

Caracterización de la actividad inmunomoduladora de diferentes quimiotipos de *Cannabis sativa L* enriquecidos en terpenos

Jenny Alfaro^{1,3}, María C Barrera¹, Luis M. Pombo¹, Oscar Rodríguez¹, John F. Hernández, Antonio Mejía¹, Renato A. Guzmán², Ericsson D. Coy B³, Paola Santander¹

¹Grupo de Investigación en Farmacología Vegetal y Terapéuticas Alternativas GIFVTA).
Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Juan N. Corpas

²Director científico instituto de Enfermedades Autoinmunes Renato Guzmán (IDEARG).

³Grupo Integrado de Investigaciones en Química y Biología (InQuiBio), Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada.

Resumen: Las enfermedades autoinmunes agrupan alrededor de 80 patologías que, en conjunto, generan un alto impacto en salud pública en el mundo y así mismo en Colombia. Esto se debe directamente a la alta prevalencia de estas, la incapacidad física y los costos que genera para el paciente y el sistema de salud (Cooper, Bynum y Somers, 2009); (Cross, 2010). Un ejemplo de estas enfermedades es la Artritis Reumatoide (AR), en la cual las células del sistema inmune como monocitos y macrófagos, entre otros, pierden la capacidad de reconocer las células propias del individuo y las ataca por error; generando una respuesta inmune crónica y un ambiente inflamatorio exacerbado, que conlleva a la destrucción continua de las articulaciones (Emery, Breedveld, Dougados y Kalden, 2002). En la búsqueda de nuevas fuentes de medicamentos que puedan utilizarse en el manejo de este tipo de padecimientos, aquellos provenientes de plantas han venido cobrando gran importancia. Este es el caso de *Cannabis sativa*, en la que se ha encontrado un gran potencial fitoterapéutico complementario y/o alternativo, para el manejo de diferentes enfermedades entre las que se encuentran las inflamatorias (Sadiye, Ashok, Ugra, Mitzi y Prakash, 2010). En este contexto, en este trabajo se caracterizó la actividad inmunomoduladora de diferentes quimiotipos del Cannabis, sobre células proliferantes mononucleares humanas a fin de comprender su efecto en procesos inflamatorios, extrapolables a la AR. Los resultados obtenidos, revelan como la composición química de diferentes quimiotipos de la planta, afecta de diferente forma la proliferación in vitro de las células. El extracto con mayor actividad anti proliferativa fue el denominado M1, quien tiene además de los Cannabinoides tradicionales THC:CBD (1:3), una mezcla única y diferencial de terpenos como el α -Terpineol, el α -Guaiene, el Agarospirol y el Caryophyllen de los que se sabe, tienen actividad anti inflamatoria que podría explicar la mayor actividad de este extracto (Russo, 2011). Los análisis de viabilidad también mostraron que el extracto M1, protege a las células de la muerte por apoptosis o necrosis. Lo cual propone que el mecanismo de control de la proliferación que ejerce el extracto podría estar enfocado en la liberación de mediadores inflamatorios o en la inactivación directa de las células inmunes proliferantes.

Palabras Clave: Autoinmunidad, Artritis Reumatoide, *Cannabis sativa L*, Cananabonoides, Terpenos, Células Mononucleares Humanas, Actividad Inmunomoduladora.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes (Diabetes tipo I, Lupus eritematoso sistémico, Esclerosis múltiple y Artritis reumatoide, entre otras) tienen una alta prevalencia en el mundo (7.6–9.4%) (Cooper, Bynum y Somers, 2009). Entre estas, la AR es un de las más prevalentes (0,2 al 5%), siendo mas común en mujeres (0.35%) que hombres (0.13%) (Cross, 2010). La AR es una enfermedad multisistémica caracterizada por el desarrollo de un proceso inflamatorio de la membrana sinovial asociado a la destrucción progresiva del cartílago articular y del hueso (Emery, Breedveld, Dougados y Kalden, 2002). Actualmente, en el manejo médico de estas enfermedades utilizan diferentes medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARMES), que proporcionan mejoría a costa de múltiples riesgos para el paciente, lo que lleva a la necesidad de ampliar las opciones terapéuticas hacia tratamientos no convencionales como la farmacología vegetal con *Cannabis sativa* L. De esta planta se ha establecido que, Cannabinoides como el Delta 9 tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) y el Cannabidiol (CBD) (sintéticos o aislados), controlan la actividad de diferentes células del sistema inmune como Linfocitos B, T y Macrófagos (Sadiye, Ashok, Ugra, Mitzi y Prakash, 2010). De igual forma, también existe un grupo de metabolitos como los terpenos, presentes en diferentes plantas y así mismo en Cannabis, que tienen efecto inmunomodulador (Russo, 2011) que en conjunto con Cannabinoides y demás metabolitos, podrían favorecer el uso de esta planta para el manejo de enfermedades autoinmunes como la AR.

1. DISERTACIÓN

1.1. Exposición

Las enfermedades autoinmunes, afectan a un gran número de individuos en el mundo y generalmente conllevan a la incapacidad permanente de los pacientes que la padecen (Cooper, Bynum y Somers, 2009); (Cross, 2010). Actualmente, existen medicamentos alopáticos para el manejo de estas enfermedades como: los AINES o los FARMES. Sin embargo, no todos los pacientes responden satisfactoriamente al tratamiento y en muchas ocasiones, se generan efectos secundarios adversos al utilizarse de forma prolongada. En la actualidad en Colombia, se aprobó la normativa que regula la investigación en *Cannabis sativa* L con fines medicinales, lo cual ha permitido plantear nuevos proyectos de investigación básica y aplicada con esta planta en el país. Bajo esta perspectiva, se ha aprovechado la información de uso tradicional y científica que existe sobre el uso del Cannabis y se proponen nuevas investigaciones enfocadas en validar científicamente; el uso de esta planta o sus derivados en el manejo de enfermedades autoinmunes como la AR.

1.2. Objetivo

Caracterizar la actividad inmunomoduladora de diferentes quimiotipos de *Cannabis sativa* L, a través del establecimiento de su efecto en la proliferación e inducción de muerte de las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSPH).

1.3. Metodología

Se recolectó la flor femenina de cuatro cepas o quimiotipos de *Cannabis sativa L* y se obtuvieron extractos de baja y media polaridad por extracción con CO₂ en estado supercrítico (M1-M4). La composición química de estos extractos se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Como método de tamizaje de la actividad inmunomoduladora de los extractos, se determinó la capacidad de los extractos de disminuir o potenciar la proliferación de las CMSPH, utilizando las siguientes estrategias: colocando los extractos en contacto con CMSPH, previamente estimulados con Fitohepatoglucina (PHA, del inglés Phytohaemagglutinin) por 24h o estimulando las CMSPH al mismo tiempo con PHA y los extractos. Para estos experimentos, se ensayaron ocho concentraciones decrecientes de M1 a M4 (200 a 1,6 ug/mL). Los cambios en la proliferación se establecieron a las 48 y 72h posteriores al tratamiento, utilizando el método de evaluación de actividad enzimática mitocondrial (MTT). De los extractos que tuvieron mayor actividad anti proliferativa, se estableció la inducción de apoptosis o necrosis en las CMSP, utilizando Annexin V- FITC y IP. Los resultados se analizaron por citometría de flujo multiparamétrica.

1.4. Resultados

Los extractos M1 y M4, disminuyen la proliferación de las CMSP, utilizando menores concentraciones (44 y 50 ug/mL, respectivamente) que los extractos M2 y M3. De manera interesante, se observó que ninguno de los extractos disminuye la proliferación de las CMSP, cuando se estimula al mismo tiempo con PHA. Lo que indicaría que el efecto inmunosupresor, ocurriría en células previamente estimuladas como ocurre en las enfermedades autoinmunes. Así mismo, se observó que el extracto M1, disminuye la muerte por apoptosis de las células estimuladas, lo que indicaría que el efecto inmunomodulador podría enfocarse en la disminución de mediadores de la inflamación como se ha reportado previamente (Sadiye, Ashok, Ugra, Mitzi y Prakash, 2010); (Russo, 2011) . El análisis químico del extracto M1, tiene a diferencia de los otros extractos, un contenido de Terpenos único, entre los que se encuentran el α -Terpineol, α -Guaiene, el Agarospirol y el Caryophyllen. De éstos también se ha reportado actividad inmunomoduladora, que podría explicar el mayor efecto inmunosupresor de este quimiotipo de Cannabis.

CONCLUSIONES

La composición química de las diferentes cepas o quimiotipos de Cannabis sativa L utilizadas en este estudio, generan una respuesta anti proliferativa diferencial, que se ve asociada con la concentración del extracto y así mismo a la actividad de Cannabinoides en combinación con diferentes terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos).

La actividad anti proliferativa del extracto denominado M1, al parecer no está asociada con la inducción de muerte por apoptosis o necrosis de las células, es así que, es importante seguir dilucidando los mecanismos de acción que utiliza el Cannabis para regular la respuesta inmune, ya sea sobre la secreción de mediadores inflamatorios como citosinas o sobre la activación directa de las células. Para este fin, se establecerán modelos biológicos ex vivo, que permitan establecer precisamente la actividad inmunomoduladora de los extractos más activos, sobre células de pacientes con enfermedades autoinmunes como la AR.

EXPRESIONES DE GRATITUD

A la Fundación Universitaria Juan N. Corpas, Facultad de Medicina y a la asociación Colombiana de Reumatología (ASOREUMA), por la financiación de esta iniciativa de investigación.

REFERENCIAS

Cooper G, Bynum M and Somers E. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun.* 2009;33(3-4):197- 207.

Cross M. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* 2004;131:6–1322.

Emery P, Breedveld F, Dougados M, Kalden J. Early referral recommendations for newly diagnosed rheumatoid arthritis: evidence based development of a clinical guide. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:290-297.

Sadiye Amcaoglu Rieder, Ashok Chauhan, Ugra Singh, Mitzi Nagarkatti, and Prakash Nagarkatti. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology.* 2010;215(8):598– 605.

Russo E. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid- terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology.* 2011;163:1344–64.