

# Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos de *Cannabis sativa L.* y de látex de *Croton urucurana* por medio de PCR cuantitativa (qPCR)

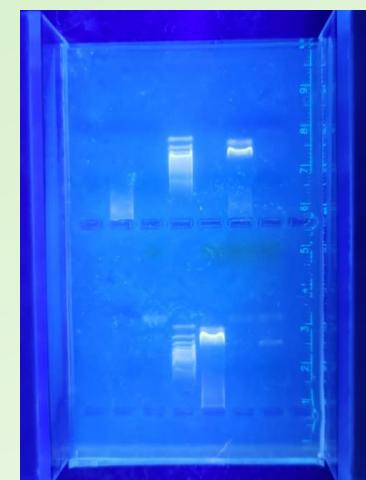
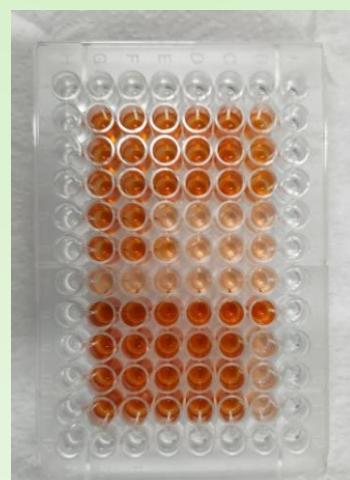
## Práctica Optativa

Alumno: Jonás Ignacio Aguirre

Carrera: Bioquímica

Director: Leandro Adrián Ferrini

Resolución N°:1494/22



### Agradecimientos

Al bioquímico Leandro Ferrini, a quien admiro, por aceptar dirigirme en la realización de esta práctica y ayudarme a dar mis primeros pasos en la biología molecular y los cultivos celulares, por la paciencia para responder tantas preguntas y por guiarme en este tramo final.

Al Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Medicina, por abrirme las puertas y permitirme conocer su labor y formar parte de él durante mi breve instancia.

Al Laboratorio de Productos Naturales de FaCENA, por recibirme durante mi primera beca de investigación e introducirme al estudio de las plantas. Por tantas mañanas alegres y tantas conversaciones amenas. A la Dra Ana Torres, que me enseñó que un resultado es un resultado y por halagar mis TLC.

A papá y a mamá por su apoyo y su amor incondicional y por sus pocas, pero prudentes presiones para impulsarme a rendir exámenes, sin los que habría sido más difícil salir adelante.

A Mateo y Elián, que siempre son buena compañía.

A mis amigos de la facultad por su paciencia, por entender mis altas y bajas, por tantas risas y tantos pesares juntos. Y a quienes conocí en la facultad y se quedaron para la vida, por entender mis ausencias y apoyarme a la distancia.

A mis amigos de la vida, que se acostumbraron a tener un amigo que estudia en Corrientes, y que además estudia bioquímica, por nunca renunciar a la amistad y por hacerme sentir como si no hubiese pasado un día sin vernos. Por mantener intactas amistades de tantos años.

# ÍNDICE GENERAL

---

Resumen.....	3
Objetivos .....	4
Introducción.....	4
Materiales y Métodos .....	6
Obtención del extracto de <i>Cannabis sativa</i> L.....	6
Obtención del látex de <i>Croton urucurana</i> .....	6
Cultivo de línea celular RAW 264.7.....	7
Subcultivos de células adheridas y recuento celular .....	7
PCR convencional para detección de <i>Mycoplasma</i> .....	7
Concentración tóxica de extracto de <i>Cannabis sativa</i> y látex de <i>Croton urucurana</i> por ensayo de XTT TACS® .....	8
qRT PCR .....	9
Resultados y Discusión .....	12
PCR convencional para detección de <i>Mycoplasma</i> .....	12
Ensayo de Citotoxicidad por XTT .....	12
qRT PCR .....	15
Discusión .....	19
Conclusión .....	22
Referencias .....	22

## RESUMEN

La inflamación es un mecanismo de defensa y representa la activación inicial del sistema inmune. Bajo ciertas condiciones, el organismo no es capaz de ejercer una regulación apropiada, haciendo necesario el uso de fármacos, siendo los antiinflamatorios no esteroides uno de los grupos de medicamentos más prescritos a nivel mundial a pesar de sus frecuentes efectos adversos. En este contexto, el extendido uso de plantas medicinales como alternativa terapéutica, especialmente en América Latina y el Caribe, en adición a la evidencia científica escasa sobre su eficacia y seguridad, promueven la realización de estudios que permitan evaluar la actividad de los productos vegetales, identificar principios activos con potencial terapéutico y escasos efectos adversos, y determinar la seguridad de los derivados utilizados. *Cannabis sativa L.* y *Croton urucurana* son especies con un amplio potencial terapéutico e intenso uso en medicina tradicional. *Cannabis sativa L.* es una planta con gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales, cuyos metabolitos más abundantes son los cannabinoides, concentrados principalmente en sus inflorescencias femeninas. Su potencial terapéutico ha sido ampliamente evaluado y reconocido en situaciones determinadas. El CBD es el cannabinoid más relevante desde el punto de vista farmacéutico; ha demostrado actividad antioxidant, antiinflamatoria, antimicrobiana, neuroprotectora, ansiolítica y anticonvulsivante. En cuanto al género *Croton*, comprende numerosas especies de distribución pantropical sobre las que se reportan numerosos usos en la medicina tradicional. En nuestra región, la especie representante es *Croton urucurana*, cuyo látex ha sido utilizado por sus efectos antiinflamatorios y analgésicos, así como para la cicatrización y el tratamiento de heridas infectadas. Si bien existen numerosos modelos *in vivo* e *in vitro* para la evaluación de la actividad antiinflamatoria de plantas, las técnicas de cultivo celular han dado resultado en diversas investigaciones, destacándose el uso de la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 para este fin. Considerando esto, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antiinflamatoria de un extracto etanólico de *Cannabis sativa*, y de látex de *Croton urucurana* a través de PCR cuantitativa (qPCR), mediante la evaluación de su influencia en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$  por la línea celular RAW 264.7 expuesta a un estímulo proinflamatorio de lipopolisacárido bacteriano (LPS). El extracto de *Cannabis sativa* se obtuvo por molienda del material vegetal, macerado en etanol 96° a temperatura ambiente durante 15 días al abrigo de la luz y posterior filtrado y secado en rotavapor a presión reducida. El látex de *Croton urucurana* se obtuvo por incisiones en la corteza de ejemplares adultos y recolección del exudado, filtrado y secado en rotavapor a presión reducida. Se determinaron las concentraciones tóxicas de ambos productos sobre la línea RAW 264.7 mediante un ensayo de XTT con el que se evaluó la viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de estos. Se obtuvieron reducciones no significativas de la viabilidad con *Cannabis* [100  $\mu$ g/ml] y con *Croton* [10  $\mu$ g/ml], por lo que estas fueron las máximas concentraciones que se aplicaron para estimular la línea en los ensayos posteriores. El efecto antiinflamatorio de ambos productos se evaluó mediante qPCR, para lo cual se preincubaron durante una hora las células RAW 264.7 con látex de *Croton* a concentraciones de 10  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml y con extracto de *Cannabis* concentraciones de 100  $\mu$ g/ml y 10  $\mu$ g/ml. Transcurrido este tiempo, se estimularon con LPS y se incubaron durante 8 horas. Las células fueron lisadas con el reactivo TRI-Reagent® (Sigma Aldrich), se extrajo el ARN obtenido y se cuantificó por su absorbancia a 260 nm. Se retrotranscribió el total del ARNm a ADN copia (ADNc) usando oligoDT como primer de reacción. Los ADNc obtenidos fueron evaluados por qPCR, a partir de la amplificación de los fragmentos correspondientes a las citoquinas proinflamatorias seleccionadas y del gen de referencia GAPDH. Se tomaron los CT obtenidos de la reacción a partir del programa Eco Study Version 5.0, se calcularon los parámetros  $\Delta CT$  y  $2^{-\Delta CT}$  para el total de amplificaciones y se analizaron estadísticamente mediante GraphPad Prism 8.3.0, aplicando la prueba t de student ( $\alpha=0,05$ ) comparando cada protocolo de tratamiento respecto a la estimulación con LPS sin preincubación. El tratamiento de la línea con extracto de *Cannabis* a una concentración de 100  $\mu$ g/ml generó una diferencia significativa en la expresión de IL1 $\beta$  (\*,  $p<0,05$ ) e IL6 (\*,  $p<0,05$ ), resultando no significativo (ns) para TNF $\alpha$ . No se obtuvieron diferencias significativas al preincubar con extracto de *Cannabis* 10  $\mu$ g/ml: IL1 $\beta$  (ns), IL6 (ns), TNF $\alpha$  (ns). En cuanto al tratamiento con látex de *Croton urucurana*, la preincubación a 10  $\mu$ g/ml no dio lugar a diferencias significativas: IL1 $\beta$  (ns), IL6 (ns), TNF $\alpha$  (ns). La preincubación a 1  $\mu$ g/ml evidenció, de forma inesperada, una diferencia significativa del tipo proinflamatoria respecto al grupo LPS en la expresión de IL1 $\beta$  (\*,  $p<0,05$ ); las diferencias respecto a IL6 y TNF $\alpha$  resultaron no significativas. En conclusión, el extracto etanólico de *Cannabis sativa* presentó actividad antiinflamatoria en el modelo de células RAW 264.7 estimuladas con LPS, evidenciada por la disminución de la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 y es dosis dependiente. El látex de *Croton urucurana* no presentó actividad antiinflamatoria en el modelo de estudio.

# Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de extractos de *Cannabis sativa L.* y de látex de *Croton urucurana* por medio de PCR cuantitativa (qPCR)

## OBJETIVOS

**General:** Estudiar la capacidad antiinflamatoria de un extracto de *Cannabis sativa L.* y de látex de *Croton urucurana* *in vitro*.

### Particulares:

- Adquirir destrezas en técnicas de cultivos celulares.
- Determinar la concentración citotóxica de un extracto de *Cannabis sativa L.* y de látex de *Croton urucurana* *in vitro*.
- Analizar la expresión de citoquinas por RT-qPCR (ARNm) producidas por células RAW 264.7 (macrófagos de línea celular murina) expuestas al extracto y al látex.
- Adquirir conocimientos en los procesos relativos a la extracción de material genético, precauciones, condiciones de conservación, y en técnicas de retrotranscripción de ARN a ADNc.
- Profundización en conocimientos relativos al fundamento, requerimientos y limitaciones de la qPCR.
- Adquirir práctica en el uso de software para recopilación de los datos obtenidos de los productos de amplificación e interpretación de resultados con criterio científico.

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo. Se produce ante estímulos tanto externos como internos, incluyendo lesiones como cortes, quemaduras, corrosión por agentes químicos y biológicos, entre otros (Regalado Veloz & Sánchez Perera, 2015). Su activación induce la liberación de mediadores, citoquinas y quimiocinas que orquestan la infiltración celular en el tejido lesionado y llevan a la resolución de la inflamación y restauración del tejido (Maione et al., 2016). Sin embargo, respuestas inflamatorias prolongadas en el tiempo o excesivamente agresivas pueden ser perjudiciales para el huésped; muchos antiinflamatorios endógenos y mediadores funcionan para contrarrestar factores proinflamatorios y asegurar una correcta resolución de la inflamación (Perretti & D'Acquisto, 2009). El proceso inflamatorio puede distinguirse en dos etapas: la inflamación aguda, de duración breve, y la inflamación crónica, que se prolonga por semanas o meses. La primera puede evolucionar a una forma crónica, o bien esta última darse de forma insidiosa, asintomática (Regalado Veloz & Sánchez Perera, 2015). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades inflamatorias crónicas representan actualmente la mayor amenaza para la salud humana, previendo un aumento de su prevalencia en los próximos años (Ramirez Rodríguez et al., 2020). Si bien la inflamación representa la activación inicial del sistema inmune, bajo ciertas condiciones el organismo no es capaz de completar el ciclo agresión-recuperación y esta prosigue inapropiadamente, generando daño y promoviendo el desarrollo de enfermedades (Regalado Veloz & Sánchez Perera, 2015). En estos casos se vuelve necesario el uso de fármacos, siendo los principales los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), uno de los grupos de medicamentos más prescritos a nivel mundial a pesar de sus efectos adversos, entre los cuales la toxicidad gastrointestinal es el de presentación más frecuente (Süleyman et al., 2007). En este aspecto, el uso de plantas medicinales representa una alternativa para el alivio del dolor desde tiempos ancestrales (Avalos Capristan, 2016). La OMS define a la medicina tradicional como una sumatoria de conocimientos y prácticas basadas en creencias, teorías y experiencias propias a diferentes culturas, explicables o no, aplicadas para mantener un buen estado de salud, diagnosticar, prevenir, tratar enfermedades y estados físicos o mentales aplicando hierbas, preparaciones o productos preparados de estas con materiales vegetales, animales o minerales como principio activo (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Las plantas usadas en medicina tradicional poseen diversos mecanismos que explican su actividad antiinflamatoria, algunas ejercen su acción inhibiendo a diferentes niveles a las enzimas COX-1 y COX-2, importantes en la producción de mediadores químicos involucrados en la inflamación (Gómez Estrada et al., 2011; Regalado Veloz & Sánchez Perera, 2015). Otras ejercen su efecto por estabilización de membranas lisosomales (Morales León et al., 2018), como *Croton lechleri* y *Nectandra angustifolia*, cuyos extractos etanólicos demostraron en los trabajos realizados por Acostupa et. al. (2017) y Ferrini et. al. (2021), respectivamente, la reducción de la lisis de eritrocitos humanos en medio hipotónico (Acostupa et al., 2017; Ferrini et al., 2021). En casi todas las familias de plantas existen hierbas con actividad antiinflamatoria, algunas estudiadas ampliamente y otras con evidencia preliminar (Okoli et al., 2003). En la actualidad, la aplicación de la medicina tradicional en países de América latina y el Caribe representa una importante respuesta a las necesidades de atención en salud, a pesar de su presencia subordinada a los sistemas oficiales de salud y de la ilegalidad en que comúnmente operan (Nigenda et al., 2001). No obstante, a pesar de su extendido uso, existe aún escasa evidencia científica sobre la eficacia y seguridad de estos derivados, y la comprensión de sus mecanismos es limitada, restringiendo su incorporación a la práctica

clínica. Por ello, son necesarios estudios que permitan avalar su empleo en dosis y formas de administración en base a información científica (Regalado Veloz & Sánchez Perera, 2015).

*Cannabis sativa L.* es una planta dioica perteneciente a la familia *Cannabaceae* con gran capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales (Muscarà, Smeriglio, Trombetta, Mandalari, La Camera, Grassi, et al., 2021). Los metabolitos más abundantes de esta especie son los cannabinoides, de naturaleza terpenofenólica, que se concentran principalmente en la resina de los tricomas presentes en inflorescencias femeninas (López et al., 2014). El potencial terapéutico de *Cannabis sativa* ha sido ampliamente evaluado: en el tratamiento del glaucoma (Novack, 2016), de la epilepsia (Russo, 2017), del dolor crónico y como antiemético, entre otros (National Academies of Sciences Engineering and Medicine, 2017). Además de ser rica en compuestos biológicamente activos como terpenoides y flavonoides, se han identificado más de 100 tipos de cannabinoides (Bogdanović et al., 2017). De ellos, las propiedades farmacológicas del Δ9-tetrahidrocannabinol (THC), su principal psicodisléptico, y el cannabidiol (CBD) han sido las más investigadas (Lafaye et al., 2017). Diversos estudios han reportado la capacidad del CBD, no psicodisléptico, de contrarrestar efectos negativos del THC, con escasos o nulos efectos adversos (Niesink & van Laar, 2013). Actualmente, la especie *Cannabis sativa* se considera la única perteneciente a su género, pero es posible identificar diferentes quimiotipos según su composición relativa en cannabinoides (de Meijer, 2014), por lo que a pesar de los efectos psicotrópicos del THC, que han limitado su uso, la existencia de quimiotipos productores de cannabinoides no psicotrópicos como CBD y cannabigerol (CBG) representa un panorama prometedor (Smeriglio et al., 2018). Compuestos fenólicos y terpenoides también contribuirían a las propiedades biológicas, actuando sinérgicamente con los cannabinoides en sus actividades antiinflamatoria y antimicrobiana (Gallily et al., 2015, 2018; Iseppi et al., 2019; Pellati et al., 2018). El CBD es el cannabinoid más relevante desde el punto de vista farmacéutico; ha demostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, neuroprotectora, ansiolítica y anticonvulsivante (Esposito et al., 2007; Gaston & Szaflarski, 2018; Muscarà, Smeriglio, Trombetta, Mandalari, La Camera, Occhiuto, et al., 2021).

Las plantas del género *Croton* comprenden aproximadamente 800 especies, lo que lo convierte en el segundo con mayor abundancia de la familia *Euphorbiaceae* (Murillo, 1999). Es de distribución pantropical, con capacidad de desarrollo en ambientes muy diversos. Las especies de esta familia, que se presentan con una amplia variedad de morfologías y tamaños, poseen como característica común la generación de un exudado llamado látex (Barrera et al., 2016), un líquido viscoso de color sanguinolento y sabor astringente (Risco et al., 2001). Varias especies de este género reciben popularmente el nombre de "sangre de drago", y se reportan numerosos usos en la medicina tradicional. En su composición, se destaca la presencia de diterpenos tipo labdano, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides, que poseen un amplio rango de actividades biológicas. El término popular "sangre de drago" es utilizado también para describir el líquido exudado al rasgar la corteza de diversas especies vegetales tropicales, siendo las del género *Croton* las productoras de látex más representativas (Risco et al., 2001). Si bien *Croton lechleri* es la más estudiada de este género, *Croton urucurana*, que se desarrolla en nuestra región (Fontana, 1963), también es productora de sangre de drago. Las especies conocidas como sangre de drago se distribuyen desde países de América del Sur y América central hasta el sur de México (Barrera et al., 2016), y constituyen uno de los productos más utilizados a nivel popular en las zonas tropicales húmedas de Centro y Suramérica. Sus hojas han sido usadas como cicatrizante, por sus propiedades antiinflamatorias, antisépticas, hemostáticas, para tratar úlceras gastrointestinales y como anticancerígeno (Pieters et al., 1993; Tamariz Ortiz et al., 2013). El látex de *Croton urucurana* ha sido utilizado por sus efectos antiinflamatorios y analgésicos, así como para favorecer la cicatrización y para el tratamiento de heridas infectadas (Peres et al., 1997).

Numerosos modelos, *in vitro* e *in vivo*, han sido aplicados para la generación de evidencia sobre la actividad antiinflamatoria de plantas: edema plantar inducido por carragenina, lisis de glóbulos rojos inducido por medio hipotónico, granuloma inducido por pellet de algodón, por solo mencionar algunos ejemplos (Okoli et al., 2003). En modelos de inflamación tanto aguda como crónica, un número considerable de plantas exhiben efectos beneficiosos en el tratamiento de estados inflamatorios. La aplicación de técnicas de cultivo celular en el estudio de la actividad antiinflamatoria de extractos y compuestos aislados de plantas es una práctica que ha dado resultado en diversas investigaciones, como fue indicado en la revisión realizada por Azab et. al. (2016), que puso en evidencia cómo la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 ha permitido la evaluación de la actividad antiinflamatoria de numerosas especies y productos vegetales (Azab et al., 2016). Estas técnicas consisten en cultivar células dispersas de líneas definidas, o bien obtenidas de un tejido por disgregación, lo que constituye un cultivo primario. Como ventajas para el estudio de la función celular, permiten un control preciso de las condiciones fisicoquímicas (pH, temperatura, presión osmótica y atmósfera) y fisiológicas (composición nutricional del medio, metabolitos, hormonas y sustancias adicionales). Además, ofrecen una alternativa a las experiencias *in vivo* reduciendo el uso de animales de experimentación y su impacto (Burrell Bustos & Esteban Ruiz, 2009). Las células cultivadas proliferan por

ciclos de división hasta cubrir aproximadamente un 80% de la superficie del sustrato de cultivo, momento en el que se alcanza la confluencia. Para su mantenimiento, se transfieren a un nuevo recipiente y se debe renovar el medio de cultivo, lo que se denomina pasaje.

El equipamiento básico de un laboratorio de cultivo celular incluye un incubador de CO<sub>2</sub> que provee a las células de temperatura, humedad y atmósfera adecuadas, y un microscopio invertido para visualizar la morfología de las líneas. Exige también asegurar las condiciones de asepsia para reducir la probabilidad de contaminación del cultivo. Además, se necesitan sustratos de cultivo que proveen el anclaje que la mayoría de las líneas requiere para dividirse, medios de cultivo que aportan nutrientes y generalmente incluyen un indicador de pH (rojo fenol), suplementos adicionales como suero estéril e inactivado y antibióticos para reducir la probabilidad de contaminación microbiana. Algunas de las formulaciones más utilizadas son: Medio de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM por sus siglas en inglés; y RPMI, abreviatura de *Roswell Park Memorial Institute* (Burrell Bustos & Esteban Ruiz, 2009).

Dado al rol primordial de los macrófagos en la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios durante la respuesta inmune (Aye et al., 2019) y su difundido uso para la evaluación de la actividad antiinflamatoria de productos de origen vegetal (Azab et al., 2016; Ferrini et al., 2021) se seleccionó trabajar con la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 para realizar una evaluación de actividad antiinflamatoria. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antiinflamatoria de un extracto etanólico de *Cannabis sativa*, y de látex de *Croton urucurana* a través de una técnica de PCR cuantitativa (qPCR), mediante el análisis de su influencia en la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$  por la línea celular RAW 264.7 expuesta a un estímulo proinflamatorio de lipopolisacárido bacteriano (LPS).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del extracto de *Cannabis sativa L.*

El material vegetal constituido por inflorescencias, hojas y tallos, brindado por la Asociación Cannábica Correntina para la Investigación Medicinal (ACCIM) fue secado en estufa a 37°C y molido hasta ser reducido a un polvo homogéneo. Se vertió a un recipiente con cierre hermético y se añadió etanol 96° a temperatura ambiente. Se agitó manualmente, seguido de ultrasónico por 15 minutos, y se dejó macerar al abrigo de la luz durante 15 días. Transcurrido este tiempo, se filtró en Buchner y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio al vacío. El extracto seco se almacenó en desecador.

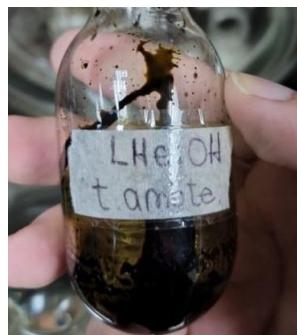


Figura 1: extracto de *Cannabis sativa* obtenido con etanol a temperatura ambiente y secado en evaporador rotatorio.

### Obtención del látex de *Croton urucurana*

El látex de *Croton urucurana* fue extraído por incisiones en la corteza de ejemplares adultos y recolección del exudado. Se transportó al laboratorio donde fue filtrado para eliminar restos de corteza, y se secó en evaporador rotatorio a presión reducida. El producto obtenido se reservó en frascos color caramelo.



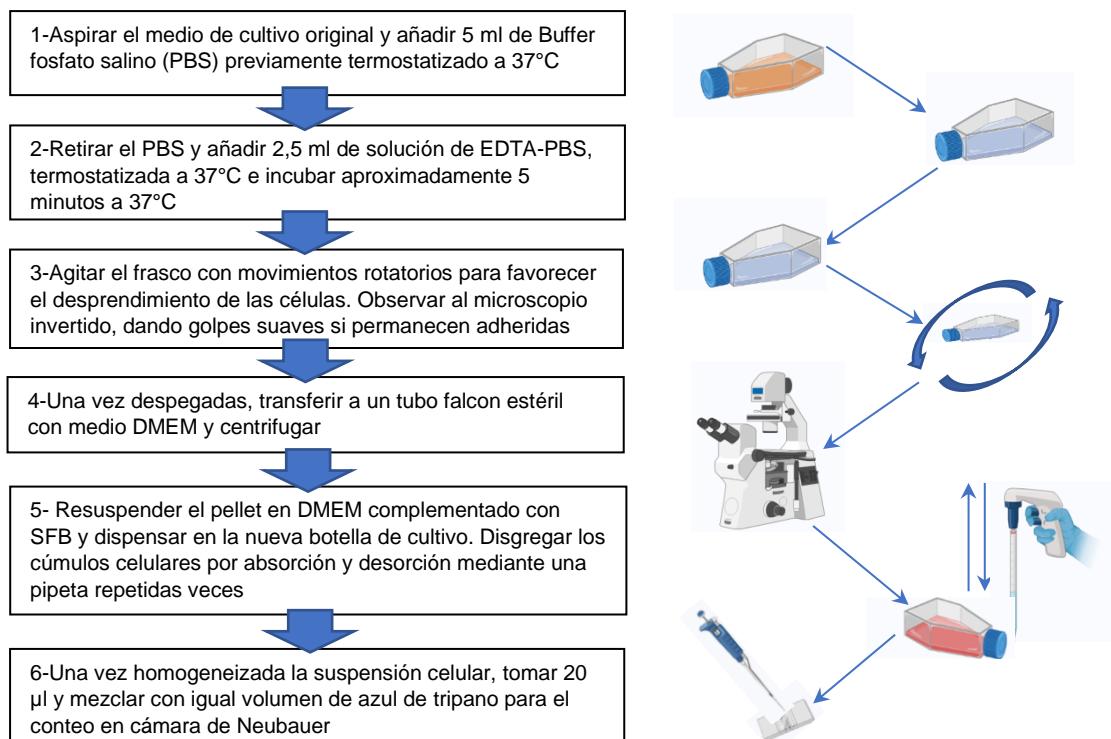
Figura 2: látex de *Croton urucurana* obtenido mediante laceraciones de la corteza, filtrado y evaporado.

### Cultivo de línea celular RAW 264.7

Las células de la línea RAW 264.7 (macrófagos murinos), conservadas a -80°C con dimetilsulfóxido (DMSO) fueron descongeladas. Se evaluó su viabilidad mediante cámara de Neubauer y tinción con azul de tripano, comparándola con el recuento indicado al momento de la congelación. Se transfirieron a una botella con medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y se incubaron en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Diariamente, las células se inspeccionaron en microscopio invertido para evaluar el desarrollo, viabilidad y características de la línea. El medio de cultivo se renovó cada 24 a 48 horas, de acuerdo al color desarrollado por el indicador de pH. Tras haberse alcanzado una confluencia de aproximadamente el 80% en la botella, se llevó a cabo la remoción de las células mediante una mezcla de buffer fosfato salino (PBS) con EDTA y se transfirieron a otro frasco de cultivo. Parte de la suspensión celular obtenida se utilizó para la búsqueda de *Mycoplasma* por una técnica de PCR convencional.

### Subcultivos de células adheridas y recuento celular

El procedimiento realizado, considerando un frasco de 25 cm<sup>3</sup>, se representa en la figura 3.



**Figura 3:** procedimiento realizado para el pasaje de la línea, que incluye el levantamiento de células, subcultivo y preparación de la suspensión para el recuento en cámara de Neubauer.

La suspensión con azul de tripano se cargó en cámara de Neubauer y se enfocó con el objetivo 10x el área correspondiente a cuadrículas divididas en 4x4 cuadrados, utilizadas habitualmente para el recuento de leucocitos. Se contaron las células no coloreadas, con membrana íntegra y por tanto viables. El valor obtenido de cada cuadrícula representa el número de células viables en 0,1 mm<sup>3</sup>. Se calculó la media del recuento de los 4 cuadrantes exteriores y se obtuvo el número de células por ml:

$$\text{Nº de células viables/ml} = \text{Media} \times 2 \times 10^4$$

En base al recuento, fue posible seleccionar los volúmenes a dispensar en cada sustrato de cultivo apropiado de acuerdo a los requerimientos de los ensayos aplicados a la línea.

### PCR convencional para detección de *Mycoplasma*

Una porción de la suspensión obtenida en el pasaje fue evaluada por PCR convencional para identificar la contaminación del cultivo con bacterias del género *Mycoplasma*. Su ADN fue extraído y purificado siguiendo las indicaciones del kit High Pure PCR Template Preparation® (Roche), representadas en la figura 4.

La reacción de PCR fue llevada a cabo a partir de tres masters mixes de marcas comerciales diferentes, lo que permitió una comparación de su rendimiento; Mix N°1: Reactivos ThermoFisher + Buffer ThermoFisher; Mix N°2: Reactivos Dongsheng + Buffer Dongsheng; Mix N°3: Reactivos ThermoFisher + Buffer GoTaq.

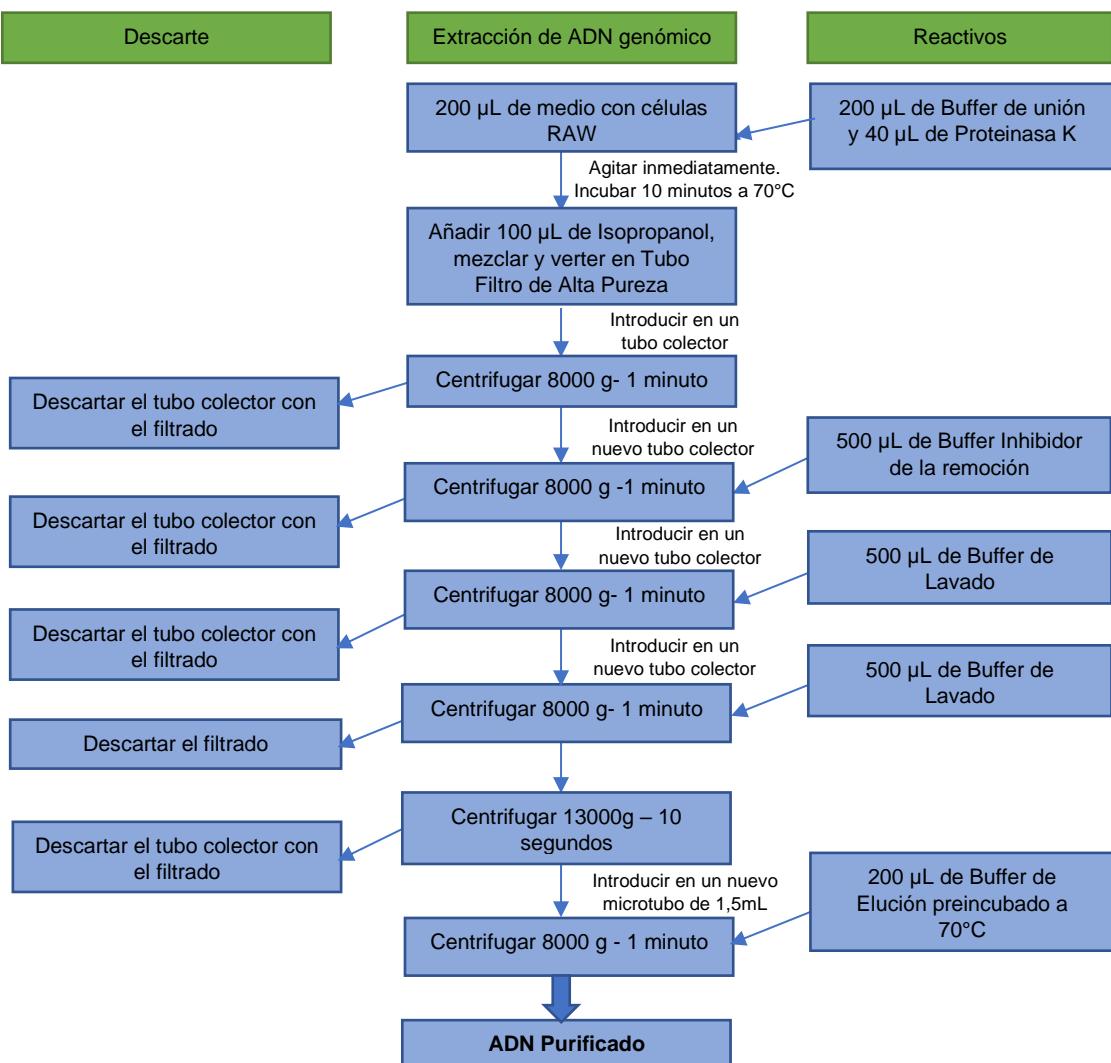


Figura 4: procedimiento de extracción de ADN, siguiendo indicaciones del fabricante (Roche).

En adición a la evaluación del ADN extraído de células RAW 264.7 cultivadas en esta práctica, se realizó la PCR sobre controles positivos de *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, y sobre un blanco de agua destilada. Las mezclas finales de reacción se introdujeron en el termociclador TC-3000 (TECHNE) y se ejecutó el programa Taq pol previamente configurado con las especificaciones indicadas en la figura 5. Los amplicones se preservaron a -80°C hasta el revelado por electroforesis en gel de agarosa.

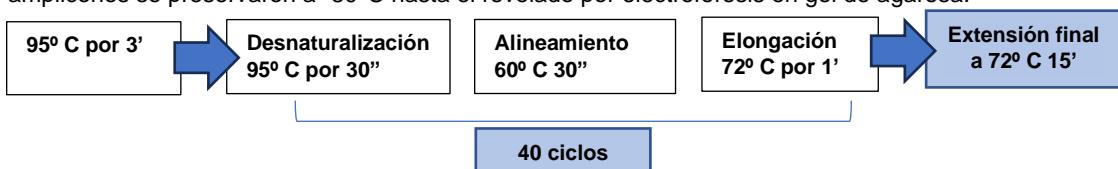


Figura 5: esquema del programa ejecutado por el termociclador modelo TC-3000 (TECHNE) para la obtención de productos de amplificación indicativos de la presencia de *Mycoplasma*.

Se preparó el gel de agarosa con adición del agente intercalante de ADN Diamond Red® (Promega) para el revelado con luz UV. Una vez solidificado, se transfirió a la cuba de electroforesis y se añadió buffer TBE 1x (tris borato EDTA) hasta su inmersión completa. Se sembraron en las calles correspondientes los productos de amplificación con su respectivo loading buffer. Se ajustó la diferencia de potencial a 100V y se realizó la electroforesis. Se reveló el resultado en transiluminador UV.

#### Concentración tóxica de extracto de *Cannabis sativa* y látex de *Croton urucurana* por ensayo de XTT TACS®

La concentración tóxica del extracto de *Cannabis* del látex de *Croton* se determinó por un ensayo de XTT de viabilidad y proliferación celular (TACS® XTT Cell Proliferation Assay). El fundamento de este consiste en el uso de una sal de tetrazolio conocida como XTT para evaluar la proliferación, viabilidad y citotoxicidad

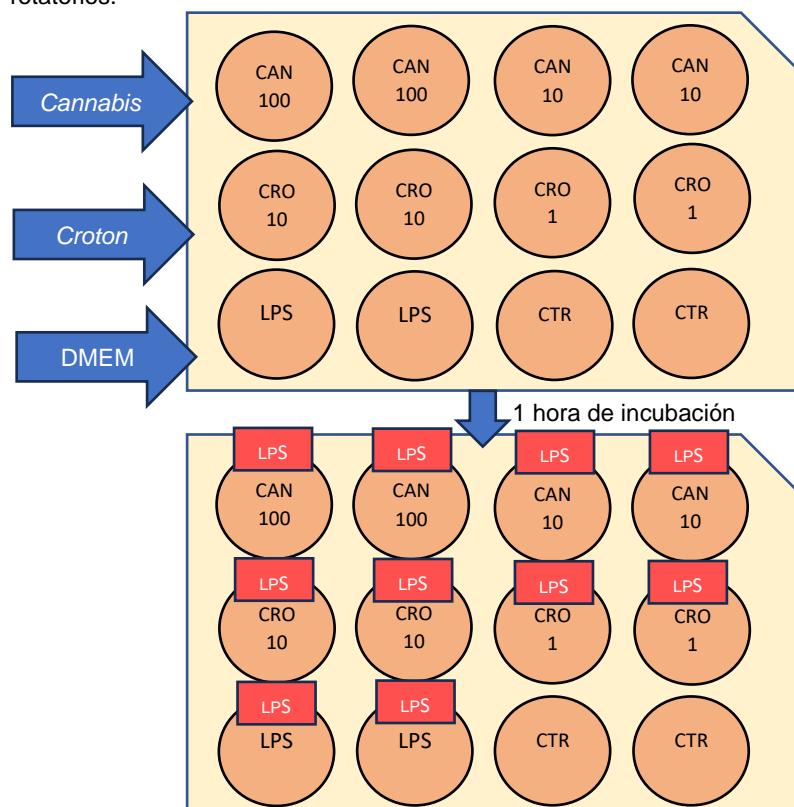
celular en multiplacas. Las células metabólicamente viables en cada pocillo producen el clivaje del XTT generando formazan, reacción que requiere del activador fenazina metasulfato (PMS). Se evidencia por la intensificación del color naranja en los pocillos, que puede medirse por su absorbancia a 490 nm.

Para este ensayo se utilizó una multiplaca de 96 pocillos. Siguiendo las indicaciones del protocolo incluido en el kit de reactivo, se depositaron de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^5$  células/ml en cada pocillo. Para ello se tomó 0,505 ml de la suspensión celular en la que se estimó una cantidad de 1.105.000 células/ml, se llevó a un volumen de 14 ml con medio DMEM complementado con SFB y se transfirió a cada pocillo un volumen de 200  $\mu$ l de esta dilución, con lo que se depositaron aproximadamente 8.000 células en cada uno. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Previamente a la estimulación con *Cannabis sativa* y *Croton urucurana*, se corroboró el buen estado de las células adheridas y la ausencia de contaminación microbiana.

Se prepararon las soluciones madre de extracto de *Cannabis* y *Croton* ajustándolas a una concentración de 1000  $\mu$ g/ml con medio DMEM complementado con SFB 10%. Estas se diluyeron igualmente en medio DMEM complementado hasta lograr las concentraciones de trabajo seleccionadas para el ensayo de citotoxicidad de ambos productos: 200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml, 12,5  $\mu$ g/ml y 6,3  $\mu$ g/ml. En adición, se realizó un ensayo de XTT ampliado para el látex de *Croton urucurana*, ajustando las concentraciones a un rango reducido y con menor intervalo de variación entre sí: 60  $\mu$ g/ml; 50  $\mu$ g/ml; 40  $\mu$ g/ml; 30  $\mu$ g/ml; 25  $\mu$ g/ml; 20  $\mu$ g/ml; 15  $\mu$ g/ml; 10  $\mu$ g/ml. Las células RAW 264.7 se estimularon con extracto de *Cannabis* y látex de *Croton* durante 24 horas, a 37°C y con 5% CO<sub>2</sub>, tiempo luego del cual se añadió el reactivo XTT con PMS según indicaciones del fabricante. La mezcla final se incubó por 4 horas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Se leyó la absorbancia a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm. El ensayo fue realizado por triplicado para cada concentración de ambos productos y para el blanco de reacción.

#### qRT PCR

Se realizó el recuento de las células presentes en una botella de cultivo aplicando azul de tripano según el procedimiento indicado previamente, obteniendo un valor de 2.100.000 células/ml. Se tomaron 1,3 ml de la suspensión y se diluyeron al 1/10 en medio DMEM complementado con SFB. Se transfirió la suspensión a una placa de 12 pocillos, depositando aproximadamente 273.000 células en cada uno de ellos. Se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> antes de iniciar la estimulación. Se removió el medio de cultivo de la multiplaca de 12 pocillos previamente incubada y se lavaron las células con solución PBS y movimientos rotatorios.



**Figura 6:** distribución de protocolos de estimulación por duplicado en placa de 12 pocillos. CAN: estimulación con *Cannabis*; CRO: estimulación con *Croton*; LPS: Lipopolisacárido; CTR: Control. Los valores 100,10 y 1 representan la concentración final en  $\mu$ g/ml a la que la línea celular fue expuesta.

Se añadieron a los pocillos correspondientes extracto de *Cannabis sativa* (indicados como CAN) y látex de *Croton urucurana* (indicados como CRO) a las concentraciones de tratamiento seleccionadas a partir del ensayo XTT: 100 µg/ml y 10 µg/ml para *Cannabis*; 10 µg/ml y 1 µg/ml para *Croton*. En los pocillos indicados como LPS y CTR se añadió únicamente DMEM complementado en igual volumen. La distribución de los protocolos de estimulación en la placa se indica en la figura 6; cada uno de ellos se realizó por duplicado.

Transcurrida 1 hora de preincubación en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, se añadió LPS (concentración final de 1 µg/ml) como estímulo proinflamatorio a los pocillos correspondientes: CAN100, CAN10, CRO10, CRO1 y LPS. En los pocillos CTR, las células permanecieron sin estimulación por compuestos exógenos. Las células se incubaron durante 8 horas en estufa a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se detuvo la estimulación aspirando el medio y lavando con PBS, agitando suavemente con movimiento rotatorios.

Se transportó la multiplaca cubierta a campana de extracción, se añadió a cada pocillo 500 µl del reactivo *TRI Reagent®* (Sigma Aldrich), que permitió la solubilización de material biológico y desnaturalización de proteínas. Se homogeneizó la suspensión en el reactivo *TRI®* mediante micropipeta, raspando el fondo de los pocillos hasta lograr un adecuado contacto con la totalidad de las células. Finalmente, se transfirió el material a tubos eppendorf, se identificaron adecuadamente y reservaron a -80°C. El ARN se separó posteriormente siguiendo las indicaciones del fabricante: se añadieron 0,1 ml de Cloroformo, se agitó vigorosamente 15 segundos y se dejó reposar por 3 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos, observándose la separación de 3 fases (figura 7).



**Figura 7:** separación de fases obtenida con *Tri Reagent®*. La fase inferior, coloreada, contiene proteínas. El ARN extraído es retenido en la fase acuosa superior. El ADN permanece en la interfase.

La fase acuosa fue transferida a otro tubo eppendorf. En este, se precipitó el ARN mediante el agregado de isopropanol, se homogeneizó y se dejó reposar 10 minutos para favorecer el proceso. Se centrifugó a 12000 g por 10 minutos, observándose el depósito del ARN precipitado. Se lavó el precipitado con 0,5 ml de etanol al 75%, se agitó con vórtex y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado 10 minutos. El ARN se disolvió en 40 µl de agua DEPC (con dietil pirocarbonato). Se diluyeron 10 µl de esta solución en 390 µl de agua (1/40). Se midió absorbancia a 260 nm y 280 nm para obtener la concentración y evaluar la pureza del ARN extraído.

El ARN obtenido fue retrotranscrito a ADN copia (ADNc) por medio de una retrotranscriptasa del virus de leucemia murina de Moloney (MMLV, por sus siglas en inglés) de Sigma Aldrich. Los volúmenes necesarios de cada ARN extraído tras la estimulación fueron ajustados en base a su concentración medida a 260 nm, lo que aseguró la obtención de cantidades equivalentes de ADNc para todos los ensayos. Se prepararon las mezclas de reacción RT1 y RT2, cuyos componentes se indican en tabla 1.

**Tabla 1:** reactivos utilizados para retrotranscripción del ARNm extraído.

RT1	RT2
oligoDT DPEC	Volumen dispensado por reacción: 3,5 µl MMLV Buffer MMLV RNAsa out dNTPs DPEC

Se transfirieron RT1 y RT2 a tubos eppendorf de 200 µl. El volumen final de reacción en cada tubo fue de 25 µl; 11,5 µl consistieron en una dilución en H<sub>2</sub>O DEPC del ARN extraído, ajustada para lograr la adición de 1 µg de ARN a cada mezcla de reacción. La determinación de estos volúmenes se resume en la tabla 2. Las concentraciones fueron calculadas considerando la equivalencia dada por Shen (2019) que establece que un valor de absorbancia=1, medida a 260nm, equivale a 40 mg/l de ARN (Shen, 2019).

**Tabla 2:** ajuste de concentración de ARN para retrotranscripción. La columna “Vol. ARN” indica las cantidades tomadas de cada solución de ARN. La columna “H<sub>2</sub>O” indica los volúmenes faltantes para alcanzar el volumen de 25 µl. Tto: Tratamiento. A: Absorbancia.

Tto	A 260	Cc ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	Vol. ARN (1/Cc) ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)	Tto	A 260	Cc ( $\mu$ g/ $\mu$ l)	Vol. ARN (1/Cc) ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O ( $\mu$ l)
CTR	0,265	0,424	2,358	9,14	CAN 10	0,124	0,1984	5,04	6,46
CTR	0,178	0,2848	3,511	7,99	CAN 10	0,283	0,4528	2,208	9,29
LPS	0,093	0,1488	6,72	4,78	CRO 10	0,216	0,3456	2,894	8,61
LPS	0,265	0,424	2,358	9,14	CRO 10	0,244	0,3904	2,561	8,94
CAN 100	0,202	0,3232	3,094	8,41	CRO 1	0,162	0,2592	3,858	7,64
CAN 100	0,281	0,4496	2,224	9,28	CRO 1	0,056	0,0896	11,161	0,34

Dado el uso de oligo-dT como primer de la reacción, se obtuvo ADNc del total del ARN con terminaciones poliA (ARNm) expresado en la línea como resultado de los protocolos de estimulación aplicados.

A partir del ADNc obtenido, se llevó a cabo la reacción de qPCR con el objetivo de evaluar la expresión de citoquinas por la línea murina RAW 264.7 como respuesta a los tratamientos aplicados. Se evaluaron los ADNc de 3 citoquinas íntimamente involucradas en la respuesta inflamatoria aguda: Interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ); Interleucina 6 (IL6) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). También se realizó la PCR en tiempo real sobre el ADNc de un gen housekeeper, en este caso Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), de expresión constante e independiente de los protocolos de estimulación. La comparación de la cantidad amplificada de ADNc de las citoquinas proinflamatorias respecto a este permitió evaluar la expresión relativa de estos genes bajo los diferentes protocolos de estimulación.

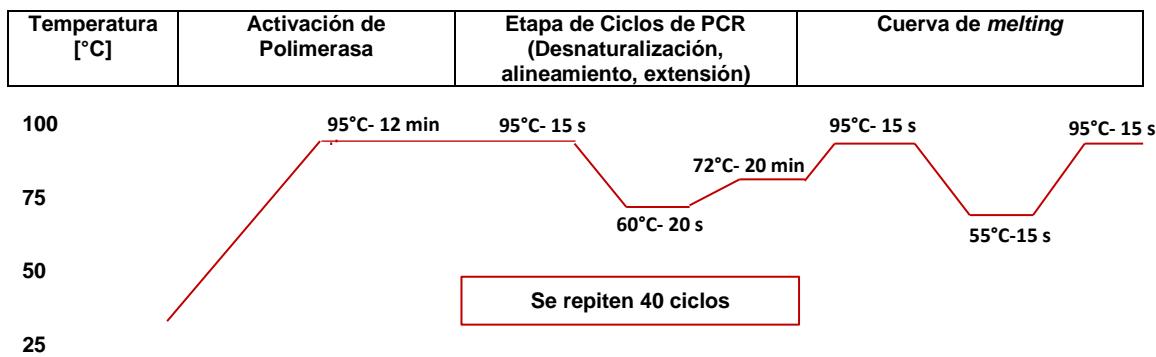
La mezcla de reactivos necesarios para la reacción de amplificación en tiempo real de cada ADNc se preparó de forma separada para cada citoquina. Estas incluyeron, en todos los casos: Master mix, primers (F y R) y H<sub>2</sub>O miliQ (ultrapura). Los volúmenes necesarios de los constituyentes de cada mezcla se ajustaron para poder producir la qPCR de los doce protocolos de estimulación aplicados a la línea. Se utilizó como soporte de reacción una placa de qPCR de 48 pocillos. Se dispensaron las 4 mezclas en sus 12 pocillos correspondientes, con lo que se evaluó la expresión por duplicado de cada gen como consecuencia de los tratamientos definidos: CAN100, CAN10, CRO10, CRO1, LPS y CTR. Finalmente se agregó en cada pocillo una dilución 1/4 del ADNc obtenido de la estimulación correspondiente, diluyendo su concentración de 40 ng/ $\mu$ l a 10 ng/ $\mu$ l, con lo que se añadieron 40 ng de ADNc en cada uno. La distribución de las qPCR para cada gen y condición de estimulación en la placa se representa en la figura 8.

	CTR	CTR	LPS	LPS	CAN100	CAN100
GAPDH	O	O	O	O	O	O
TNF	O	O	O	O	O	O
IL1	O	O	O	O	O	O
IL6	O	O	O	O	O	O
	CAN10	CAN10	CRO10	CRO10	CRO1	CRO1
GAPDH	O	O	O	O	O	O
TNF	O	O	O	O	O	O
IL1	O	O	O	O	O	O
IL6	O	O	O	O	O	O

Figura 8: distribución de reacciones de amplificación en placa de qPCR de 48 pocillos

Se ubicó la placa en el equipo Eco<sup>TM</sup>-Illumina. Se seleccionó el programa de trabajo cuya secuencia se resume en la figura 9, y en la interfaz se identificaron los pocillos de reacción para la posterior interpretación de los resultados obtenidos de cada tratamiento. Finalmente, se dio inicio a la reacción.

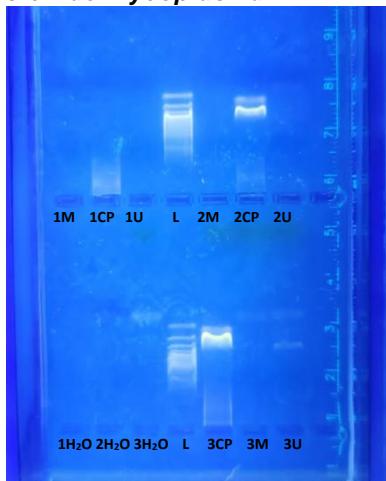
Los datos obtenidos por el equipo fueron recuperados, analizados e interpretados inicialmente por medio del software EcoStudy Versión 5.0.4890 (© 2011-2013 Illumina), donde se evaluaron las curvas de las reacciones de amplificación, las curvas de melting para la identificación de amplificaciones inespecíficas, y se obtuvieron los valores para el cálculo de  $\Delta\Delta CT$  mediante una planilla de cálculo (Microsoft Excel) y la aplicación del criterio  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism® 8.3.0 a través de la prueba t de student, que permitió detectar diferencias significativas en la expresión de las citoquinas evaluadas como resultado de la aplicación de los diferentes tratamientos.



**Figura 9:** ciclos de temperatura programados en el equipo Eco™-Illumina para la ejecución de la qPCR. El proceso inicia con una elevación a 95°C para la activación de la polimerasa, seguido de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, alineamiento y extensión), finalizando en una curva de melting.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### PCR convencional para detección de *Mycoplasma*

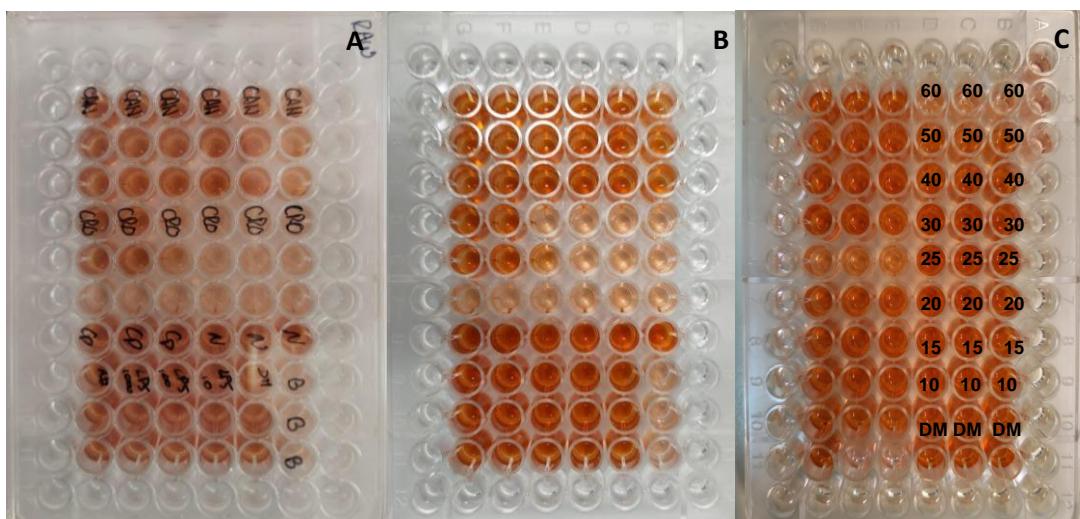


**Figura 10:** electroforesis en gel de agarosa de productos de amplificación obtenidos por PCR convencional con diferentes combinaciones de reactivos. M: Muestra; CP: Control positivo de *Mycoplasma*; U: Control positivo de *Ureaplasma*; H2O: Control de agua destilada.

La utilización de mixes de diversas marcas comerciales permitió comparar los rendimientos de reacción y observar la presencia del producto de amplificación esperado para el control positivo de *Mycoplasma* (CP) de 280 pb, así como su ausencia en las calles correspondientes a las células RAW 264.7 cultivadas en el desarrollo de esta práctica (M), concluyendo que estas no se encontraban contaminadas con *Mycoplasma* al momento de la extracción de ADN. El amplicón esperado de 280 pb para el control positivo de *Mycoplasma* no pudo ser revelado con el mix N°1 (reactivos y buffer ThermoFisher), por lo que este resultado no pudo ser validado. Por el contrario, la banda correspondiente pudo apreciarse en las calles asignadas a los productos de amplificación obtenidos por los mixes N° 2 y 3 (figura 10), correspondientes a reactivos y buffer DongSheng y reactivos ThermoFisher con Buffer Gotaq, respectivamente.

### Ensayo de Citotoxicidad por XTT

Cumplidas las 4 horas de incubación con el reactivo XTT, la coloración final generada en cada pocillo se presenta en la figura 11, donde se identifican las concentraciones de extracto y látex aplicadas, respectivamente. Mediante un lector de microplacas se obtuvo la absorbancia a 490 nm, con 630 nm como longitud de onda de referencia. Para obtener los porcentajes de viabilidad se adoptó como 100% la media de las absorbancias medidas en los pocillos DM (células viables no estimuladas), cuyo valor fue de 1,461. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.



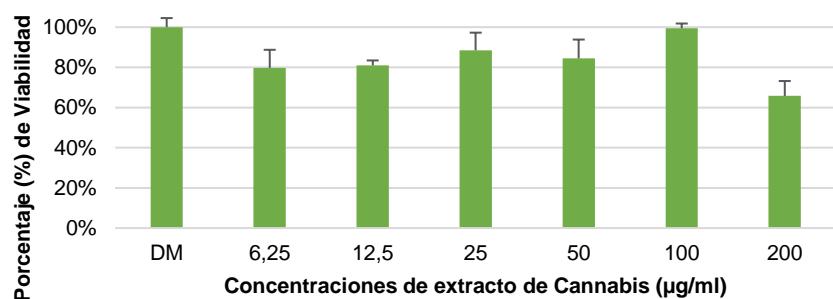
**Figura 11:** ensayo de XTT de extracto de *Cannabis*y látex de *Croton*. **A:** se indica el tratamiento aplicado a la línea celular: CAN: *Cannabis*; CRO: *Croton*; B: Blanco, sin células; DM: Control de medio DMEM. **B:** Se observa el resultado de la reacción, la viabilidad celular se correlaciona con la intensidad del color generado en cada pocillo. **C:** ensayo ampliado de XTT de *Croton urucurana*. Se aplicó por triplicado para cada concentración en los pocillos indicados. Los valores presentados indican la concentración ensayada en  $\mu\text{g/ml}$ . DM: Control de medio DMEM.

**Tabla 3:** porcentaje (%) de viabilidad de células estimuladas. Se indica la viabilidad obtenida post exposición a diferentes concentraciones de extracto de *Cannabis*y látex de *Croton* con tres repeticiones y su media.

Muestra	Concentración de extracto ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	6,25	12,5	25	50	100	200
<b><i>Cannabis1</i></b>	91%	79%	89%	76%	97%	66%
<b><i>Cannabis2</i></b>	80%	80%	77%	80%	98%	56%
<b><i>Cannabis3</i></b>	69%	84%	99%	98%	103%	74%
<b>Media <i>Cannabis</i></b>	80%	81%	88%	84%	99%	66%
<b>DS <i>Cannabis</i></b>	9%	3%	9%	9%	2%	7%
<b><i>Croton 1</i></b>	55%	76%	1%	1%	1%	1%
<b><i>Croton 2</i></b>	87%	86%	22%	0%	1%	1%
<b><i>Croton 3</i></b>	-	-	1%	0%	1%	1%
<b>Media <i>Croton</i></b>	71%	81%	8%	0%	1%	1%
<b>DS <i>Croton</i></b>	16%	5%	10%	0%	0%	0%

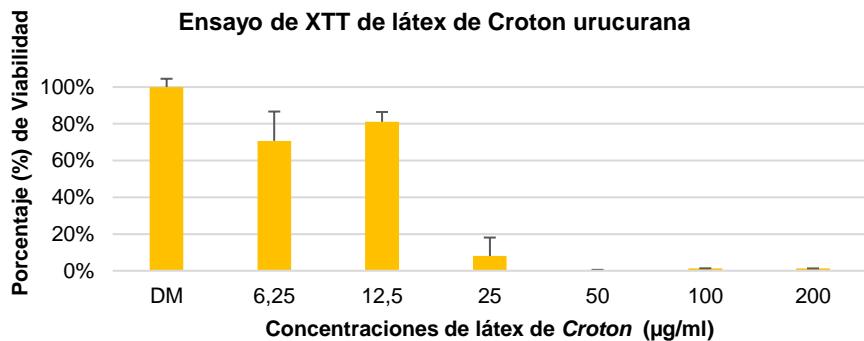
Se presentan las viabilidades obtenidas por el tratamiento con extracto de *Cannabis*en la figura 12. Se estableció 100  $\mu\text{g/ml}$  como concentración máxima de trabajo para la reacción de qPCR, ya que fue la mayor concentración probada que no evidenció cambios significativos en la viabilidad de la línea celular.

#### Ensayo de XTT de extracto de *Cannabis sativa*

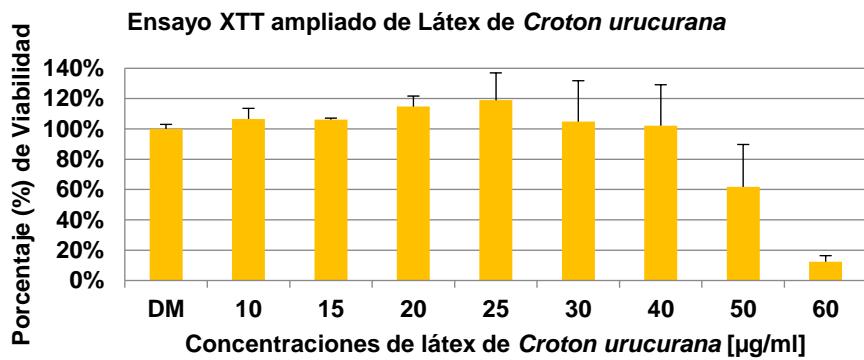


**Figura 12:** porcentaje de viabilidad obtenido por XTT para diferentes concentraciones de extracto *Cannabis sativa*.

Los porcentajes de viabilidad obtenidos para el látex de *Croton* resultaron menores en comparación a los obtenidos de *Cannabis* a las mismas concentraciones, con una súbita caída de la viabilidad a 0% a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  en el ensayo inicial, como se aprecia en la figura 13. Las menores concentraciones del ensayo, 12,5  $\mu\text{g/ml}$  y 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , dieron lugar a viabilidades del 81% y 71%, respectivamente. Por ello, se realizó un ensayo ampliado de XTT para *Croton urucurana* con un rango de concentraciones entre 10 y 60  $\mu\text{g/ml}$ , a fin de determinar la máxima concentración que altere significativamente la viabilidad de la línea celular (figura 14).



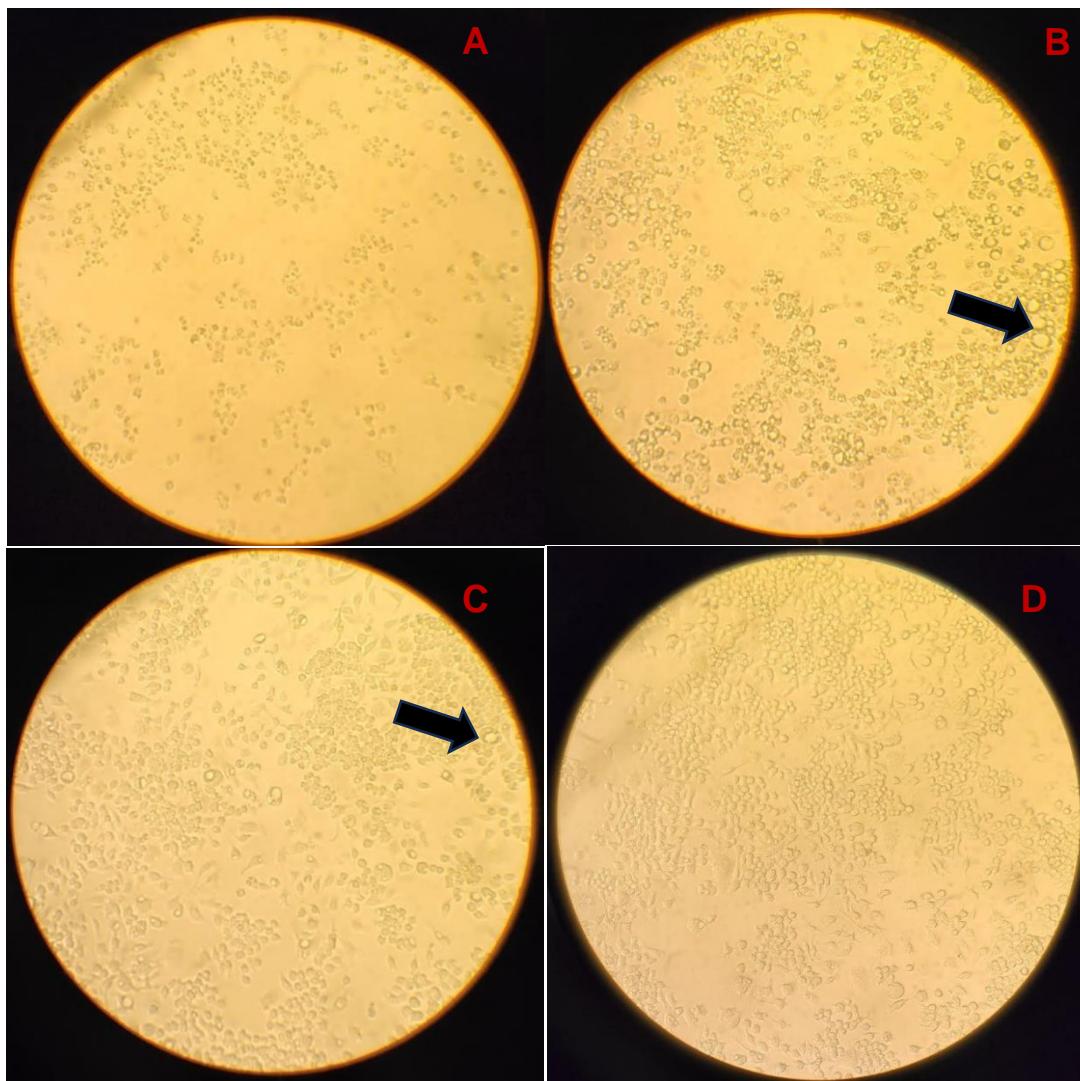
**Figura 13:** porcentaje de viabilidad obtenido por XTT a diferentes concentraciones de látex de *Croton urucurana*.



**Figura 14:** porcentajes de viabilidad obtenidos del ensayo de XTT ampliado para *Croton urucurana*.

La viabilidad de las células ante el reactivo XTT permitió definir una concentración no tóxica para extracto de *Cannabis sativa* de 100  $\mu\text{g/ml}$ , y no se observó una relación de dependencia entre dosis y toxicidad a concentraciones menores a 100  $\mu\text{g/ml}$ . En el caso de *Croton urucurana*, para el que se realizó un ensayo ampliado debido a los resultados iniciales, la dosis tóxica fue definida considerando el ensayo de XTT y la observación microscópica, dado que esta permitió apreciar un efecto citopático sobre la línea celular en concentraciones mayores a 15  $\mu\text{g/ml}$  (figura 14), a pesar de que en el segundo ensayo de XTT la exposición a una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  no generó una reducción significativa de la viabilidad celular. Este efecto citopático producido por la exposición a látex de *Croton urucurana* sobre la línea RAW 264.7 tras 24 horas de exposición se presentó como una formación citoplasmática de aspecto vacuolar (figura 15).

Este presentó variaciones de acuerdo a la concentración aplicada. La alteración fue apreciable a concentraciones mayores a 15  $\mu\text{g/ml}$ , alcanzando su expresión máxima a 50  $\mu\text{g/ml}$ , donde se observaron numerosas estructuras de aspecto vacuolar, voluminosas, junto con alteración morfológica y lisis, como se observa en la figura 15. A concentraciones mayores hubo una extensa lisis celular. El efecto citopático se redujo progresivamente en magnitud y frecuencia a lo largo de la población celular en concentraciones menores, lo que fue notable a los 20  $\mu\text{g/ml}$ . Las alteraciones morfológicas no se presentaron a concentraciones menores a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Dadas estas observaciones, en conjunto con los ensayos de XTT, las condiciones de tratamiento aplicadas para evaluar la actividad antiinflamatoria del látex por qPCR se seleccionaron considerando una baja toxicidad celular y ausencia de efecto citopático, dando como resultado la elección de concentraciones menores o iguales a 10  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 15:** línea RAW 264.7 tratada con látex de *Croton urucurana*, incubación de 24 horas. Magnificación total utilizada para las fotografías 40x. A: concentración 60 µg/ml. B: concentración 50 µg/ml. C: concentración 20 µg/ml. D: concentración 15 µg/ml. Las estructuras vacuolares observadas se indican con flechas negras.

#### qRT PCR

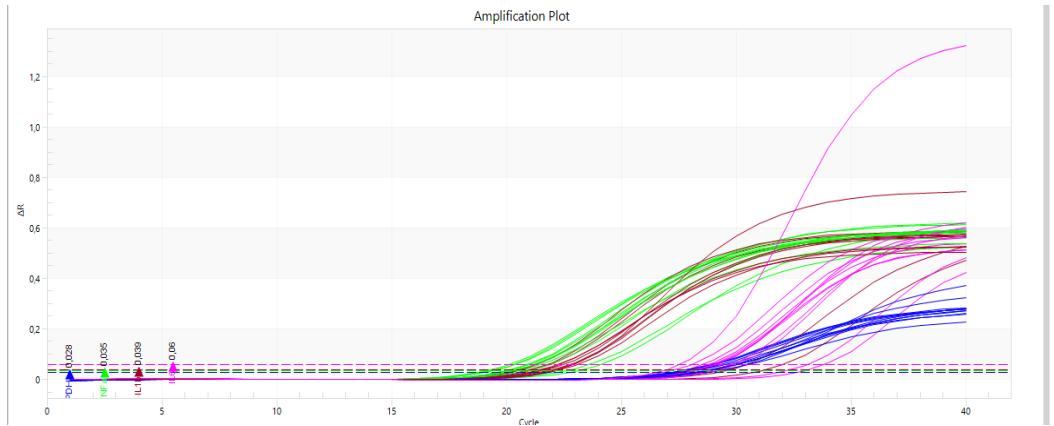
Como se indica en el resumen de la tabla 5, las relaciones de absorbancias 260/280 obtenidas para la totalidad de los ARN extraídos fue mayor a 1,7, lo que indicó una adecuada pureza para todos los protocolos de estimulación aplicados a la línea celular.

**Tabla 5:** relación de absorbancias 260/280 de las extracciones de ARN. A: Absorbancia; Tto: Tratamiento; Cc: Concentración; CTR: Control; LPS: Lipopolisacárido; CAN: Cannabis; CRO: *Croton*. Los valores indicados junto a estas siglas indican las concentraciones en µg/ml aplicadas a la línea.

Tto	A 260 nm	A 280 nm	A260/A280	Cc (µg/ml)	Tto	A 260 nm	A 280 nm	A260/A280	Cc (µg/ml)
CTR 1	0,265	0,151	1,75	0,424	CAN 10	0,124	0,062	2	0,1984
CTR 2	0,178	0,093	1,91	0,2848	CAN 10	0,283	0,164	1,73	0,4528
LPS 1	0,093	0,038	2,45	0,1488	CRO 10	0,216	0,123	1,76	0,3456
LPS 2	0,265	0,144	1,84	0,424	CRO 10	0,244	0,137	1,78	0,3904
CAN 100	0,202	0,106	1,91	0,3232	CRO 1	0,162	0,095	1,71	0,2592
CAN 100	0,281	0,165	1,7	0,4496	CRO 1	0,056	0,026	2,15	0,0896

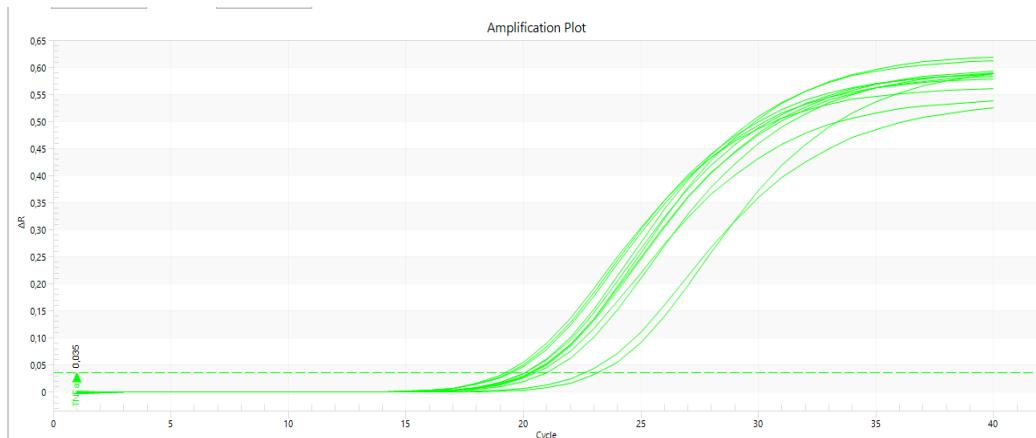
#### PCR cuantitativa (qPCR)

Los resultados de la PCR en tiempo real aplicada sobre los ADNc de IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$  y GAPDH fueron registrados por el equipo Eco<sup>TM</sup>-Illumina. Se evaluaron por medio del software Eco Study Version 5.0. Las curvas de amplificación obtenidas, identificadas con diferentes colores según la citoquina correspondiente, se presentan en la figura 16, y representan el curso de la reacción en cada pocillo de la placa de qPCR. Se observa que las curvas de amplificación de GAPDH, indicadas en color azul, se encuentran agrupadas, lo que es esperable para la elección de un gen de referencia cuya expresión se asume constante.



**Figura 16:** curvas de amplificaciones obtenidas para los 48 pocillos de reacción. El color de cada una indica el ADNc amplificado. Azul: GAPDH; verde: TNF- $\alpha$ ; Rojo: IL-1 $\beta$ ; Rosa: IL-6.

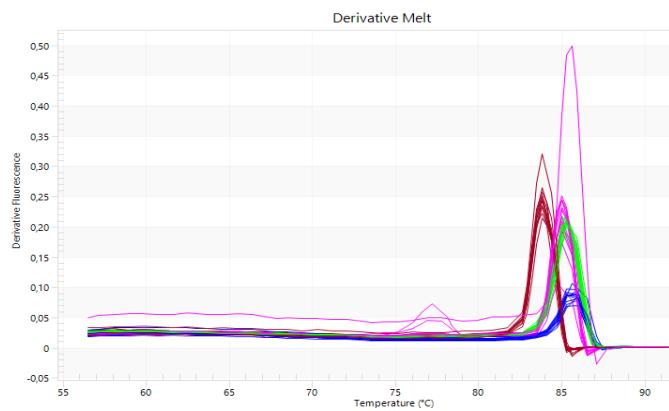
Se evaluaron las curvas de reacción trazadas para cada ADNc. En la figura 17, se presentan las generadas para la amplificación de TNF- $\alpha$ . Cada una de las doce curvas trazadas representa la amplificación del ADNc obtenido de un protocolo de tratamiento diferente.



**Figura 17:** curvas de amplificación de TNF- $\alpha$ , citoquina proinflamatoria. Se aprecia la diferencia en los ciclos de amplificación en dos de ellas, correspondientes a los pocillos CTR, no estimulados.

En las curvas de amplificación de los restantes ADNc se corroboró la ocurrencia de un retraso en la amplificación producida en los pocillos CTR, como se refleja en la figura 17. En adición a la observación del avance de la reacción en función de los ciclos ejecutados, se extrajeron los datos de Ct de todas las amplificaciones a partir del software Eco Study Version 5.0., con los que se obtuvieron los valores de  $\Delta Ct$  para el posterior análisis estadístico de los resultados.

Las curvas de *melting* fueron evaluadas para la detección de amplificaciones inespecíficas. Como es esperable, la temperatura de *melting* fue variable para cada ADNc amplificado de acuerdo a sus diferencias en tamaño y composición (figura 18). Se comprobó la presencia de picos de desnaturización a una temperatura homogénea para IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y GAPDH. En el caso de IL6 (rosa), se observó la ocurrencia de más de un pico en dos pocillos de reacción, indicativo de probables amplificaciones inespecíficas.



**Figura 18:** curvas de melting superpuestas de GAPDH (azul), IL-1 $\beta$  (rojo), IL-6 (rosa) y TNF- $\alpha$  (verde). Los picos de desnaturación se acumulan a una temperatura relativamente constante para cada ADNc.

Los cálculos aplicados para la obtención del  $\Delta\Delta Ct$  se representan en la figura 19. En primera instancia se obtuvo el valor de  $\Delta Ct$  a partir de la diferencia del  $Ct$  de cada amplificación respecto al promedio de los  $Ct$  del gen de referencia GAPDH correspondiente a su mismo protocolo de estimulación. Para obtener posteriormente el  $\Delta\Delta Ct$ , se calculó la diferencia entre este primer  $\Delta Ct$  y un segundo  $\Delta Ct$ , que proviene de la resta del  $Ct$  de los pocillos CTR de cada ADNc amplificado respecto al promedio de los  $Ct$  del gen de referencia en los pocillos CTR. Con estas operaciones matemáticas, se normalizó la evaluación de la expresión respecto a un protocolo de estimulación elegido como referencia: CTR, y respecto a un gen de referencia: GAPDH. Como resultado, el valor obtenido a través del cálculo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para cada reacción de amplificación del ADNc representa la expresión relativa de la citoquina evaluada respecto al gen de referencia (GAPDH) y respecto a una muestra control (a partir del segundo  $\Delta Ct$ ). Los parámetros obtenidos de la reacción y los cálculos correspondientes para cada uno de ellos se presentan en las tablas 6 y 7.

**Normalización al gen endógeno:**

$$Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ gen endógeno} = \Delta Ct$$

**Normalización a la muestra de referencia o calibrador:**

$$\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ Calibrador} = \Delta\Delta Ct$$

**Aplicación de la fórmula:**  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

**Figura 19:** cálculo de  $\Delta Ct$  y de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para el análisis estadístico de las reacciones de amplificación. Adaptado de “matemática de la qPCR”, del curso “Diseño, ejecución y reporte de experimentos de retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)”, Dr. Luciano D’Attilio.

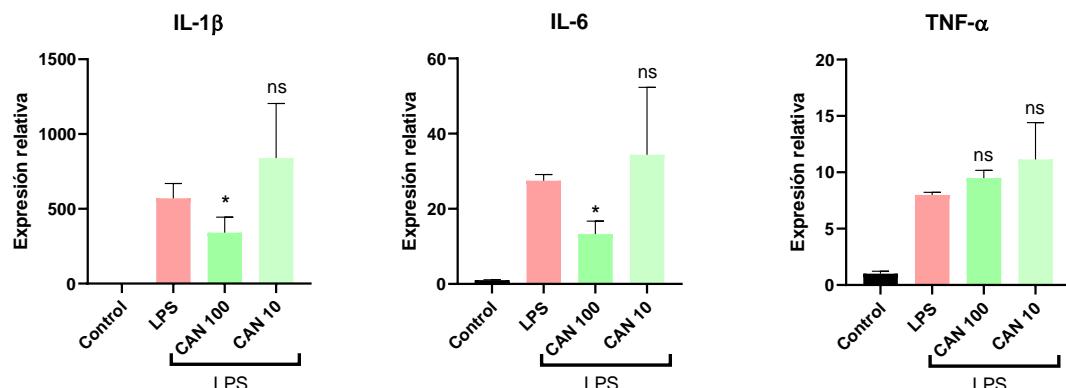
**Tabla 6:**  $Ct$ ,  $\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct$  y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenidos para los protocolos de estimulación CTR, LPS y CAN 100 por duplicado.

Tratamiento	Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Media	DS	Tratamiento	Gen	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Media	DS
CTR	GAPDH	1,0000	-	-	LPS	IL-6	26,3235	27,4742	1,1506
CTR	GAPDH	1,0000	-	-	LPS	IL-6	28,6248		
CTR	TNF $\alpha$	1,1664	1,0119	0,1545	LPS	IL-1 $\beta$	471,7279	570,3909	98,6630
CTR	TNF $\alpha$	0,8574			LPS	IL-1 $\beta$	669,0540		
CTR	IL-6	1,0938	1,0040	0,0897	CAN 100	GAPDH	1	-	-
CTR	IL-6	0,9143			CAN 100	GAPDH	1		
CTR	IL-1 $\beta$	0,8199	1,0198	0,1998	CAN 100	TNF $\alpha$	9,0148	9,4963	0,4815
CTR	IL-1 $\beta$	1,2196			CAN 100	TNF $\alpha$	9,9777		
LPS	GAPDH	1,0000	-	-	CAN 100	IL-6	10,8416	13,2742	2,4326
LPS	GAPDH	1,0000	-	-	CAN 100	IL-6	15,7068		
LPS	TNF $\alpha$	8,1578	7,9905	0,1673	CAN 100	IL-1 $\beta$	235,7811	340,1044	104,3232
LPS	TNF $\alpha$	7,8232			CAN 100	IL-1 $\beta$	444,4276		

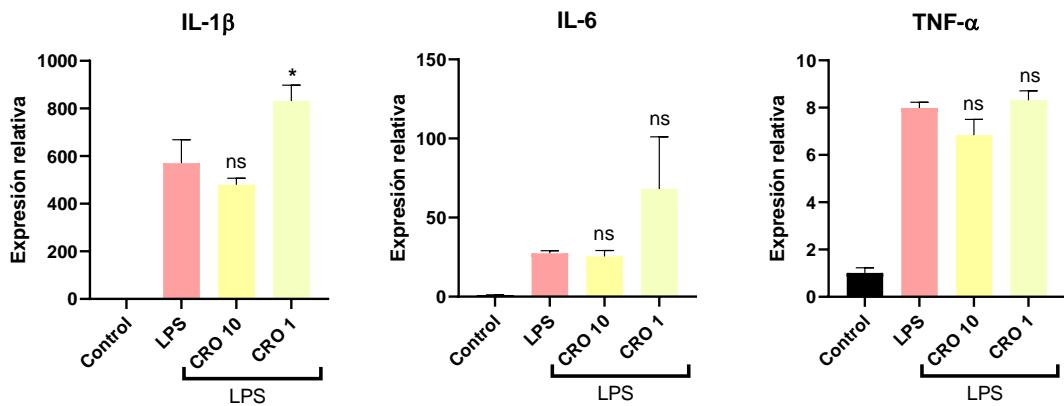
**Tabla 11:** Ct, ΔCt, ΔΔCt y 2<sup>ΔΔCt</sup> obtenidos por preincubación con extracto de *Cannabis* (CAN 10) y látex de *Croton urucurana* (CRO 10 y CRO 1).

Tratamiento	Gen	2 <sup>ΔΔCt</sup>	Media	DS	Tratamiento	Gen	2 <sup>ΔΔCt</sup>	Media	DS
CAN 10	GAPDH	1,0000			CRO 10	IL-6	28,0944	25,4475	2,6469
CAN 10	GAPDH	1,0000			CRO 10	IL-6	22,8006		
CAN 10	TNF $\alpha$	8,8449	11,1463	2,3014	CRO 10	IL-1 $\beta$	451,6103	479,2956	27,6853
CAN 10	TNF $\alpha$	13,4477			CRO 10	IL-1 $\beta$	506,9809		
CAN 10	IL-6	21,7095	34,3937	12,6842	CRO 1	GAPDH	1,0000	-	-
CAN 10	IL-6	47,0779			CRO 1	GAPDH	1,0000		
CAN 10	IL-1 $\beta$	474,7218	839,6075	364,8857	CRO 1	TNF $\alpha$	8,0212	8,3089	0,2877
CAN 10	IL-1 $\beta$	1204,493			CRO 1	TNF $\alpha$	8,5965		
CRO 10	GAPDH	1,0000	-	-	CRO 1	IL-6	44,7420	68,0641	23,3221
CRO 10	GAPDH	1,0000	-	-	CRO 1	IL-6	91,3862		
CRO 10	TNF $\alpha$	7,3059	6,8351	0,4707	CRO 1	IL-1 $\beta$	897,8585	831,1605	66,6980
CRO 10	TNF $\alpha$	6,3644			CRO 1	IL-1 $\beta$	764,4625		

A partir de los 2<sup>ΔΔCt</sup> obtenidos para cada protocolo de tratamiento de la línea celular, se calcularon la media y desviación estándar correspondientes. Estos parámetros se analizaron estadísticamente por prueba t de student con el programa *Graphpad Prism 8.3.0*, comparando los valores obtenidos para cada citoquina y tratamiento aplicado respecto a la estimulación con lipopolisacárido (protocolo LPS), lo que permitió determinar la existencia de una diferencia significativa en la expresión de citoquinas proinflamatorias al realizar una preincubación con extracto de *Cannabis* a una concentración de 100  $\mu$ g/ml: IL1 $\beta$  (\*,  $p<0.05$ ), e IL6 (\*,  $p<0.05$ ), pero resultando no significativo (ns) para el caso de TNF $\alpha$ . Este efecto no se observó al tratar la línea celular con extracto de *Cannabis* a concentración de 10  $\mu$ g/ml: IL1 $\beta$  (ns), TNF $\alpha$  (ns) e IL6 (ns). Los resultados obtenidos de la evaluación de extractos de *Cannabis* por prueba de t de student se presentan en la figura 20. De igual manera, no se obtuvo una diferencia significativa en la expresión de citoquinas al preincubar con látex de *Croton* a la concentración de 10  $\mu$ g/ml: IL1 $\beta$  (ns), TNF $\alpha$  (ns) e IL6 (ns). Por otro lado, la preincubación con *Croton urucurana* a una concentración de 1  $\mu$ g/ml arrojó una diferencia significativa en la expresión de IL1 $\beta$  (\*,  $p<0.05$ ), pero de manera contraria a lo esperado inicialmente, actuando como proinflamatorio; en cuanto a TNF $\alpha$  e IL6, la diferencia resultó no significativa. El resultado del análisis estadístico del tratamiento de la línea con *Croton* se presenta en la figura 21.



**Figura 20:** expresión de citoquinas proinflamatorias en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y con extractos de *Cannabis sativa* 100  $\mu$ g/ml o 10  $\mu$ g/ml. Análisis estadístico por t de student respecto al LPS (ns  $p>0.05$ ; \*  $p<0.05$ ).



**Figura 21:** expresión de citoquinas proinflamatorias en células RAW 264.7 estimuladas con LPS y con extractos de *Croton urucurana* 10 µg/ml o 1 µg/ml. Análisis estadístico por t de student respecto al LPS (ns p>0,05; \* p<0,05).

## DISCUSIÓN

La falta de medicamentos eficaces y seguros por tiempos prolongados resalta la importancia de las enfermedades inflamatorias crónicas como un problema de salud (Regalado Veloz & Sánchez Perera, 2015). Según datos de la OMS, el 80 % de la población de países en desarrollo recurre a la medicina tradicional, y de ellos, 85 % usan extractos de plantas medicinales. En este aspecto, ciertos estudios sobre productos de origen vegetal han demostrado una mayor actividad *in vitro* que fármacos de uso habitual; Morales León et al. (2018) demostraron la actividad antiinflamatoria de *Anredera vesicaria* en un modelo de lisis de glóbulos rojos en medio hipotónico, resultando mayor en extractos de la planta en comparación al diclofenac sódico a igual concentración (Morales León et al., 2018). Formukong et al. (1988) demostraron en dos modelos *in vivo* mayor actividad antiinflamatoria en extractos de *Cannabis* y en algunos de sus componentes puros, como CBD, en comparación a los fármacos usados como control positivo: aspirina y trifluoperazina (Formukong et al., 1988). Los constituyentes presentes en plantas a los que se ha atribuido principalmente actividad antiinflamatoria son alcaloides, flavonoides, taninos, esteroles, triterpenos, sesquiterpenos lactonas, aceites volátiles, resinas, carbohidratos o polisacáridos, glicosido-flavonas, ácidos grasos poliinsaturados (Okoli et al., 2003), compuestos que se encuentran en mayor o menor medida presentes en las especies estudiadas en esta práctica (Azab et al., 2016; Cordeiro et al., 2016; Gallily et al., 2018; Rao et al., 2007)..

### *Croton urucurana*

Hasta el estudio realizado por Cordeiro et al. (2016), la actividad de *Croton urucurana* como antiinflamatorio y analgésico no había sido corroborada en investigaciones publicadas (Cordeiro et al., 2016). En esta práctica, se evaluó la actividad antiinflamatoria del látex de *Croton urucurana*, al incubar la línea RAW 264.7 con una dosis de 1 y 10 µg/ml de este. En ambos casos, no se observó una reducción significativa en la expresión de ninguna de las citoquinas evaluadas (IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ ) respecto al grupo estimulado con LPS. Esto difiere de los resultados obtenidos por Cordeiro et. al. (2016), que demostró la actividad antiinflamatorio y antinociceptiva de un extracto metanólico de corteza de *Croton urucurana* en un modelo *in vivo* (Cordeiro et al., 2016). Sin embargo, en dicho trabajo se investigó la actividad de un extracto de corteza, a diferencia de nuestro estudio donde el material ensayado fue el látex filtrado para procurar la eliminación de restos de corteza incorporados durante la recolección. Si bien no hay estudios publicados sobre la actividad antiinflamatoria del látex de *Croton urucurana*, su actividad antinociceptiva fue demostrada en modelos *in vivo* de dolor visceral en ratones por Rao et. al. (2007) (Rao et al., 2007). Cabe destacar, en este aspecto, que Cordeiro et. al. (2016) indicó la existencia de diferencias en la composición química del látex en comparación al extracto metanólico de la corteza de esta especie, lo que podría relacionarse a la diferencia entre los resultados obtenidos respecto a este trabajo. Además, en dicho estudio identificaron una serie de componentes químicos del extracto de corteza: (+)-gallocatequina, procianidina B3, (+)-catequina, (-)-epicatequina, tembetarina, magnoflorina, taspina, entre otros (Cordeiro et al., 2016). Algunos de estos pertenecen al grupo de sustancias descritas por Okoli et. al. (2003), por estar asociadas a la actividad antiinflamatoria de plantas medicinales (Okoli et al., 2003), de manera que los efectos observados por Cordeiro et. al. (2016) podrían relacionarse a estos compuestos. La presencia de catequina y galocatequina en la corteza de *Croton urucurana* también fue verificada en el estudio realizado por Peres et. al. (1998), donde se comprobó la actividad antinociceptiva de extractos crudos, fracciones semipurificadas y componentes puros de *Croton urucurana* en un modelo *in vivo* (Peres et al., 1998). Si bien en este estudio no fue posible realizar el aislamiento de los principios activos del látex de *Croton urucurana*, la elección de trabajar con este exudado, aun en disponibilidad de otros materiales vegetales, se basó en la notable

actividad antiinflamatoria de este en ensayos preliminares, exhibida en un modelo de lisis hipotónica de glóbulos rojos. En nuestro trabajo, estos resultados no se tradujeron en una actividad antiinflamatoria observable, pero no debe perderse de vista que el modelo aplicado como screening, así como aquellos descritos en la bibliografía consultada, fueron diferentes al seleccionado para esta práctica.

Si bien la actividad antiinflamatoria del género *Croton* ha sido demostrada en otros trabajos, como el realizado por Acostupa et. al. (2017), dicho estudio utilizó un extracto etanólico del látex de *Croton lechleri*, y se aplicó un modelo de lisis de glóbulos rojos en medio hipotónico (Acostupa et al., 2017). En el trabajo realizado por Risco et. al. (2003), un modelo *in vivo* de edema inducido por carragenina también puso en evidencia la actividad antiinflamatoria del látex de *Croton lechleri* (Risco et al., 2003). Respecto a nuestra discordancia con estos resultados, además de considerar las especies distintas, no deben perderse de vista las diferencias edafoclimatológicas, por las que una misma especie puede presentar diferencias en el contenido de metabolitos secundarios según su lugar de origen. También se ha observado que la actividad antiinflamatoria varía en los productos vegetales de acuerdo al modo de preparación, entre otros factores; así lo indica estudio realizado por Brito Álvarez et. al. (2014), quienes describieron, en un modelo *in vivo*, la ausencia de actividad antiinflamatoria en productos vegetales preparados de especies en las que se habían identificado metabolitos con actividad antiinflamatoria en estudios previos (Brito Álvarez et al., 2014). En nuestro trabajo, el látex de *Croton urucurana* no fue sometido a extracción con solventes, sino que una vez colectado fue simplemente filtrado y llevado a sequedad en evaporador rotatorio, forma en la que se lo preservó hasta su aplicación en esta práctica. Dadas estas observaciones, es posible que la actividad antiinflamatoria del látex de *Croton* pueda ser observada en otros tipos de preparados o al aplicar otros modelos experimentales.

En el trabajo realizado por Casao et. al. (2020) se evaluó la actividad cicatrizante *in vivo* de un ungüento elaborado a base del extracto etanólico de corteza de *Croton urucurana*. De forma coincidente con el trabajo de Cordeiro et. al. (2016) (Cordeiro et al., 2016) y Peres et. al. (1998) (Peres et al., 1998), la composición química de la corteza reveló la presencia de (epi)-catequina y (epi)-gallocatequina, compuestos derivados de quercetina y alcaloides (Casao et al., 2020). Los resultados de dicho trabajo indicaron una mayor curación de heridas de los grupos tratados con ungüentos de extracto de corteza de *Croton urucurana* al 5 y 10%, lo que se asoció a un incremento del sistema antioxidante estimulado por los ungüentos, que aceleró la recuperación del tejido lesionado al reducir la generación de radicales libres y la respuesta inflamatoria. Esta actividad antioxidante y curativa se relaciona a la presencia de compuestos fenólicos como las proantocianidinas (Hemmati et al., 2015). Un proceso de cicatrización exitoso requiere de un balance entre mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios en las etapas de reparación tisular, dado que una respuesta inflamatoria excesiva o prolongada puede llevar a daño tisular (Eming et al., 2007), por lo que es probable que en el estudio de Casao et. al. (2020), el extracto de *Croton urucurana* haya afectado positivamente a la respuesta inflamatoria. En concordancia con estos resultados, Namjoyan et. al. (2016) señalaron la actividad cicatrizante del látex de *Croton lechleri*, postulando que este favorece el proceso de curación no solo por la actividad antioxidante de sus compuestos, sino también por otorgar una protección física a la superficie de la lesión que previene la infección (Namjoyan et al., 2016). Las discrepancias observadas pueden, nuevamente, relacionarse a las diferencias en la composición química entre corteza y látex (Cordeiro et al., 2016), así como a las diferencias edafoclimatológicas que influyen sobre el contenido de metabolitos secundarios, determinando así resultados diferentes.

En cuanto al efecto citopático y la citotoxicidad observada, la actividad antitumoral del látex de *Croton urucurana* y *Croton lechleri* ha sido descrita y estudiada previamente (Cândido-Bacani et al., 2015; Montopoli et al., 2012; Teles Vieira et al., 2017). Montopoli et. al. (2012) demostró capacidad de inhibición de la proliferación sobre las líneas SK23 (células de melanoma humano) y HT29 (cáncer colorrectal) por parte del látex de *Croton lechleri*, así como de un alcaloide aislado de este: taspina, presente también en otras especies y al que se ha atribuido principalmente esta actividad (Montopoli et al., 2012). En cuanto a *Croton urucurana*, la citotoxicidad de su látex ha sido reportada en el estudio realizado por Cândido-Bacani et. al. (2015) sobre líneas celulares de cáncer humanas: 786-o (carcinoma renal), HT-29 (carcinoma de colon), NCI-ADR/RES (adenocarcinoma de ovario, fenotipo multirresistente), MCF-7 (adenocarcinoma mamario), PC-03 (carcinoma de próstata) y Hep-G2 (carcinoma hepatocelular), y esta actividad fue relacionada al hallazgo de un ciclopéptido de nueve aminoácidos no caracterizado previamente, perteneciente al grupo de los denominados orbitides, que exhibió marcada citotoxicidad, especialmente sobre la línea NCI-ADR/RES (Cândido-Bacani et al., 2015). En adición, en dicho trabajo el extracto de corteza de *Croton urucurana* no presentó citotoxicidad sobre las líneas mencionadas. A estos resultados se adhieren los obtenidos por Vieira et. al. (2017), en cuyo trabajo se observó el efecto citotóxico de un extracto etanólico de látex de *Croton urucurana* sobre las líneas celulares U937 (leucemia de origen linfoide) y THP-1 (leucemia monocítica aguda) (Teles Vieira et al., 2017). Dado que en los estudios realizados durante esta práctica la exposición de la línea RAW 264.7 al látex de *Croton urucurana* dio lugar a una marcada disminución de la viabilidad celular y a alteraciones morfológicas observadas a concentraciones reducidas de exposición, más estudios

sobre diferentes líneas celulares y modelos, así como una evaluación más profunda de su composición son necesarios para una mayor comprensión de este fenómeno y para evaluar el potencial de *Croton urucurana* como una fuente de drogas antineoplásicas.

#### *Cannabis sativa*

De acuerdo con la revisión realizada por el Comité de Efectos Saludables de la Marihuana de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos publicada en el año 2017, la información disponible permite afirmar que hay evidencia sustancial a conclusiva sobre los efectos benéficos que *Cannabis sativa* ofrece en casos de dolor crónico, como antiemético en adultos y en otras enfermedades inflamatorias (National Academies of Sciences Engineering and Medicine, 2017).

La actividad farmacológica de las especies vegetales se relaciona, por el estudio de su composición química, con los metabolitos presentes. Así, se ha demostrado que existe una relación estrecha entre la composición en sustancias antioxidantes en las plantas y su acción antiinflamatoria (Brito Álvarez et al., 2014). En cuanto a *Cannabis sativa*, estudios previos realizados por Gallily et. al. en 2015 y 2018 sobre CBD purificado, aceites esenciales de *Cannabis* de diferentes quimiotipos y extractos enriquecidos en CBD demostraron la capacidad de todos ellos, a diferentes dosis, de reducir la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico (Gallily et al., 2015, 2018). En el estudio llevado a cabo en esta práctica, el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Cannabis sativa* fue evaluado en base a su capacidad de inhibir la expresión de citoquinas proinflamatorias por macrófagos de la línea murina RAW 264.7 estimulados con LPS. Se aplicaron dos concentraciones de trabajo: 10 y 100 µg/ml, donde la mayor de ellas exhibió una reducción significativa ( $p<0,05$ ) en la expresión de las citoquinas IL1 $\beta$  e IL6 respecto al grupo estimulado con LPS. La diferencia en la expresión de TNF $\alpha$  no fue significativa respecto a este grupo. Además, no se observó una relación entre la concentración de extracto aplicado y la reducción en la expresión. En concordancia con nuestros resultados, en el trabajo realizado por Shebab et. al. (2021) en un modelo *in vivo*, un extracto etanólico de *Cannabis* exhibió una inhibición significativa de la respuesta inflamatoria crónica y aguda (Shebab et al., 2021).

La actividad antiinflamatoria y antinociceptiva del aceite esencial de *Cannabis* fue demostrada en el trabajo realizado por Gallily et. al. (2018), en un modelo *in vivo* con diferentes quimiotipos de *Cannabis* de composición diversa, que se relacionó a diferencias en la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de sus aceites esenciales. En dicho trabajo no se observó una reducción en la expresión de TNF $\alpha$  (Gallily et al., 2018). Notablemente, el extracto de *Cannabis* evaluado en esta práctica tampoco fue capaz de lograr una diferencia significativa en la expresión de TNF $\alpha$  respecto al control, a pesar de usarse un extracto completo y no un aceite esencial. En otro trabajo realizado por Gallily et. al. (2015) sobre un modelo *in vivo*, la administración de CBD purificado y de un extracto enriquecido en CBD demostró una fuerte reducción de la expresión de TNF $\alpha$  (Gallily et al., 2015). Respecto a esta diferencia, el extracto de *Cannabis* empleado en esta práctica cuenta con una proporción de CBD menor al 5%, de acuerdo a su evaluación por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detector UV, y la composición de su aceite esencial no fue caracterizada.

En el estudio realizado por Shebab et. al. (2021), se caracterizó también la composición terpénica de un extracto de *Cannabis*, identificando monoterpenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno y limoneno) y sesquiterpenos ( $\beta$ -cariofileno, alfa-bergamoteno, cariofileno oxidado y  $\alpha$ -humuleno) (Shebab et al., 2021). Muchos de estos pertenecen al grupo de principios activos en plantas descriptos en la revisión realizada por Okoli et. al. (2003) (Okoli et al., 2003), por lo que su presencia podría contribuir a la actividad antiinflamatoria de *Cannabis* en mayor o menor medida, lo que puede estar relacionado a los resultados obtenidos en esta práctica. La actividad antiinflamatoria observada en nuestro extracto de *Cannabis* también es coincidente con los hallazgos de Formukong et. al. (1988), donde se evaluó la actividad antiinflamatoria de extractos obtenidos con etanol y éter de petróleo y se comparó con la actividad de cannabinoides purificados a partir de dos modelos *in vivo*. En ambos casos, los extractos exhibieron una inhibición significativamente mayor a la lograda por los cannabinoides puros y más potente que la aspirina (Formukong et al., 1988). En dicho trabajo, además, se observó una actividad cuatro veces más potente en el extracto obtenido con éter de petróleo respecto al obtenido con etanol, solvente utilizado en la producción del extracto en esta práctica. La importancia de la selección del solvente de extracción fue destacada en la revisión realizada por Azab et. al. (2016), considerándolo uno de los factores críticos en la determinación de la actividad de un extracto, al favorecer la extracción selectiva de componentes y principios activos de acuerdo a su polaridad y naturaleza (Azab et al., 2016). Futuros estudios realizados a partir de extractos de *Cannabis* con mayor proporción de CBD, así como caracterizaciones fitoquímicas más completas de estos permitirán una mejor comprensión de los resultados obtenidos en esta práctica.

## CONCLUSIÓN

El extracto etanólico de *Cannabis sativa* presentó actividad antiinflamatoria en el modelo de células RAW 264.7 estimuladas con LPS, evidenciada por la disminución de la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 y es dosis dependiente. El látex de *Croton urucurana* no presentó actividad antiinflamatoria evidenciable en el modelo de estudio.

Se adquirieron destrezas en el manejo de la técnica de PCR convencional y de qPCR, desde la obtención del ADN o del ARN respectivamente hasta el análisis de resultados obtenidos.

Se realizaron prácticas en el laboratorio de cultivo celular, aprendiendo sus normas de bioseguridad y los cálculos correspondientes para su aplicación rutinaria.

## REFERENCIAS

- Acostupa, F. D. M., Chavez, A., Meji-a, S. E., Pauta, M. M., & Tucunango, J. L. (2017). Efecto antinflamatorio in vitro de los extractos etanólicos de cuatro plantas medicinales peruanas. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 2(2), 79–85. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2017.22.48>
- Avalos Capristan, C. L. (2016). *Efecto del gel de extracto etanólico de hojas de Piper aduncum en la inflamación inducida en Rattus rattus var. norvegicus* [Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3065%0Ahttp://fi-admin.bvsalud.org/document/view/yjr2s>
- Aye, A., Jeon, Y.-D., Lee, J.-H., Bang, K.-S., & Jin, J.-S. (2019). Anti-inflammatory activity of ethanol extract of leaf and leaf callus of basil (*Ocimum basilicum* L.) on RAW 264.7 macrophage cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00372-2>
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules*, 21(10), 1321. <https://doi.org/10.3390/molecules21101321>
- Barrera, C. A. C., Gómez, D. C., & Castiblanco, F. A. (2016). Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234–247.
- Bogdanović, V., Mrđanović, J., & Borišev, I. (2017). A Review of the Therapeutic Antitumor Potential of Cannabinoids. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 23(11), 831–836. <https://doi.org/10.1089/acm.2017.0016>
- Brito Álvarez, G., Frías Vázquez, A. I., Moron Rodriguez, F. J., Garcia Delgado, N., Cabrera Suarez, H. R., Morejon Rodriguez, Z., Martinez Hormaza, I., & Amador, M. del C. V. (2014). Validación preclínica del efecto antiinflamatorio tópico de cinco plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(1), 40–50. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2014/cpm141f.pdf>
- Burrell Bustos, M. Á., & Esteban Ruiz, F. J. (2009). Técnicas de cultivos celulares. In *Técnicas en histología y biología celular* (1st ed., pp. 301–316). MASSON. <https://www.iberlibro.com/9788445819647/Técnicas-Histología-Biología-Celular-Montuenga-844581964X/plp>
- Cândido-Bacani, P. D. M., Figueiredo, P. D. O., Matos, M. de F. C., Garcez, F. R., & Garcez, W. S. (2015). Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*. *Journal of Natural Products*, 78(11), 2754–2760. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00724>
- Casao, T. del R. L., Pinheiro, C. G., Sarandy, M. M., Zanatta, A. C., Vilegas, W., Novaes, R. D., Gonçalves, R. V., & Viana Leite, J. P. (2020). *Croton urucurana* Baillon stem bark ointment accelerates the closure of cutaneous wounds in knockout IL-10 mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 261(March), 113042. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113042>
- Cordeiro, K. W., Felipe, J. L., Malange, K. F., do Prado, P. R., de Oliveira Figueiredo, P., Garcez, F. R., de Cássia Freitas, K., Garcez, W. S., & Toffoli-Kadri, M. C. (2016). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 183, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.051>
- de Meijer, E. (2014). The Chemical Phenotypes (Chemotypes) of Cannabis. In *Handbook of Cannabis*(pp. 89–110). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0005>
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>
- Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., De Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., & Steardo, L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts  $\beta$ -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 $\beta$  and iNOS expression. *British Journal of Pharmacology*, 151(8), 1272–1279. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707337>
- Ferrini, L., Rodríguez, J. P., Melana Colavita, J. P., Olea, G., Ojeda, G. A., Ricciardi, G., Torres, A. M., & Aguirre, M. V. (2021). Anti-inflammatory activity of *Nectandra angustifolia* (Laurel Amarillo) ethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 272, 113937. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113937>
- Fontana, J. L. (1963). FLORA Y VEGETACIÓN DEL NORDESTE DE CORRIENTES Y SUR DE MISIONES. In V. Bauni, M. Homberg, & V. Capmourteres (Eds.), *El Patrimonio Natural y Cultural en el Área de Influencia del Embalse de Yacyretá, Argentina* (pp. 9–27). Fundación de Historia Natural Félix de Azara.

- Formukong, E. A., Evans, A. T., & Evans, F. J. (1988). Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of *Cannabis sativa* L. *Inflammation*, 12(4), 361–371. <https://doi.org/10.1007/BF00915771>
- Gallily, R., Yekhtin, Z., & Hanuš, L. O. (2015). Overcoming the Bell-Shaped Dose-Response of Cannabidiol by Using Cannabis Extract Enriched in Cannabidiol. *Pharmacology & Pharmacy*, 06(02), 75–85. <https://doi.org/10.4236/pp.2015.62010>
- Gallily, R., Yekhtin, Z., & Hanuš, L. O. (2018). The Anti-Inflammatory Properties of Terpenoids from Cannabis. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1), 282–290. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0014>
- Gaston, T. E., & Szaflarski, J. P. (2018). Cannabis for the Treatment of Epilepsy: an Update. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18(11), 73. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0882-y>
- Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N., & Medina, J. D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 182–217.
- Hemmati, A. A., Foroozan, M., Houshmand, G., Moosavi, Z. B., Bahadoram, M., & Maram, N. S. (2015). The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. *Global Journal of Health Science*, 7(3), 52–58. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v7n3p52>
- Iseppi, R., Brighenti, V., Licata, M., Lambertini, A., Sabia, C., Messi, P., Pellati, F., & Benvenuti, S. (2019). Chemical Characterization and Evaluation of the Antibacterial Activity of Essential Oils from Fibre Type *Cannabis sativa* L. (Hemp). *Molecules*, 24, 7–12.
- Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L., & Benyamina, A. (2017). Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(3), 309–316. <https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.3/glaflaye>
- López, G. E. Á., Brindis, F., Niizawa, S. C., & Martínez, R. V. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 45(4).
- Maione, F., Russo, R., Khan, H., & Mascolo, N. (2016). Medicinal plants with anti-inflammatory activities. *Natural Product Research*, 30(12), 1343–1352. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1062761>
- Montopoli, M., Bertin, R., Chen, Z., Bolcato, J., Caparrotta, L., & Froldi, G. (2012). Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.032>
- Morales León, J. A., González Santisteban, A., Peña Fuentes, D., Guardia Puebla, Y., & Torres Rodríguez, E. (2018). In vitro anti-inflammatory activity of aqueous, ethanolic and ethereal extracts of rhizomes, leaves and stems of *Anredera vesicaria*. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, 7(4), 459–461. <https://doi.org/10.15406/japlr.2018.07.00266>
- Murillo, J. (1999). COMPOSICIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO CROTON (EUPHORBIACEAE) EN COLOMBIA, CON CUATRO ESPECIES NUEVAS. *Caldasía*, 21(2), 141–166. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/31149>
- Muscarà, C., Smeriglio, A., Trombetta, D., Mandalari, G., La Camera, E., Grassi, G., & Circosta, C. (2021). Phytochemical characterization and biological properties of two standardized extracts from a non-psychotropic *Cannabis sativa* L. cannabidiol ( <sc>CBD</sc> )-chemotype. *Phytotherapy Research*, 35(9), 5269–5281. <https://doi.org/10.1002/ptr.7201>
- Muscarà, C., Smeriglio, A., Trombetta, D., Mandalari, G., La Camera, E., Occhiuto, C., Grassi, G., & Circosta, C. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity of two standardized extracts from a new Chinese accession of non-psychotropic *Cannabis sativa* L. *Phytotherapy Research*, 35(2), 1099–1112. <https://doi.org/10.1002/ptr.6891>
- Namjoyan, F., Kiashi, F., Moosavi, Z. B., Saffari, F., & Makhmalzadeh, B. S. (2016). Efficacy of Dragon's blood cream on wound healing: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(1), 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.029>
- National Academies of Sciences Engineering and Medicine. (2017). The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The current state of evidence and recommendations for research. In *Psychiatry* (Vol. 15, Issue 2). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/24625>
- Niesink, R. J. M., & van Laar, M. W. (2013). Does Cannabidiol Protect Against Adverse Psychological Effects of THC? *Frontiers in Psychiatry*, 4(October), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00130>
- Nigenda, G., Mora-Flores, G., Aldama-López, S., & Orozco-Núñez, E. (2001). La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: El dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Pública de México*, 43(1), 41–51. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342001000100006>
- Novack, G. D. (2016). Cannabinoids for treatment of glaucoma. *Current Opinion in Ophthalmology*, 27(2), 146–150. <https://doi.org/10.1097/ICU.0000000000000242>
- Okoli, C. O., Akah, P. A., & Nwafor, S. V. (2003). Anti-inflammatory activity of plants. *Journal of Natural Remedies*, 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.18311/jnr/2003/371>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. <https://www.who.int/es/publications/item/9789241506096>

- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). *Cannabis sativa* L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International*, 2018, 15. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
- Peres, M. T. L. P., Delle Monache, F., Cruz, A. B., Pizzolatti, M. G., & Yunes, R. A. (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 56(3), 223–226. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00039-1)
- Peres, M. T. L. P., Monache, F. D., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. S., Beirith, A., Calixto, J. B., & Yunes, R. A. (1998). Analgesic compounds of Croton urucurana Baillon. Pharmacoo-chemical criteria used in their isolation. *Phytotherapy Research*, 12(3), 209–211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199805\)12:3<209::AID-PTR215>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<209::AID-PTR215>3.0.CO;2-P)
- Perretti, M., & D'Acquisto, F. (2009). Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 9(1), 62–70. <https://doi.org/10.1038/nri2470>
- Pieters, L., de Bruyne, T., Claeys, M., Vlietinck, A., Calomme, M., & vanden Berghe, D. (1993). Isolation of a dihydrobenzofuran lignan from south american dragon's blood (*Croton* spp.) as an inhibitor of cell proliferation. *Journal of Natural Products*, 56(6), 899–906. <https://doi.org/10.1021/np50096a013>
- Ramirez Rodríguez, M., Dranguet Aguilar, D., & Morales León, J. A. (2020). Actividad antiinflamatoria de plantas medicinales. *Revista Granmense de Desarrollo Local.*, 16(September), 320–332.
- Rao, V. S., Gurgel, L. A., Lima-Júnior, R. C. P., Martins, D. T. O., Cechinel-Filho, V., & Santos, F. A. (2007). Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(2), 357–360. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.009>
- Regalado Veloz, A. I., & Sánchez Perera, L. M. (2015). Plantas cubanas con efecto antiinflamatorio. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1), 156–164.
- Risco, E., Ghia, F., Vila, R., Iglesias, J., Álvarez, E., & Cañigueral, S. (2003). Immunomodulatory Activity and Chemical Characterisation of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. *Planta Medica*, 69(9), 785–794. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43208>
- Risco, E., Iglesias, J., & Cañigueral, S. (2001). Interés terapéutico del látex de *Croton lechleri*. *Forum De Natura Rerum.*, 12, 20–21. <https://www.fitoterapia.net/archivos/200812/roda-sangre-de-drago.pdf?1>
- Russo, E. B. (2017). Cannabis and epilepsy: An ancient treatment returns to the fore. *Epilepsy and Behavior*, 70, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.09.040>
- Shebab, W., Saliba, J., Faour, W. H., Ismail, J., El Hage, M., Daher, C. F., Taleb, R. I., Nehmeh, B., Dagher, C., Chrabieh, E., & Mroueh, M. (2021). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity evaluation of Lebanese *Cannabis sativa* L. ssp. *indica* (Lam.). *Journal of Ethnopharmacology*, 270(August 2020), 113743. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113743>
- Shen, C.-H. (2019). Detection and Analysis of Nucleic Acids. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 167–185). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9>
- Smeriglio, A., Giofrè, S. V., Galati, E. M., Monforte, M. T., Cicero, N., D'Angelo, V., Grassi, G., & Circosta, C. (2018). Inhibition of aldose reductase activity by *Cannabis sativa* chemotypes extracts with high content of cannabidiol or cannabigerol. *Fitoterapia*, 127(December 2017), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.002>
- Süleyman, H., Demircan, B., & Karagöz, Y. (2007). Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*, 59(3), 247–258. [http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L47299726%0Ahttp://www.ifpan.krakow.pl/pjp/pdf/2007/3\\_247.pdf](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L47299726%0Ahttp://www.ifpan.krakow.pl/pjp/pdf/2007/3_247.pdf) LK - <http://limo.libis.be/resolver?&sid=EMBASE&issn=17341140&id=doi:&atitle=Anti-inflammatory+and+side+effects+of+cycl>
- Tamariz Ortiz, J. H., Capcha Mendoza, R., Palomino Cadenas, E. J., & Aguilar Olano, J. (2013). Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Revista Medica Herediana*, 14(2), 81. <https://doi.org/10.20453/rmh.v14i2.760>
- Teles Vieira, G., Toledo de Oliveira, T., Pereira Monteiro, L., Masahiko Kanashiro, M., Rocha da Costa, M., & Lopes Pereira, W. (2017). Atividade Citotóxica Do Extrato De Croton Urucurana Baill Contra Linhagens De Células Leucêmicas Humanas U937 E Thp1. *Ciência e Natura*, 39(3), 512. <https://doi.org/10.5902/2179460x23281>