Loss of cannabinoid receptor 1 accelerates intestinal tumor growth. *Cancer research*, *68*(15), 6468-6476.

⁴¹ Armstrong, J. L., Hill, D. S., McKee, C. S., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Lopez-Valero, I., ... & Velasco, G. (2015). Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *Journal of Investigative Dermatology*, *135*(6), 1629-1637.

⁴² Fowler, C. J. (2015). The potential of inhibitors of endocannabinoid metabolism as anxiolytic and antidepressive drugs—A practical view. *European Neuropsychopharmacology*, *25*(6), 749-762.

⁴³ de la Ossa, D. H. P., Lorente, M., Gil-Alegre, M. E., Torres, S., García-Taboada, E., del Rosario Aberturas, M., ... & Torres-Suarez, A. I. (2013). Local delivery of cannabinoid-loaded microparticles inhibits tumor growth in a murine xenograft model of glioblastoma multiforme. *PLoS One*, *8*(1), e54795.

⁴⁴ Torres, S., Lorente, M., Rodríguez-Fornés, F., Hernández-Tiedra, S., Salazar, M., García-Taboada, E., ... & Velasco, G. (2011). A combined preclinical therapy of cannabinoids and temozolomide against glioma. *Molecular cancer therapeutics*, *10*(1), 90-103.

⁴⁵ Alonso, R., Piñeros, M., Laversanne, M., Musetti, C., Garau, M., Barrios, E., & Bray, F. (2018). Lung cancer incidence trends in Uruguay 1990–2014: An age-period-cohort analysis. *Cancer epidemiology*, *55*, 17-22.

⁴⁶ Barrios, E., & Garau, M. (2017, July). Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 4, No. 1, pp. 7-161). Universidad de la República. Facultad de Medicina.

⁴⁷ Uruguay, Ley N° 19.172, 20 de diciembre de 2013, “Marihuana y sus derivados control y regulación del estado de la importación, producción, adquisición, almacenamiento, comercialización y distribución”, Senado y cámara de representantes de la República oriental del Uruguay 7 de enero de 2014.

-
- ⁴⁸ Freshney, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2000. R. ISBN, 471348899.
- ⁴⁹ Wolff, S., & Perry, P. (1974). Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma*, 48(4), 341-353.
- ⁵⁰ Madrigal-Bujaidar, E., Hernandez-Ceruelos, A., & Chamorro, G. (2001). Induction of sister chromatid exchanges by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 39(9), 941-946.
- ⁵¹ Khan, M., Sobocińska, A., Czarnecka, A., Król, M., Botta, B., & Szczylik, C. (2016). The therapeutic aspects of the endocannabinoid system (ECS) for cancer and their development: From nature to laboratory. *Current pharmaceutical design*, 22(12), 1756-1766.
- ⁵² Blázquez, C., Casanova, M. L., Planas, A., del Pulgar, T. G., Villanueva, C., Fernández-Aceñero, M. J., ... & Guzmán, M. (2003). Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *The FASEB Journal*, 17(3), 529-531.
- ⁵³ Russo, E. B., & Grotenhermen, F. (Eds.). (2014). *The Handbook of Cannabis Therapeutics: From Bench to Bedside*. Routledge.