

32. Salud Humana

Impacto de los fitocannabinoides en corazón: Moscas cannábicas como modelo genético y molecular

Gómez, Ivana María; Rodríguez, Maia Abigail; Ferrero, Paola (orientadora)

ivanamariagomez@gmail.com; maiaabirod@hotmail.com; paoferrero@gmail.com

Facultad de Ciencias Médicas

Universidad Nacional de La Plata

Resumen

En las últimas décadas, la planta de *Cannabis sp.* ha cobrado importancia como una alternativa terapéutica para una creciente lista de patologías, mostrando efectos analgésicos, antieméticos, anticonvulsivantes, antiespásticos y orexigénicos.

En la Argentina fue sancionada, en marzo del 2017, la Ley 27350 de “Uso Medicinal de la Planta de Cannabis y sus derivados”, abriéndose una nueva perspectiva acerca de su uso como tratamiento principal o complementario en nuestro país.

El consumo de cannabis con fines medicinales es, en muchos casos, crónico, por lo que es especialmente importante evaluar los efectos que el consumo prolongado en el tiempo produce a nivel fisiológico.

El presente trabajo surge de una línea de investigación que utiliza a *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para el estudio de los efectos que produce el consumo de cannabis a largo plazo a nivel cardiovascular.

Nuestros resultados demuestran que el cannabis incrementa la sobrevivencia de los organismos expuestos. A nivel cardíaco, se observa un efecto inotrópico y lusitrópico negativo sumado a un incremento de la variabilidad de la frecuencia cardíaca. Estos efectos podrían estar mediados por vías de señalización no canónicas ya que no involucrarían receptores CB1 y CB2. En este sentido, *Drosophila melanogaster* es un modelo adecuado para realizar mutagénesis e identificar componentes de la vía de señalización que comparten estos receptores con el humano.

Introducción

La planta de *Cannabis sp.*, originaria de Asia Central, es una de las plantas cuya química se encuentra dentro de las más estudiadas del mundo (Arno Hazekamp, 2007). Se han caracterizado más de 460 compuestos activos en sus flores, dentro de los cuales se destacan los cannabinoides, también llamados fitocannabinoides. Estos son un grupo de moléculas de estructura carbocíclica, a las cuales se les ha atribuido los efectos fisiológicos que produce el consumo de cannabis. Los cannabinoides más conocidos son el delta-9-tetrahidrocannabinol (delta-9-THC), denominado comúnmente como THC, el delta-8-tetrahidrocannabinol (delta-8-THC), cannabidiol (CBD) y cannabinol (CBN) (EISOhly y Slade, 2005).

Los mamíferos presentan un Sistema Cannabinoide Endógeno (SCE), compuesto por endocannabinoides y sus respectivos receptores y moléculas de señalización, que constituyen un sistema regulador capaz de modular una gran variedad de efectos fisiológicos (Díaz y Marturet, 2009). Los fitocannabinoides son capaces de unirse a los receptores del SCE para ejercer sus acciones fisiológicas. Los receptores mejor caracterizados son los acoplados a proteínas G, CB1 y CB2. Sin embargo, actualmente se conoce que los cannabinoides pueden unirse a otros receptores tales como receptores de la familia GPR, al receptor vanilloide de tipo1 (TRVP1) (Vennekens, 2008) y a los receptores nucleares activados por proliferados de peroxisomas (PPAR) (Díaz y Marturet, 2009).

Hace muchos años, los compuestos activos de la planta de *Cannabis sp.* se utilizan con fines terapéuticos o medicinales para tratar una amplia gama de patologías. De hecho, esta planta se incluyó en la primera Farmacopea China como un remedio herbal, junto con el ginseng y la efedra, hace más de 2700 años. Actualmente, se le otorgan a los cannabinoides, un variado espectro de aplicaciones medicinales, dentro de los cuales se encuentran la acción analgésica ya sea en dolor postoperatorio o neuropático, el tratamiento de las náuseas y vómitos inducidos por quimioterapia y el tratamiento de trastornos espásticos producidos por enfermedades como esclerosis múltiple (Vidal, Castro y Pazos, 2009). Además, varios reportes sugieren que el *Cannabis* tiene propiedades anticonvulsivantes, que serían efectivas en el tratamiento de epilepsias parciales y convulsiones tonicoclónicas (Amar, 2006).

En relación al impacto de los cannabinoides sobre la actividad cardiovascular, los efectos del consumo agudo han sido bien caracterizados, consistiendo en el aumento de la frecuencia cardíaca y vasodilatación. Sin embargo, los efectos del consumo crónico no han sido suficientemente estudiados y presentan resultados contradictorios provenientes de ensayos

con mamíferos. Debido a que el cannabis y sus derivados están siendo utilizados de forma cada vez más creciente como una alternativa terapéutica, es necesario conocer las acciones que produce a nivel cardiovascular, para poder ponderar posibles efectos beneficiosos o adversos de su consumo a largo plazo.

El presente trabajo es el resultado de una línea de investigación que utiliza a *Drosophila melanogaster*, conocida como la mosca de la fruta, como organismo modelo para el estudio de los efectos cardiovasculares producidos por el consumo crónico de cannabis. Se propone a *Drosophila* como organismo modelo ya que su genoma está secuenciado completamente y el 75% de los genes humanos presentan homólogos en este insecto (Reiter, Potocki, Chien, Gribskov y Bier, 2001). Además, las similitudes tanto a nivel genético como fisiológico entre el corazón humano y el de *Drosophila* permiten utilizarla como modelo en estudios de enfermedades cardíacas (Desahi-Sal, 2010). Sumado a esto, la mosca de la fruta presenta un ciclo de vida corto, permitiendo la evaluación de distintos parámetros obtenidos a partir de un consumo crónico en un corto período de experimentación. Adicionalmente, sus embriones se desarrollan de manera externa lo que hace accesible la generación de moscas transgénicas. Estas constituyen una herramienta muy valiosa para investigar tanto la fisiología de numerosos compuestos, como para generar organismos modelo que reproduzcan diversas patologías observadas en el humano.

Del mismo modo, se propone avanzar hacia la caracterización del metabolismo de los cannabinoides en *Drosophila melanogaster*, dado que el conocimiento de los procesos de absorción, metabolización, excreción y almacenamiento de estas moléculas en la mosca de la fruta, permitirá una mejor utilización de este organismo como modelo en estudios que impliquen consumo de cannabis.

Objetivos

Los objetivos planteados en el presente trabajo son:

1. Mediante estudios *in silico* y con técnicas de biología molecular, evaluar la existencia de otros receptores y vías de señalización para endo y fitocannabinoides en *Drosophila melanogaster* y analizar sus condiciones de homología con el humano. Esto se realiza con la intención de dar los primeros pasos en la caracterización de los mecanismos de acción del sistema endocannabinoide en la mosca de la fruta, lo que permitiría afianzar su uso como organismo modelo para estudios que impliquen consumo de cannabis.
2. Exponer un grupo de moscas adultas a una variedad específica de cannabis de forma vaporizada, con la finalidad de evaluar su sobrevivencia y función cardíaca, comparando los resultados con los obtenidos a partir de moscas no expuestas a fitocannabinoides.

3. Poner a punto las técnicas de extracción de hemolinfa, líquido circulatorio de los invertebrados, y de determinación cuantitativa de cannabinoides en dicha matriz, con el fin de evaluar la absorción y el pasaje a circulación de estas moléculas en *Drosophila*.

Materiales y métodos

Todos los estudios expuestos en el presente trabajo se realizaron con una cepa de *Cannabis* cuya denominación informal es *Moby Dick*. Se utilizará esta denominación hasta que se obtenga un nombre propio adecuado para esta variedad, que se adquiera a partir de un inventario apropiado, realizado mediante una caracterización sistemática de todas las variedades de *Cannabis* conocidas. El material vegetal fue provisto por la ONG Mamá Cultiva, quien lo donó al laboratorio para que se realicen trabajos con fines de investigación.

Determinación química del perfil de cannabinoides de la variedad de *Cannabis* utilizada en los ensayos

La caracterización química se realizó en el marco de una colaboración con integrantes del Proyecto de Extensión “Cannabis y Salud: una nueva mirada al uso medicinal del Cannabis y sus derivados”, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. El protocolo seguido para la determinación del perfil de cannabinoides en la planta se resume en los siguientes pasos:

1. Procesamiento del material vegetal y extracción de los cannabinoides en solvente orgánico (etanol).
2. “Clean up” o limpieza del extracto: este paso se hace para adsorber impurezas y limpiar la muestra de interferentes.
3. Análisis del extracto limpio: se lleva a cabo mediante la inyección del extracto limpio en un cromatógrafo gaseoso *PerkinElmer*, modelo *Clarus 850*, acoplado a un espectrómetro de masas *PerkinElmer*, modelo *Clarus SQ 8 S*.

Mediante la realización de estos ensayos es posible conocer las concentraciones de THC, CBD y CBN (expresadas en mg de cannabinoide/ g de material vegetal) en la cepa de *Cannabis* que es consumida por las moscas a lo largo de los experimentos. Se presta especial atención al THC y al CBD porque son los componentes que han presentado más aplicaciones medicinales hasta el momento (Ligresti, De Petrocellis, Di Marzo, 2016).

Búsqueda de receptores y proteínas de las vías de señalización para cannabinoides en *Drosophila*

Las acciones descritas en este apartado se realizaron con la intención de conocer si *Drosophila melanogaster* contiene receptores homólogos a los que presentan los humanos, cuyos ligandos sean los cannabinoides.

Primeramente, se llevó a cabo una investigación bibliográfica de todos los receptores y vías de señalización que intervengan en las acciones fisiológicas de los cannabinoides en el hombre y luego se buscaron los respectivos homólogos en bases de datos específicas de *Drosophila*. Las proteínas halladas se caracterizaron a partir de la información contenida en Uniprot: <http://www.uniprot.org/> y Flybase <http://flybase.org/>.

Luego se realizó un alineamiento para evaluar la posible homología entre los receptores humanos y de *Drosophila* mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). En este caso, se utilizaron las secuencias proteicas del humano para contrastar contra la base de datos de *Drosophila melanogaster*. Los alineamientos se realizaron usando la matriz Blosum 62 y se cotejó el porcentaje de identidad, cobertura y el e-value, para evaluar si las proteínas encontradas podían o no ser homologas a las de humano. En base a esto, se halló que el receptor vanilloide TRPV1 de humanos posee un posible homólogo en *Drosophila* denominado Nanchung- isoforma A, y que el factor de transcripción PPAR de humanos, presenta un homólogo que codifica para la Proteína Inducida por Ecdisona 75B- isoforma C en *Drosophila*.

Para demostrar la presencia o ausencia de transcritos producidos por los genes que codifican para las proteínas anteriormente mencionadas (denominadas candidatas) en la mosca de la fruta, se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio la extracción de cerebros y corazones de moscas tanto expuestas como no expuestas a cannabis (controles). El conjunto de corazones y cerebros de ambos grupos de moscas serán sometidos a RT-PCR de punto final (en un termociclador *T18* de la marca *IvemaDesarrollos*) para analizar la presencia de estos transcritos. Con el fin de llevar a cabo la técnica, se han diseñado los primers necesarios para identificar los transcritos de los homólogos en *Drosophila* para TRPV1 y PPAR. Como molde para el diseño de los mismos se ha utilizado la secuencia nucleotídica correspondiente a los transcritos de estas proteínas. Para el receptor Nanchung se diseñaron primers que se ubican en el exón 8 del transcripto, al tiempo que los primers para la Proteína Inducida por Ecdisona 75B, se ubican en el exón 1. Los primers fueron sintetizados por *Inbio Highway*, y ya se encuentran en nuestro laboratorio.

Obtención de las poblaciones de moscas y administración de fitocannabinoides

Se utilizaron moscas salvajes de la línea *Canton-S* (Bloomington Stock Center, ciudad de Indiana, USA, #64349) y moscas transgénicas que portan el sistema reportero Hand-GFP (cedidas por el laboratorio del DrHeiko Harten, Universidad de Osnabrück, Alemania). Las poblaciones de moscas se mantuvieron en una estufa a 28°C en viales con alimento compuesto por una mezcla de harina de maíz, levadura, glucosa y suplementado con 10% de antimicótico.

Se aplicaron dos dosis de fitocannabinoides diarias: una a la mañana y otra a la tarde. El suministro se realizó mediante un dispositivo diseñado por el grupo de trabajo, que permite que las moscas puedan consumir compuestos por vía inhalatoria. Este dispositivo se conectó por un extremo a un vaporizador *Da Vinci* y por el otro extremo a una manguera que encastrada en un envase con una capacidad de 15,5 ml al cual se trasvasaron las moscas previamente. Para realizar la vaporización se colocaron 0.030 gramos de material vegetal en el vaporizador que se calentó a 370°F (187.78 °C), temperatura a la que todos los cannabinoides se pueden vaporizar. El vapor producido se colectó mediante una jeringa, y se insuflaron 40 ml de vapor en un recipiente o vial que contiene las moscas que fueron seleccionadas para la administración de cannabis. Luego, las moscas quedaron expuestas durante 15 minutos al vapor antes de trasvasarlas nuevamente al vial con comida en el que se encuentran habitualmente.

Análisis de sobrevida

En un primer paso, se obtuvieron poblaciones de moscas sincronizadas, es decir, en las cuales las moscas hayan nacido todas el mismo día, con lo que se asegura que los individuos sean todos de la misma edad. Dichas poblaciones se denominaron: A) Poblaciones control: aquellas que contienen moscas que no han sido expuestas a cannabis durante el ensayo de análisis de sobrevida. B) Poblaciones expuestas a cannabis: que contienen moscas que han consumido dos dosis diarias de la cepa seleccionada de *Cannabis* por vía inhalatoria mediante vaporización, como se ha explicado en el apartado anterior. Luego, se efectuó el conteo de moscas vivas y muertas una vez al día, hasta que no queden individuos vivos en las poblaciones de estudio. Los resultados obtenidos fueron analizados en el programa *GraphPadPrism 6*, y se expresaron mediante una curva de supervivencia utilizando el método Kaplan-Meier.

Análisis de la función cardíaca

Para analizar la función cardíaca, se utilizó un sistema reportero que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), cuyo gen se transcribe bajo un *driver* que se expresa solamente en células cardíacas y pericárdicas. Este driver es el promotor del factor de transcripción *Hand*, importante en la cardiogénesis de la mosca (Sellin, Albrecht, Kölsch & Paululat, 2006). Las células cardíacas y pericárdicas de las moscas que expresan la proteína GFP exhiben fluorescencia en el rango de 505-560 nm de longitud de onda en el microscopio confocal. Por lo tanto, este sistema permite registrar los movimientos de las células y por consiguiente, la actividad mecánica del corazón.

Los individuos machos de esta línea homocigota para el gen reportero Hand-GFP se cruzaron con hembras vírgenes de la línea salvaje Canton-S previamente separadas en el estadio de pupa. Por lo tanto, los descendientes (población F1) son todos heretocigotas que expresan el sistema reportero fluorescente verde, lo que permitió registrar el movimiento del corazón.

Para el estudio de la función cardíaca, los ensayos de exposición a Cannabis se repitieron durante 10 días en poblaciones de moscas F1 que expresan el reportero. También se evaluó la función cardíaca de las poblaciones de moscas controles.

Para el análisis se usaron preparados semi-intactos de corazón, obtenidos a partir de moscas pertenecientes a las poblaciones de estudio, que fueron disecadas según el protocolo adaptado de Santalla y Ferrero, 2016 (Figura 1). Mediante esta técnica, se puede observar el corazón expuesto, adherido a la pared dorsal del abdomen. Estos pasos se realizaron en un microscopio estereoscópico (*SchonfeldOptik* modelo XTD 217).

Luego, la región abdominal con el corazón adherido a la cutícula y latiendo fue transferida a una cámara, para realizar el análisis en el microscopio confocal, donde se pudieron observar las células cardíacas y pericárdicas que expresan la proteína fluorescente verde GFP. Se registró el movimiento de una célula cardíaca o de una célula pericárdica mediante microscopía confocal, con un equipo *Carl Zeiss LSM 800*. Se trazó una línea perpendicular a la trayectoria del movimiento de una célula cuando el corazón se contrae y se obtuvo la información posicional de la señal fluorescente a través del tiempo. Se registraron imágenes de la actividad cardíaca durante un escaneo de 5 segundos de duración. La digitalización de la imagen fue realizada con un algoritmo para *Anaconda*, desarrollado en nuestro laboratorio, para obtener la intensidad de fluorescencia en cada pixel de manera secuencial. Los valores obtenidos en el tiempo se analizaron con el software *LabChart* (*AD Instruments*, CO, USA).

Una vez obtenido el registro en el LabChart, se midieron los siguientes parámetros fisiológicos: frecuencia cardíaca, amplitud de señal fluorescente, Tau o constante de

relajación, derivadas positivas y negativas, período cardíaco e índice de arritmias. El significado de las mismas será explicado en la sección de Resultados y Discusión.

Los resultados de actividad cardíaca se analizaron mediante test de Student a dos colas, $\alpha = 0.05$.

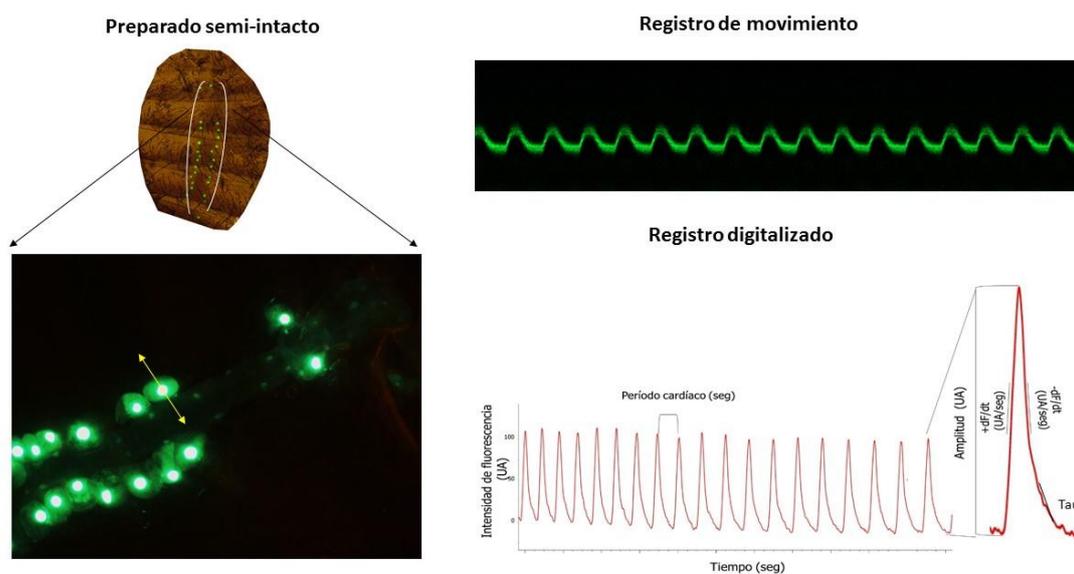


Figura 1. Izquierda, arriba: Corazón de la mosca que porta el sistema reportero que expresa la proteína GFP en cardiomiocitos y células pericárdicas, visualizado a lo largo del abdomen. Abajo, ampliación de la imagen anterior. La flecha indica la dirección del movimiento de las células cardíacas y pericárdicas. Derecha, arriba: registro de la fluorescencia de una célula cardíaca o pericárdica durante su movimiento. Abajo: Imagen digitalizada para medir los parámetros contráctiles indicados.

Extracción de hemolinfa

La hemolinfa es el líquido interno de los invertebrados, que sería un análogo de la sangre de los mamíferos. La extracción de hemolinfa se efectúa con la intención de cuantificar THC y CBD en las muestras de las moscas expuestas a cannabis, para demostrar que dichas moléculas han sido absorbidas durante el proceso de vaporizado, y con el objeto de comenzar a caracterizar el metabolismo de los cannabinoides en *Drosophila melanogaster*.

En el laboratorio se puso a punto la extracción de hemolinfa mediante el método propuesto por la Dra. Laura Musselman de la Universidad de Washington, con ligeras modificaciones www.youtube.com/watch?v=im78OIBKIPA&feature=youtu.be. Dicho procedimiento se aplica en poblaciones de moscas que han sido expuestas a dos dosis diarias de la cepa de

Cannabis seleccionada por vía inhalatoria durante 7 días, y en moscas de poblaciones control.

Para realizar la extracción se utilizaron moscas adultas salvajes de la línea Canton-S las cuales fueron anestesiadas en hielo y e inmovilizadas sobre un portaobjetos con cinta doble faz. Se realizó a cada individuo una incisión en el costado derecho del tórax con una aguja estándar utilizada para inyectar insulina.

Este procedimiento se repitió con dos grupos de 40 moscas cada uno. Los grupos de moscas fueron posteriormente colocados en un tubo eppendorff de 0.5 ml previamente perforado en su parte inferior. Este se insertó dentro de un tubo eppendorff de 1.5 ml, que actúa como un recipiente colector, y cada grupo de moscas se centrifugó a 5000 rpm durante 7 minutos. La hemolinfa que atravesó la perforación del tubo de 0.5 ml se recogió en el tubo colector. El procedimiento se esquematiza en la Figura 2.

Esta tarea se repitió hasta armar un pool que contenga el volumen de hemolinfa deseado y permanece almacenada a -20°C para realizar la cuantificación de THC y CBD mediante la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), con un protocolo similar al utilizado en la determinación del perfil de cannabinoides del material vegetal.

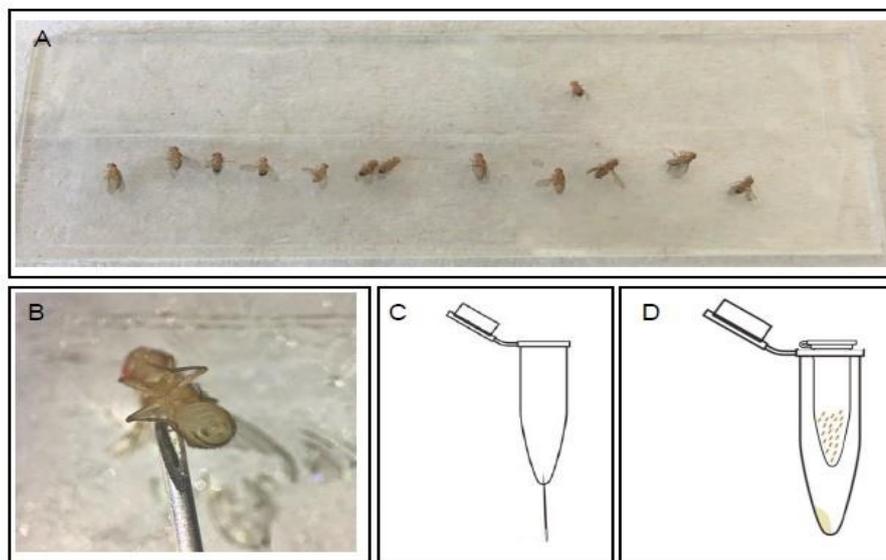


Figura 2. Extracción de hemolinfa. A) Disposición de las moscas en la cinta doble faz. B) Se observa una mosca y la posición de la aguja para realizar la incisión toraco- abdominal. C) Se procede a perforar un tubo de 0.5 ml en el que se colocan las moscas una vez que la incisión está hecha. D) Se observa el tubo que contiene las moscas adentro del tubo colector, listos para colocar en la centrifuga.

Resultados y discusión

Análisis químico de la cepa utilizada en los ensayos

El perfil de cannabinoides de la variedad de *Cannabis Moby Dick*, utilizada en los ensayos, se resume en la Tabla 1. Se puede observar que se trata de una cepa alta en THC.

Cannabinoide	mg de cannabinoide/ g de muestra	% cannabinoide/ total de cannabinoides determinados
THC	120.42	91.72
CBD	0.563	0.43
CBN	10.30	7.84

Tabla 1. Perfil de cannabinoides para la variedad de *Cannabis Moby Dick*, obtenido mediante el análisis químico por GC/MS.

Análisis *in silico* de receptores para cannabinoides humanos y de *Drosophila*

A partir de la búsqueda de receptores y proteínas homólogos al humano, pertenecientes a las vías de señalización para cannabinoides, se encontró que la mosca de la fruta no posee homólogos de los receptores CB1 y CB2 pero sí otras proteínas que también están involucradas en los efectos fisiológicos de los endo y fitocannabinoides.

Receptor Vanilloide TRPV1: se trata de un canal catiónico no selectivo permeable a calcio y activado por ligando, que detecta estímulos químicos y térmicos. Tiene una alta expresión en la piel y en los ganglios de la raíz dorsal en humanos, y se encuentra involucrado en la mediación del dolor inflamatorio e hiperalgesia. Posee efectos neuromoduladores centrales y efectos vasodilatadores mediados por endocannabinoides (Zygmunt et al., 1999).

Su homólogo en *Drosophila* es el receptor Nanchung- isoforma A, cuya función principal es el transporte de calcio y se encuentra implicado en la detección de estímulos mecánicos y en la modulación de la geotaxis.

Factor de transcripción PPAR: es un factor de transcripción activado por ligando al cual se pueden unir los endocannabinoides. Estos factores dimerizan con el receptor de retinoides RXR para regular la transcripción de aquellos genes con elementos de respuesta a PPAR en humanos. Tienen relevancia en la regulación del metabolismo lipídico, en la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a insulina. Las diferentes isoformas de PPAR se expresan en tejidos periféricos como corazón, músculo, cerebro, hígado, riñón, pulmones y piel (Díaz y Marturet, 2009). Su homólogo en *Drosophila* es la Proteína Inducida por Ecdisona 75B- isoforma C, que se encuentra en los embriones y larvas e intervienen en los procesos de muda, ecdisis, ovogénesis y respuesta antimicrobiana.

Los resultados del alineamiento de secuencia mediante BLAST se resumen en la Tabla 2.

Receptor en humanos	Homólogo en <i>Drosophila melanogaster</i>	Resultados del alineamiento
Receptor vanilloide TRPV1	Receptor Nanchung-isoforma A	% identidad= 26 % cobertura= 62 e-value: 2.00×10^{-19}
Factor de transcripción PPAR	Proteína Inducida por Ecdisona 75B- isoforma C	% identidad= 33 % cobertura= 79 e-value: 3.00×10^{-60}

Tabla 2. Proteínas candidatas en humanos y sus homólogos en *Drosophila*. Se detallan los porcentajes de identidad y cobertura y el e- value obtenidos a partir del alineamiento mediante la alineación de secuencias realizada con el programa BLAST.

Se considera que dos proteínas son homólogas cuando tienen, aproximadamente, un porcentaje de cobertura mayor a 70%, un porcentaje de identidad mayor al 25% y un e-value inferior a 1.00×10^{-5} . En todos los casos, el e-value y los porcentajes de cobertura son aceptables. En cuanto al porcentaje de identidad, es aceptable para PPAR, pero tiene un valor límite en TRPV1. Sin embargo, TRPV1 posee funciones similares tanto en humanos como en *Drosophila*, y ambas proteínas candidatas tienen vinculación con el sistema cardiovascular. Por lo tanto, se las considera como posibles mediadoras de la respuesta fisiológica a cannabinoides en la mosca de la fruta.

Actualmente, se está desarrollando en el laboratorio la puesta a punto de la técnica de RT-PCR para identificar los transcritos de los genes que codifican para los homólogos de TRPV1 y PPAR en extractos de cerebro y corazón de *Drosophila*, tanto en poblaciones control como en poblaciones de moscas expuestas a cannabis.

Análisis de sobrevida

La Figura 3 corresponde a la curva de sobrevida obtenida a partir del análisis de los resultados de los experimentos detallados en la sección de Materiales y Métodos.

El análisis de resultados demuestra que la vida media de las moscas que han sido expuestas a cannabis es 5 días mayor que la vida media de las moscas control, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. Las poblaciones iniciales fueron de 251 individuos en la población control y de 227 en la población vaporizada. La cantidad de individuos en ambas es semejante, lo que permite hacer una comparación directa entre las vidas medias obtenidas.

La mayor sobrevivencia de las moscas que consumieron cannabis forma parte de un resultado preliminar del estudio, ya que el mismo debe confirmarse repitiendo todo el experimento nuevamente.

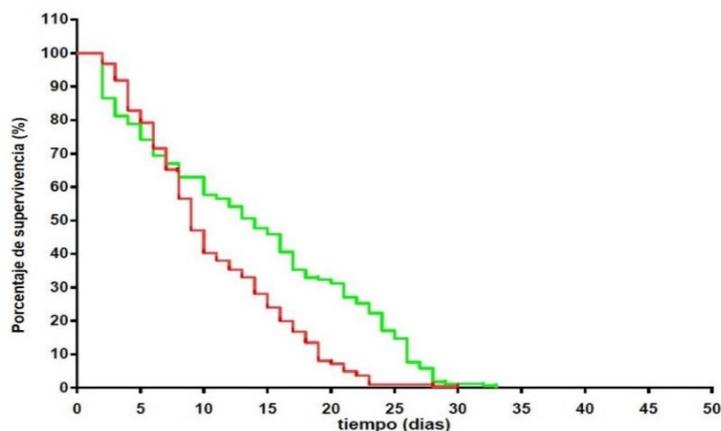


Figura 3. Gráfico que muestra el porcentaje de moscas vivas en función del tiempo. La curva roja corresponde a la población control (N inicial= 251, vida media= 9 días) y la curva verde a la población expuesta a *Cannabis* (N inicial= 227, vida media= 14 días). $P < 0.0001$.

Análisis de función cardíaca

Mediante la técnica descrita en la sección de Materiales y Métodos, se realizó el análisis de la función mecánica del corazón de un grupo de moscas expuestas a cannabis durante un período de 10 días y de un grupo control. Para esto, una vez que se obtuvo el registro de fluorescencia de cada mosca, se analizaron varios parámetros funcionales:

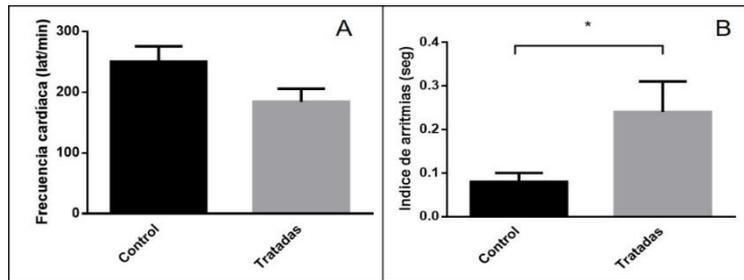
Frecuencia cardíaca: (latidos/minuto). Período cardíaco: Intervalo entre dos picos consecutivos de fluorescencia (segundos).

Índice de arritmias: desviación estándar del período cardíaco normalizado por su promedio.

Amplitud de la señal fluorescente: diferencia entre el máximo y el mínimo valor de fluorescencia de la onda, normalizado por el valor mínimo (Unidades arbitrarias de aumento de fluorescencia, UA). ($\Delta F/F_0$). Derivada positiva: velocidad máxima de aumento de fluorescencia: $+d\Delta F/F_0/dt$; (UA)/seg). Derivada negativa: velocidad máxima de disminución de fluorescencia: $-d\Delta F/F_0/dt$; (UA)/seg). Tau: constante de la caída exponencial del acortamiento o constante de relajación (segundos).

Finalmente, se realizó el análisis estadístico de cada parámetro en las poblaciones de moscas estudiadas. En primer lugar, se observó que la frecuencia cardíaca no es significativamente diferente entre las moscas expuestas a cannabis y las moscas control. Sin embargo, el índice de arritmias, que refleja la variabilidad en la frecuencia cardíaca demostró ser significativamente mayor en las moscas que han consumido cannabis tal como se observa en la Figura 4.

Figura 4. A) Frecuencia cardíaca (latidos/min) en moscas tratadas y no tratadas con *Cannabis*. B) Índice de arritmias (seg) en moscas tratadas y no tratadas con *Cannabis*.



Seguidamente, nuestros resultados mostraron que la amplitud de la contracción es significativamente menor en las moscas tratadas que en las controles. Como se puede ver en la Figura 5, tanto la derivada positiva como la negativa son significativamente menores en las moscas expuestas a cannabis. Del mismo modo, se procedió al análisis del Tau o la constante de relajación, que demostró ser significativamente mayor en las moscas tratadas. Esto significa que la disminución en las velocidades de contracción y relajación inducen una disminución de la amplitud de la contracción o efecto inotrópico negativo, en las moscas que consumieron cannabis. La reducción del valor de la derivada negativa en las moscas tratadas, es congruente con el aumento del valor del Tau o constante de relajación, dada en segundos.

La disminución en la amplitud junto con el enlentecimiento en la contracción determinan la existencia de un efecto inotrópico negativo en las moscas que han estado expuestas a cannabis, en comparación con la población control. La prolongación de la relajación, da cuenta de un efecto lusitrópico negativo.

El efecto inotrópico negativo podría deberse a cambios en el mecanismo de ciclado del calcio intracelular en las células cardíacas de las moscas que consumieron cannabis. Actualmente, se están desarrollando en el laboratorio experimentos destinados a dilucidar el mecanismo por el cual el consumo de cannabis causa los efectos anteriormente descriptos.

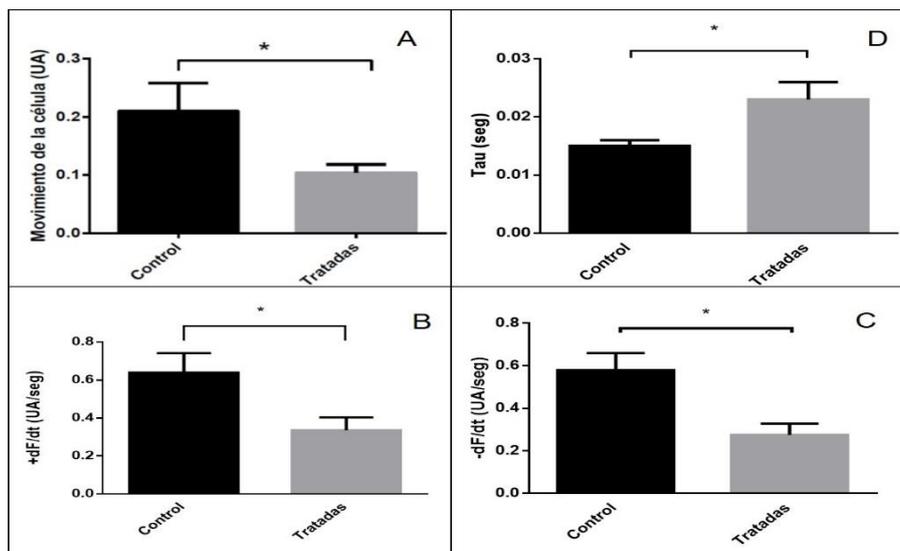


Figura 5. Parámetros medidos en moscas tratadas y no tratadas con cannabis. A) Amplitud (UA). B) Derivada positiva o máxima velocidad de contracción (UA/seg). C) Derivada negativa o máxima velocidad de relajación (UA/seg). D) Tau o constante de relajación (seg).

Extracción y análisis de hemolinfa

La cuantificación de THC y CBD en hemolinfa constituye el primer paso en la descripción del metabolismo de estos cannabinoides en *Drosophila melanogaster*. Esto adquiere especial importancia si se piensa a la mosca de la fruta como organismo modelo para estudiar los efectos cardiovasculares producidos por el consumo crónico de cannabis, tal como se plantea en el presente trabajo.

Actualmente, se está desarrollando en nuestro laboratorio la extracción de hemolinfa de moscas que han consumido dos dosis diarias de cannabis vaporizado durante 7 días, y por otro, de moscas control. La técnica descrita en la sección de Materiales y Métodos tiene un rendimiento de 8 a 10 μ l de hemolinfa cada 80 moscas. Luego de cada extracción, la hemolinfa recolectada es conservada a -20°C hasta el momento de su análisis. Es necesario coleccionar un volumen mínimo de 100 μ l en cada grupo, para luego someter la hemolinfa a un análisis químico similar al realizado en la muestra de material vegetal, que consta de extracción de los cannabinoides en etanol, seguido de un *Clean-up* y la determinación de THC y CBD mediante GC/MS. Estos ensayos también se hacen en el marco de una colaboración con personal del Proyecto de Extensión Cannabis y Salud de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Conclusiones

En el presente trabajo se estudió el impacto de la administración de fitocannabinoides vaporizados en el organismo modelo *Drosophila melanogaster*. Si bien el impacto de fitocannabinoides ya ha sido estudiado en mamíferos utilizando como modelos ratas y ratones (Ledent et al., 1999) (Buckley et al., 2000), este trabajo fue el primer estudio desarrollado en Argentina en el que se utiliza especialmente a la mosca de la fruta como modelo de estudio y en el que se utiliza consumo de cannabis por vía inhalatoria. Particularmente, el modelo de *Drosophila* permite estudiar los efectos surgidos de la administración de fitocannabinoides en forma de vapor, método que es más difícil implementarlo en los modelos de mamíferos, a los cuales se les debe aplicar los compuestos por vía oral o intravenosa.

A diferencia de otros organismos, *Drosophila* presenta un ciclo de vida corto. Esto nos permite obtener, en un corto plazo de experimentación, resultados sobre el estudio de la sobrevivencia o la función cardíaca, áreas donde el efecto beneficioso o perjudicial de los fitocannabinoides no está ampliamente investigado. Además, el hecho de que el genoma de *Drosophila* sea conocido en su totalidad y que el 75% de sus genes presenten homólogos en humano, nos da la posibilidad de obtener resultados en varios aspectos: 1) que permitan interpretar el rol de genes conservados con el humano en las respuestas fisiopatológicas inducidas por fitocannabinoides; 2) que permitan descubrir nuevos genes reguladores de estos efectos, en ambos casos con el fin de comprender vías de señalización, regulación epigenética y relación genética-ambiente.

Nuestros resultados aportan datos sobre el acoplamiento excito-contráctil con el fin de caracterizar desde el aspecto celular, la respuesta cardíaca ante la exposición a cannabinoides. Pudimos observar que los fitocannabinoides incrementan el índice de arritmias e inducen un efecto inotrópico y lusitrópico negativos. Estudios en curso en el laboratorio están siendo orientados a la investigación de las causas que expliquen estos fenómenos, y que están relacionados a la búsqueda de cambios en el manejo del calcio intracelular en las células contráctiles del corazón de las moscas que han consumido cannabis de manera crónica.

En resumen, los estudios realizados en este trabajo constituyen un punto de partida para profundizar en el conocimiento de los efectos cardiovasculares de los cannabinoides, y explotar el potencial de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para llevar esto a cabo. Es necesaria la continuación y profundización de los estudios en la temática, con el fin de caracterizar los efectos a nivel cardíaco del consumo de una sustancia que, de manera

cada vez más creciente, está siendo utilizada por pacientes que sufren variadas patologías como elemento terapéutico.

Referencias

- Amar, M. B. (2006). *Cannabis* in medicine: A review of their therapeutic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1-2), 1-25.
- Buckley, N.E. , McCoy, K.L. , Mezey, E. , Bonner, T. , Zimmer, A. , Felder, C.C. , Glass, H. , Zimmer, A. (2000) La inmunomodulación por cannabinoides está ausente en ratones deficientes para el receptor cannabinoide CB.*Eur J Pharmacol* , 396 (2-3), 141-9.
- Desai-Shah y col. *The Open Physiology Journal*2010; 3:16-36.
- Díaz Labiada, I y Marturet(2009) Capítulo 1: “Sistema cannabinoide endógeno: aspectos bioquímicos e implicación” de “Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides” (pp.09-27) Sociedad Española de Investigación sobre Endocannabinoides. Madrid, España.
- EISOhly, M. A. y Slade, D. (2005) Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78(5), 539-548.
- Ledent, C. , Valverde, O. , Cossu, G. , Petitet, F. , Aubert, J.F. , Beslot, F. , Böhme, G.A. , Imperato, A. , Pedrazzini, T. , Roques, B.P. , Vassart, G. , Fratta, W. yParmentier, M. (1999) Falta de respuesta a los cannabinoides y reducción de los efectos adictivos de los opiáceos en ratones knock-out para el receptor CB1. *Ciencia*, 283 (5400), 401-4.
- Ligresti, A., De Petrocellis,L. y Di Marzo, B. From Phytocannabinoids to Cannabinoids Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Trough Complex Phaymacology. (2016). *Physiol Rev*, 96 (4), 593-659.
- Reiter, L. T., Potocki L., Chien S., Gribskov M. y Bier E. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*." *Genome Res*,11(6), 1114-1125.
- Santalla, M.,Portiansky, E L. yFerrero, P.V. (2016). "*Drosophila melanogaster*, un modelo animal emergente en el estudio de enfermedades cardíacas humanas." *Rev Argent Cardiol*, 84(5), 424-30.

- Santalla, M., Valverde, C. A., Harnichar, E., Lacunza, E., Aguilar-Fuentes, J., Mattiazzi, A. y Ferrero, P. (2014). "Aging and CaMKII alter intracellular Ca²⁺ transients and heart rhythm in *Drosophila melanogaster*." *PLoS One* 9(7)
- Sellin, J., Albrecht, S., Kölsch, V. & Paululat, A. Dynamics of heart differentiation, visualized utilizing heart enhancer elements of the *Drosophila melanogaster* bHLH transcription factor Hand. *Gene Expr. Patterns* 6, 360–375 (2006).
- Vennekens, R., Oswainik, G., y Nillus, B., (2008). Vanilloid transient receptor potential caption channels: an overview. *Curr Pharm Des*, 14(1), 18-31.
- Vidal, R. Castro, E. y Pazos, A. (2009) Capítulo 2: *avances recientes en la farmacología del sistema endocannabinoide*, "Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides" (pp.29-47), Sociedad Española de Investigación sobre Endocannabinoides (SEIC). Madrid, España.

Financiamiento

Este proyecto forma parte de uno mayor financiado por la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica PICT 2014-2549 dirigido por la Dra Paola Ferrero.