

Actividad inmunomoduladora y antioxidante de extractos de *Cannabis sativa* y *Larrea divaricata*

Elina Malén Saint Martin

Farmacognosia

Introducción / Antecedentes

La **inflamación** y el **estrés oxidativo** afectan al sistema nervioso central y deterioran las funciones cognitivas en la epilepsia.

Se plantea al **óxido nítrico (ON)** como un intermediario relacionado con las crisis epileptiformes.

***Cannabis sativa* L.** (Cannabaceae) es una planta medicinal utilizada en el tratamiento de esta patología, siendo el **cannabidiol (CBD)** su compuesto anticonvulsivante más importante. ***Larrea divaricata* Cav.** (Zygophylliaceae) es una planta nativa con actividad antiinflamatoria y antioxidante, siendo su compuesto mayoritario el **ácido nordihidroguayarético (NDGA)**.

La asociación de extractos de ambas especies podría actuar como **terapia neuroprotectora** en la epilepsia.

Objetivos

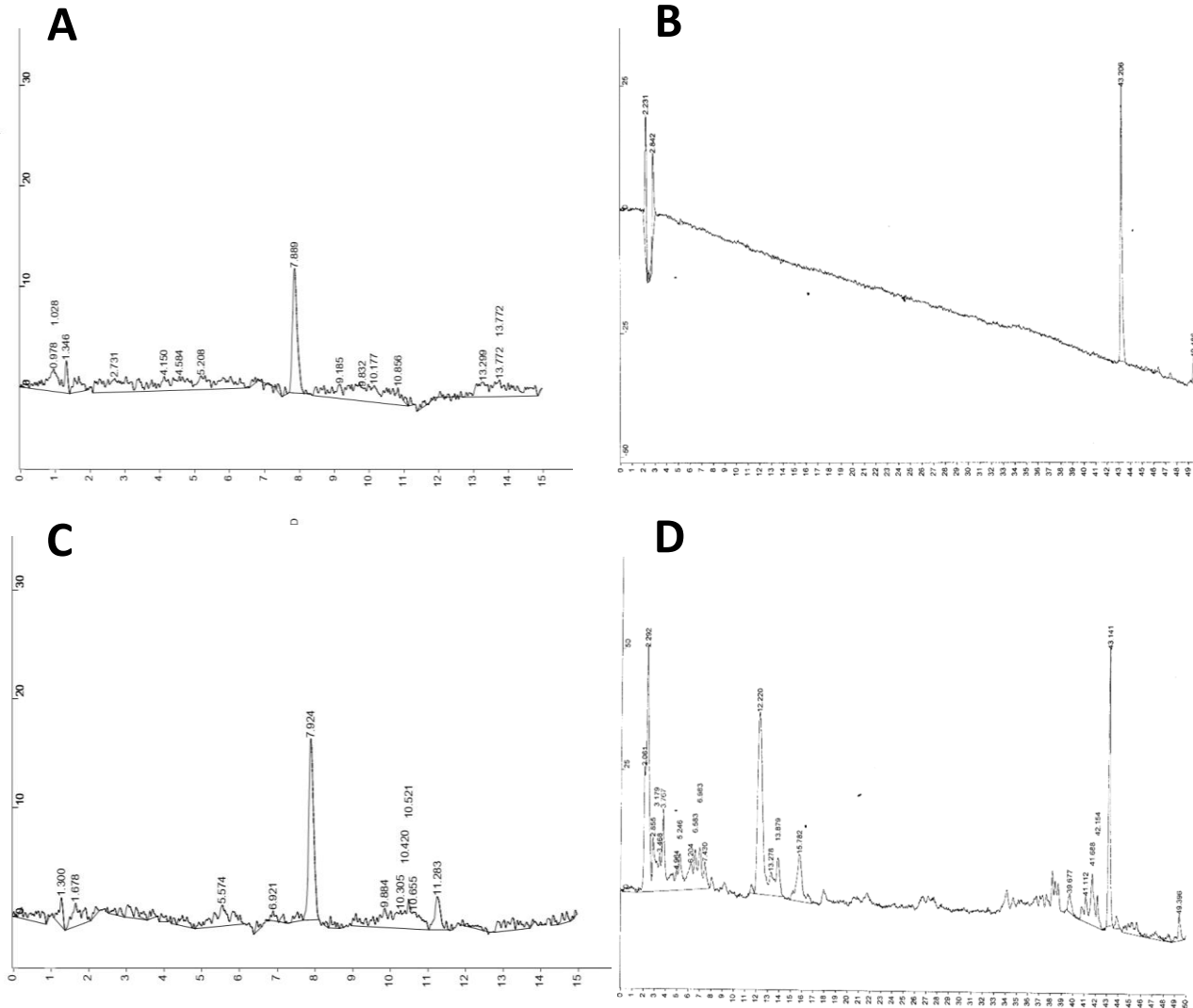
Estudiar la actividad de un **extracto etanólico de *C. sativa* (CSR)** y un **extracto acuoso de *L. divaricata* (LE)** sobre:

- La producción de nitritos totales en dos líneas celulares murinas, una de **macrófagos (Raw 264.7)** y otra de **neuronas (HT-22)**, tanto en **condiciones basales** como en **inflamación** inducida por lipopolisacárido (LPS).
- La **actividad neuroprotectora** frente al glutamato en neuronas **HT-22**.

Metodología



- **NDGA y CBD** fueron **identificados y cuantificados por HPLC-UV**.
- Los **polifenoles** totales se determinaron por el método colorimétrico de **Folin-Ciocalteu**. Los **flavonoides** con **tricloruro de aluminio**.
- La **inflamación** se indujo con **LPS**.
- El **estrés oxidativo** se indujo con **glutamato**
- La **viabilidad** celular se ensayó con **MTT** y los **nitritos totales** con el reactivo de **Griess**.
- Los resultados fueron expresados como % de variación respecto a los nitritos basales o inducidos por LPS o como porcentaje de viabilidad respecto al basal en el ensayo con glutamato.



Extracto	CBD (%)	NDGA (%)	Polifenoles totales (%)	Flavonoides totales (%)
<i>C. sativa</i>	62,36 ± 1,57	-	18,46 ± 1,47	0,35 ± 0,0048
<i>L. divaricata</i>	-	1,56 ± 0,08	17,09 ± 0,28	2,03 ± 0,05***

Tabla 1. Cuantificación de compuestos mayoritarios, polifenoles y flavonoides en los extractos. Los resultados se expresan como media ± ESM de tres experimentos. *** $p < 0,001$ diferencias significativas entre los extractos según prueba T de Student.



Figura 1. Cromatogramas obtenidos por HPLC-UV. A. CBD. B. NDGA. C. CSR. D. LE. Figuras representativas de tres corridas cromatográficas.

Macrófagos Raw264,7

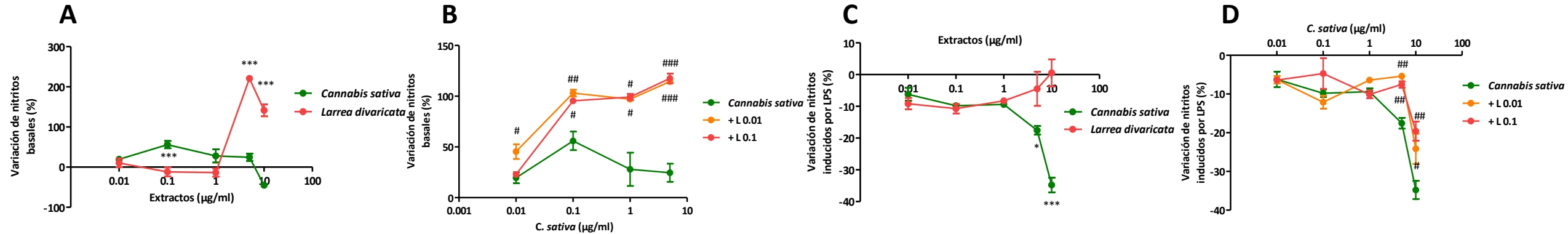


Figura 2. Efecto de los extractos sobre el nivel de nitritos basal (A, B) e inducidos por LPS (C, D) en células Raw 264,7. A y C. Efecto de CSR y LE; B y D. Efecto de la adición de LE sobre la respuesta de CSR. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de tres experimentos realizados por triplicado. *p < 0,05; ***p < 0,001 diferencias significativas entre los extractos según prueba T de Student. #p < 0,05, ## p < 0,01; ###p < 0,001 diferencias significativas entre la actividad de CSR sola y en presencia de diferentes concentraciones de LE según ANOVA + Dunnett.



Figura 3. Efecto de CBD y NDGA sobre el nivel de nitritos basales (A) e inducido por LPS (B) en células Raw 264,7. Los resultados se expresan como la media \pm ESM de tres experimentos realizados por triplicado.

Neuronas HT-22

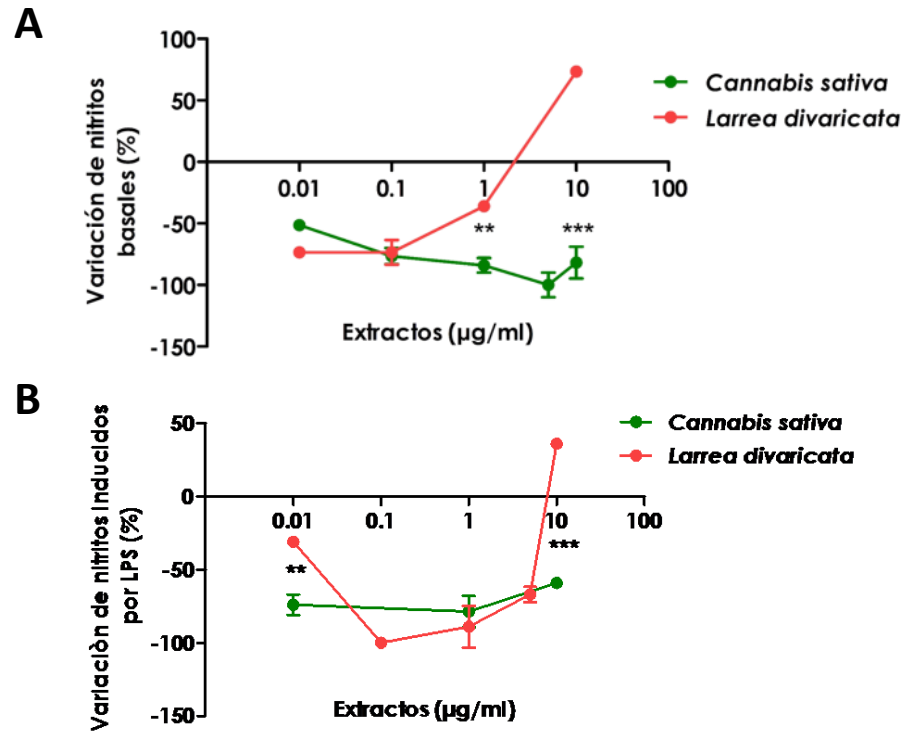


Figura 4. Efecto de los extractos sobre el nivel de nitritos basal (A) e inducidos por LPS (B) en células HT-22. Los resultados se expresan como la media ± ESM de tres experimentos realizados por triplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ diferencias significativas entre los extractos según prueba T de Student.

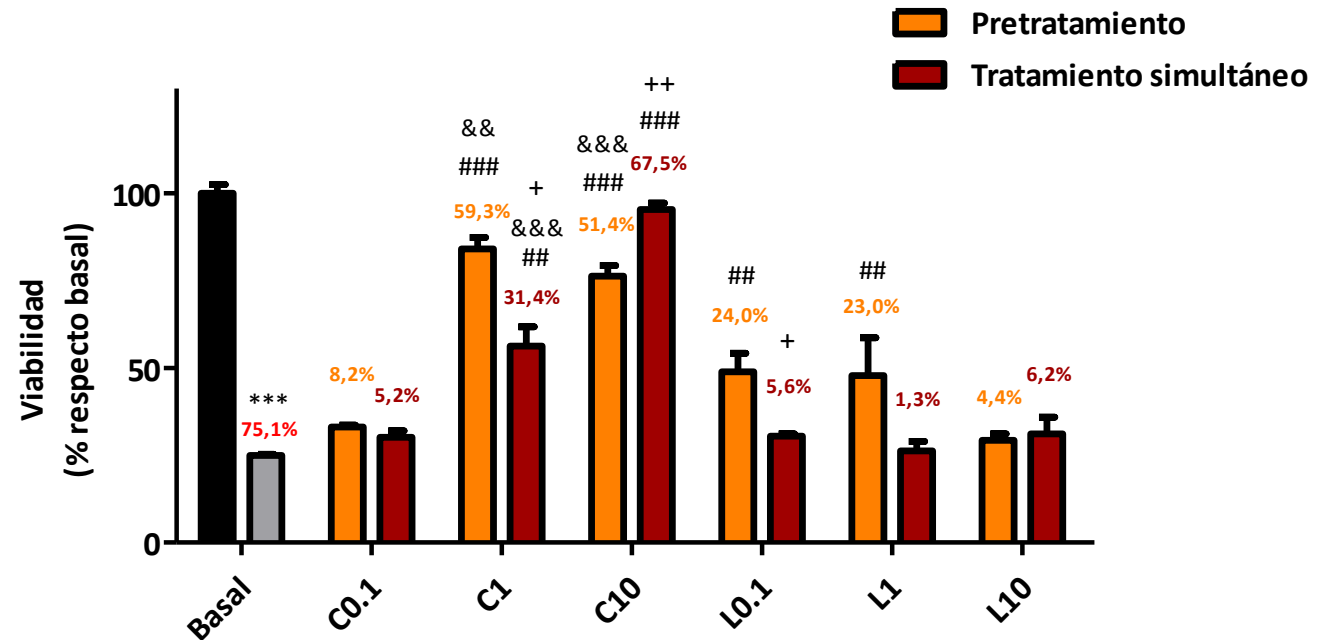


Figura 5. Efecto de los extractos a dos tiempos de tratamiento sobre la viabilidad de células HT-22 en presencia de glutamato 5 mM.

*** $p < 0.0001$ diferencia significativa de la condición con glutamato respecto al basal según el test T de Student. ### $p < 0.0001$; ## $p < 0.01$ diferencia significativa de glutamato con tratamientos respecto al glutamato solo según ANOVA + Dunnett. && $p < 0.01$; &&& $p < 0.0001$ diferencia significativa de glutamato con tratamiento respecto al basal según ANOVA + Dunnett. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, diferencia significativa entre el pretratamiento y el tratamiento simultáneo con los extractos según el test T de Student.

Conclusiones

- La **asociación de los extractos** podría ser útil para **estimular al sistema inmune innato**.
- La **disminución de la producción de nitritos en neuronas** podría ser importante en **el control de las crisis epilépticas**.
- Ambos extractos ejercen **acción neuroprotectora frente al glutamato** en células HT-22.
- Tanto el **CBD** como el **NDGA** parecen ser **responsables de la actividad antiinflamatoria** de los extractos.

Referencias

- Saint Martin M, Marrassini C, Silva Sofrás F. M, Peralta I, Cogoi L, van Baren C, Alonso M.R , Anesini C. **Antioxidant effect of *Cannabis sativa* resin associated with *Larrea divaricata* Cav. extract: synergism, additivity and antagonism.** Aceptado para su publicación International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2022.
- Park C-H, Song JH, Kim S-N, Lee JH, Lee H-J, Kang KS, Lim H-H. **Neuroprotective Effects of Tetrahydrocurcumin against Glutamate-Induced Oxidative Stress in Hippocampal HT22 Cells.** *Molecules*. 2020; 25(1):144.
- Ghonime M, Emara M, Shawky R, Soliman H, El-Domany R, Abdelaziz A. **Immunomodulation of RAW 264.7 murine macrophage functions and antioxidant activities of 11 plant extracts.** *Immunol Invest*. 2015;44(3):237-252.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Maria Laura Barreiro por donarnos la línea celular de neuronas HT-22.