



Estudio de la actividad antiviral de extractos de hojas de *Cannabis sativa L* y *Cannabis indica* con distinto contenido de cannabinoides.

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Autora: Mariana Farengo

Directora: Dra. Erina Petrera

Lugar de trabajo: Laboratorio de Virología: agentes antivirales y citoprotectores,
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad
de Buenos Aires.

2024

Los resultados presentados en este trabajo de tesis se presentaron de forma oral en las XXVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores Asociación de Universidades Grupo de Montevideo (AUGM) en Sucre, Bolivia, del 7 al 9 de septiembre de 2022.

Mariana Farengo, Erina Petrera. “Actividad antiviral de extractos etanólicos de hojas de cannabis”

Los resultados presentados en esta tesis obtuvieron el Premio al Mejor Póster Científico en la categoría Aporte novedoso en ciencia sobre cannabis en el III Concurso Nacional de Pósters Científicos sobre Cannabis en la Expocannabis 2022. Buenos Aires, 17 de octubre de 2022.

Mariana Farengo, Erina Petrera. “Actividad antiviral de extractos etanólicos de hojas de cannabis”

Agradecimientos

A Erina por permitirme hacer la Tesis con ella. Por enseñarme, ayudarme, tener mucha paciencia, confiar en mí y siempre tener palabras de aliento. Por presentarme oportunidades que sin ella nunca me hubiese animado a aprovechar. La mejor Directora que podría haber tenido.

A mis padres por apoyarme y bancarme todos estos años. Por ayudarme a venir a vivir a Buenos Aires y por estar siempre listos para escuchar, aconsejar y ayudar.

A mi prima del corazón, Guada, por ser una amiga incondicional desde toda la vida. Por tener siempre las palabras justas y ese corazón enorme para estar en los momentos difíciles y en los más felices también. Por nunca soltarme la mano y por permitirme ser quién soy.

Gracias primi. Sos única.

A “Los Fiol” por ser familia desde que tengo memoria, por estar siempre presentes, por el amor incondicional y por alentarme para llegar hasta acá.

A “Los Vecinos” por los días de playa y lago, las excelentes charlas, el cariño y el aliento constante para lograr mis objetivos.

A la tía Grace y a toda su familia, Lolo, Lu, Pau y Agus, por recibirme ni bien llegué a Buenos Aires, ayudarme en esos primeros meses tan difíciles y estar siempre atentos a lo que necesitara. Gracias.

A Elsa, Sabina y Aimé por invitarme a merendar cosas ricas y tenerme siempre presente.

A cada amigo y amiga que me alentó y ayudó a pasar la facu y llegar hasta acá.

A Exactas que me abrió las puertas, me permitió hacer una carrera, estudiar algo que amo y conocer gente maravillosa.

GRACIAS.

Resumen

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la actividad antiviral de extractos de hojas de *Cannabis sativa L* y *Cannabis indica*, contra los herpesvirus humanos de tipo 1 y 2.

Se obtuvieron 3 extractos etanólicos de hojas de distintas variedades de cannabis: Medikit (M), Strawberry Lemonade (SL) y Critical Cure (CC2) que poseen distintas concentraciones de los fitocannabinoides CBD y THC.

Se determinó la citotoxicidad de los tres extractos obtenidos en células Vero después de 48 horas de incubación. Se obtuvieron valores de CC₅₀ mayores a 198 µg/ml.

La evaluación de la actividad antiviral de los extractos se realizó mediante el ensayo de inhibición del rendimiento viral. Los tres extractos inhibieron a las tres cepas del virus HSV-1 utilizadas (KOS, B2006 e YK608) y a la cepa G del virus HSV-2, las que fueron inoculadas a distintas multiplicidades de infección. Las CE₅₀ obtenidas fueron de 35, 35,3 y 35 µg/ml para M, SL y CC2 respectivamente, alcanzando porcentajes de inhibición del 99,9%. Asimismo, los extractos inhibieron la multiplicación de la cepa YK608, lo que se pudo observar por microscopía de fluorescencia.

Es importante aclarar que los extractos fueron capaces de inhibir también a la cepa B2006 de HSV-1 que es resistente al aciclovir, la droga de uso en clínica.

El análisis químico por HPLC y cromatografía de capa delgada de los extractos etanólicos confirmó que los tres tienen distintas proporciones de los cannabinoides CBD y THC, así como también de otros fitocannabinoides. A pesar de esto, los tres presentaron muy buena actividad antiviral lo que sugiere que ésta no se debería específicamente a la presencia de los cannabinoides analizados sino a una mezcla de compuestos que podrían estar participando del efecto séquito.

Los resultados de este trabajo de tesis muestran que los extractos de hojas de cannabis, una parte de la planta que generalmente se desecha, presentan actividad antiviral lo que los postula como potenciales fitomedicamentos.

Abstract

The main goal of this Thesis was to determine the antiviral activity of *Cannabis sativa L* and *Cannabis indica* leaf extracts against human herpes virus type 1 and 2.

Three ethanolic leaf extracts were obtained from three different varieties of *Cannabis*: Medikit (M), Strawberry Lemonade (SL) and Critical Cure (CC2), which contain different phytocannabinoids CBD and THC concentrations each.

The cytotoxicity of each of the three extracts was determined in Vero cells after a 48 hour incubation. CC₅₀ values higher than 198 µg/ml were obtained.

The antiviral activity of the extracts was studied through the virus yield reduction assay. The three extracts did inhibit the three HSV-1 strains (KOS, B2006 and YK608) and the HSV-2 G strain. The viruses were inoculated using different multiplicity of infection, reaching inhibition percentages of 99,9%. The obtained EC₅₀ were of 35, 35,3 and 35 µg/ml for M, SL and CC2 respectively. Likewise, the extracts inhibited the multiplication of strain YK608, which could be observed by fluorescence microscopy.

It is very important to notice that the extracts were able to inhibit the B2006 strain which is resistant to acyclovir, the drug that is used to treat herpes nowadays.

The HPLC and thin layer chromatography analysis of the ethanolic extracts confirmed that the three have different CBD and THC cannabinoid proportions as well as different phytocannabinoids quantities. Despite these differences all of them have a very good antiviral activity. This suggests that this activity is not due to the presence of the individual cannabinoids but to the sum of the properties of each compound. Which is known as the entourage effect.

The results of this Thesis show that the cannabis leaf extracts, obtained from a part of the plant that is normally thrown away, have antiviral activity thus making them potential phytomedicines.

Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Introducción.....	7
Virus Herpes Simplex.....	7
Plantas medicinales.....	10
Cannabis.....	11
Hipótesis y Objetivos.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivos.....	18
Materiales y Métodos.....	19
Materia prima.....	19
Obtención de los extractos.....	19
Análisis de los extractos.....	19
Cultivos celulares.....	20
Virus.....	20
Citotoxicidad.....	20
Actividad antiviral.....	21
Ensayo de rendimiento viral.....	21
Titulación por el método de formación de placas de lisis.....	21
Infección con HSV-1 YK608.....	22
Resultados.....	23
Extractos.....	23
Obtención de los extractos.....	23
Análisis de los extractos.....	23
Citotoxicidad.....	25
Actividad antiviral.....	26
Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-1 KOS.....	26
Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-1 B2006 (TK-).....	29
Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-1 YK608.....	32
Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-2 G.....	34
Discusión.....	38
Conclusiones.....	40
Referencias bibliográficas.....	41

Introducción

La emergencia de virus nuevos y la reemergencia de viejos conocidos han puesto en evidencia la falta de terapias antimicrobianas.

La demanda de antivirales ha aumentado en los últimos años debido a distintos factores, como el aumento de enfermedades virales crónicas entre las que se encuentran el HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) y la hepatitis B y C y la reaparición de virus que se creían erradicados. El calentamiento global también contribuye a que haya más zonas propicias para los vectores virales como los mosquitos, y el avance del humano sobre territorios naturales obliga a los animales a vivir en contacto estrecho con estos aumentando la probabilidad de aparición de virus zoonóticos. Además, con la alta posibilidad que existe de viajar a distintos lugares y la cantidad de gente que se moviliza a nivel mundial, los virus pueden trasladarse rápidamente de un lugar a otro y si son altamente transmisibles, transformar un pequeño brote en una pandemia (Ka-Wai Hui E. 2006).

Virus Herpes Simplex

Los virus del herpes simplex de tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) pertenecen a la familia α -herpesviridae, son virus envueltos con genoma de ADN. La transmisión del virus se produce cuando mucosas, heridas o fluidos corporales de una persona infectada entran en contacto con mucosas o piel lastimada de una persona sana. Luego de la primoinfección, el virus permanece en un estado de latencia hasta la reactivación. HSV-1, que produce lesiones orofaciales establece su latencia en el ganglio del trigémino, mientras que HSV-2 que produce lesiones genitales, establece su latencia en los ganglios del sacro. Durante el período de reactivación, que puede ser con o sin lesiones, se producen gran cantidad de partículas virales, por lo que el riesgo de contagio es muy alto. En especial si la reactivación se da sin lesiones y la persona no sabe que está infectada (Whitley RJ, 1996).

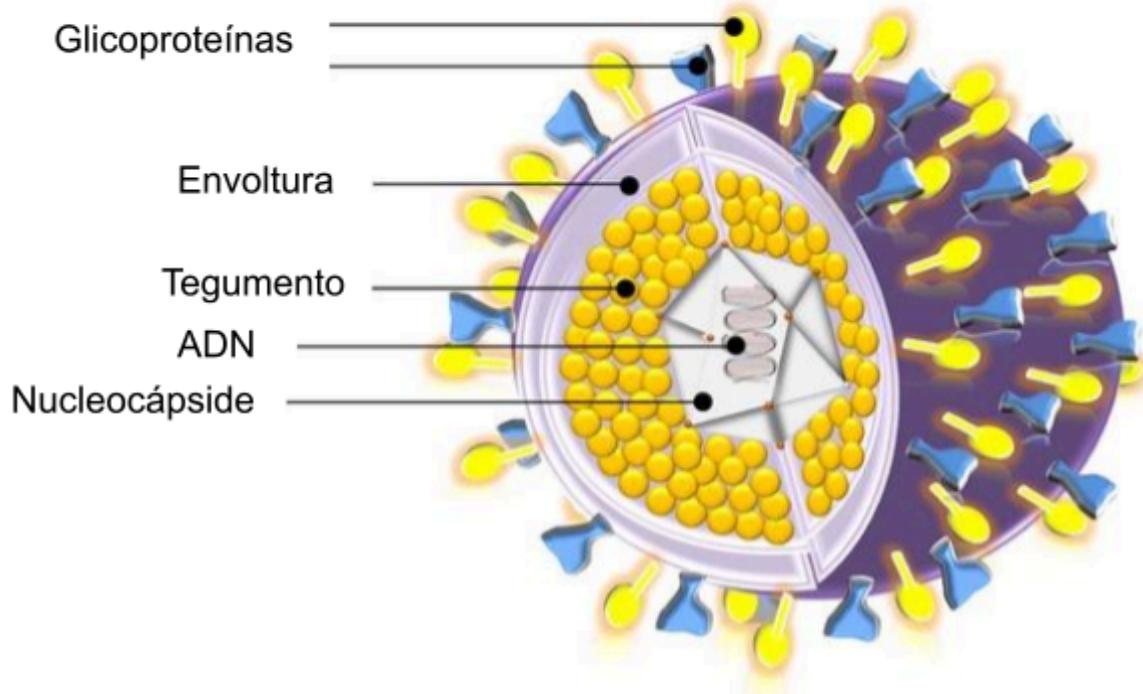


Figura 1: Esquema de la estructura de los virus del Herpes Simplex tipo 1 y 2 (Elbadawy, Hossein 2012).

Luego de la infección con el virus o durante los períodos de reactivación con síntomas, se producen lesiones en la piel y mucosas. Estas lesiones son vesículas, similares a ampollas que se llenan de líquido con restos celulares, células inflamatorias y gran cantidad de virus. La aparición de estas ampollas puede estar acompañada de otros síntomas como fiebre, irritabilidad, inflamación de los ganglios y dolor y picazón en las áreas afectadas (Mathew Jr J *et al*, 2023).

Según las últimas estimaciones disponibles de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 67% de la población mundial menor a 50 años, está infectada con HSV-1. Mientras que el 13% de la población mundial de entre 15 y 49 años está infectada con el HSV-2. La infección con este virus afecta dos veces más a mujeres que a hombres y además aumenta la probabilidad de contraer HIV (www.who.int, 2020).

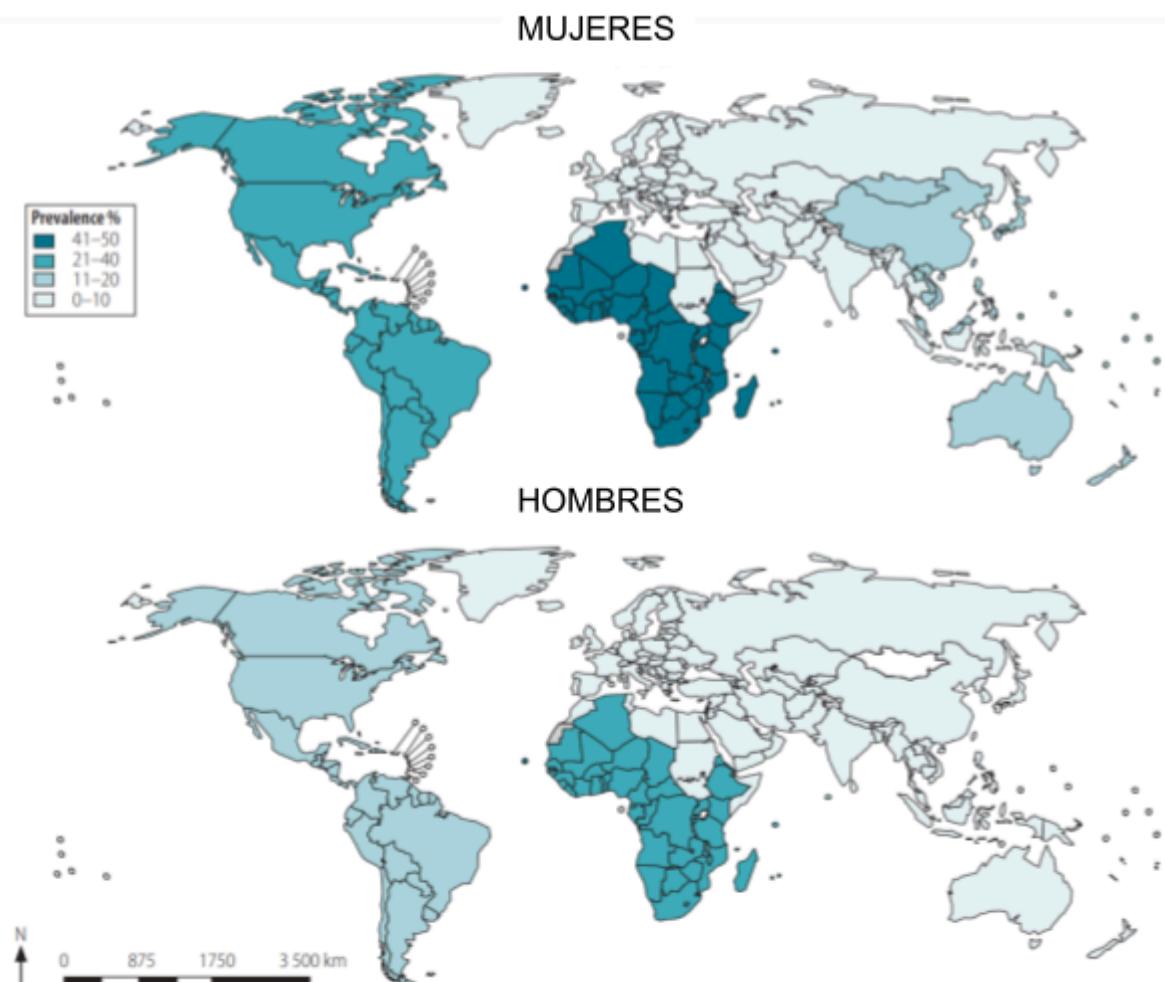


Figura 2: Proporción de mujeres y hombres de entre 15 y 49 años infectados con HSV-2 en los distintos países del mundo. Datos del año 2016 (James, Charlotte et al, 2020).

Algunos de los antivirales más utilizados para tratar estos virus son Aciclovir, Farmaciclovir y Valaciclovir, sin embargo, ya se conocen cepas resistentes a algunos de ellos.

El desarrollo de nuevos agentes antivirales específicos es un desafío. Por un lado, las drogas deben ser muy selectivas y por ende llevan a una alta tasa de mutación y al surgimiento constante de nuevas poblaciones virales. Por otro lado, es difícil encontrar antivirales específicos de amplio espectro dado que aún dentro de una misma familia de virus las proteínas virales pueden ser muy distintas. Además, a la hora de encontrar un antiviral eficiente, se debe tener en cuenta su toxicidad en las células del organismo infectado. Por lo tanto, los antivirales selectivos deben actuar contra las proteínas virales y al mismo tiempo, provocar el menor daño posible a la célula hospedadora (Berang K, 2023).

En relación con la falta de antivirales disponibles y la dificultad de encontrar uno específico para el virus que se desea tratar, se encuentra la resistencia de los virus a las drogas. Para las personas con infecciones virales crónicas como son por ejemplo la del HIV o la del virus del herpes, la posibilidad de desarrollar una resistencia a los antivirales que utiliza diariamente es aún mayor. Cuando esto ocurre, la medicación deja de actuar y hay que buscar una nueva droga para combatir la infección. Además, estos virus que adquirieron la resistencia a la droga pueden contagiarse al resto de la población aumentando el número de personas infectadas con un virus resistente.

Plantas medicinales

El uso de plantas para el tratamiento de enfermedades surge con la necesidad de curar los males que afectan a las distintas poblaciones desde la antigüedad. La evidencia escrita más antigua sobre el uso de plantas medicinales data de hace cinco mil años y fué encontrada en una losa de arcilla en Nagpur (India) (Petrovska BB, 2012).

Con el avance de la ciencia muchas de las drogas presentes en las plantas se aislaron e incluso comenzaron a sintetizarse de forma artificial para ser usadas en distintos medicamentos. Por ejemplo, el ácido acetil salicílico, principal componente de la aspirina fue aislado por primera vez de la corteza del sauce (Miner Jonathan y Hoffhines Adam, 2007).

Según la OMS el 80% de la población mundial depende del uso de plantas para el cuidado de su salud (Farnsworth NR, et al, 1985). Es interesante tener en cuenta que la mayoría de estas plantas crece de forma natural en un ecosistema adecuado.

Muchos estudios demuestran el potencial que tienen las plantas para tratar los virus del herpes (Garber A, et al, 2021). Por ejemplo, la utilización de extractos etanólicos de la corteza del tallo de la guanábana (*Annona muricata*) y el extracto a base de agua de las partes aéreas de la petunia (*Petunia nyctaginiflora*) demostraron inhibir el efecto citopático viral del HSV-1 (Padma P et al, 1998).

En otro estudio se utilizaron extractos etanólicos de hojas de Ficus (*Ficus benjamina*) y de lirio o azucena (*Lilium candidum*). Ambos extractos demostraron tener actividad antiviral contra HSV-1 y HSV-2 (Yarmolinsky L et al 2009).

Por otro lado, durante varios años las investigaciones en nuestro laboratorio se focalizaron en la obtención y el estudio de moléculas de origen natural presentes en hojas de la planta *Melia azedarach* L., que podrían ser utilizadas como drogas antivirales y

antiinflamatorias/inmunomoduladoras a la vez. Así demostramos que el principio antiviral presente en los extractos semipurificados denominado meliacina (MA) inhibe la síntesis de determinadas proteínas tardías que participan en la replicación del genoma y en el ensamblado del HSV-1 (Villamil S.M. *et al*, 1995) impidiendo su propagación (Alché L.E.,*et al*, 2002). MA potencia la acción antiherpética del aciclovir (ACV) y del foscarnet, e inhibe a una cepa mutante de HSV-1 TK-, sugiriendo que presenta un blanco de acción diferente al ACV (Barquero A.A. *et al*, 1997). En condiciones *in vivo*, MA impide el desarrollo de la queratitis estromal herpética (QH) en ratón disminuyendo significativamente la aparición de los signos de enfermedad, la carga viral y la severidad de las lesiones oculares causadas por la respuesta inmunopatológica inducida por el HSV-1. Los resultados obtenidos indican que MA ejerce tanto una acción antiviral como antiinflamatoria en dicho modelo de infección experimental (Alché L.E. *et al*, 2000; Pifarré M.P. *et al*, 2002). Por otra parte, MA inhibe la replicación del HSV-2 *in vitro* (Petrera E. y Coto C.E., 2014). y al evaluar su efecto terapéutico en un modelo de infección genital de ratones hembra con el HSV-2 y la posterior administración tópica de MA por vía intravaginal, se encontró que la sobrevida aumenta mientras que la severidad de la enfermedad disminuye, así como también la diseminación viral en los fluidos vaginales que presentan niveles de IFN-γ y TNF-α más elevados que los de los ratones infectados sin tratar (Petrera E. y Coto C.E, 2009).

Cannabis

La planta del cannabis ha sido utilizada de forma medicinal desde hace muchos años. En relación al tratamiento de distintas afecciones, ya hay evidencias de su uso en la medicina china del año 2737 aC (Warf, Barney, 2014).

Se cree que la planta de cannabis surgió en Asia Central, específicamente en Mongolia y sur de Siberia, aunque también hay quienes dicen que surgió en el valle del río Huang He (centro de China), en las montañas del Hindú Kush o en Afganistán. Posiblemente su distribución geográfica haya ido variando con el crecimiento y deshielo de los glaciares y a partir del período paleolítico, su distribución estuvo estrechamente relacionada a los pueblos nómadas que la utilizaban. Desde China, el cannabis llegó a Japón y Corea alrededor del año 2000 aC. Entre los años 2000 aC y 1000 aC las invasiones indoarias llevaron el cannabis a India, desde donde llegó al Tibet y Nepal alrededor del siglo VII dC.

Las tribus nómadas de Asia Central llevaron el cannabis a través de la ruta de la seda a Oriente Medio y Europa Oriental y a partir del surgimiento de distintas rutas de comercio y la migración de los pueblos, junto con las invasiones, el cannabis fué distribuyendose por distintas partes del

mundo. Por ejemplo, la planta llegó a España en el siglo VIII dC de la mano de las invasiones Moras y se distribuyó en África vía Egipto y Etiopía alrededor del siglo XIII dC (Warf, Barney, 2014).

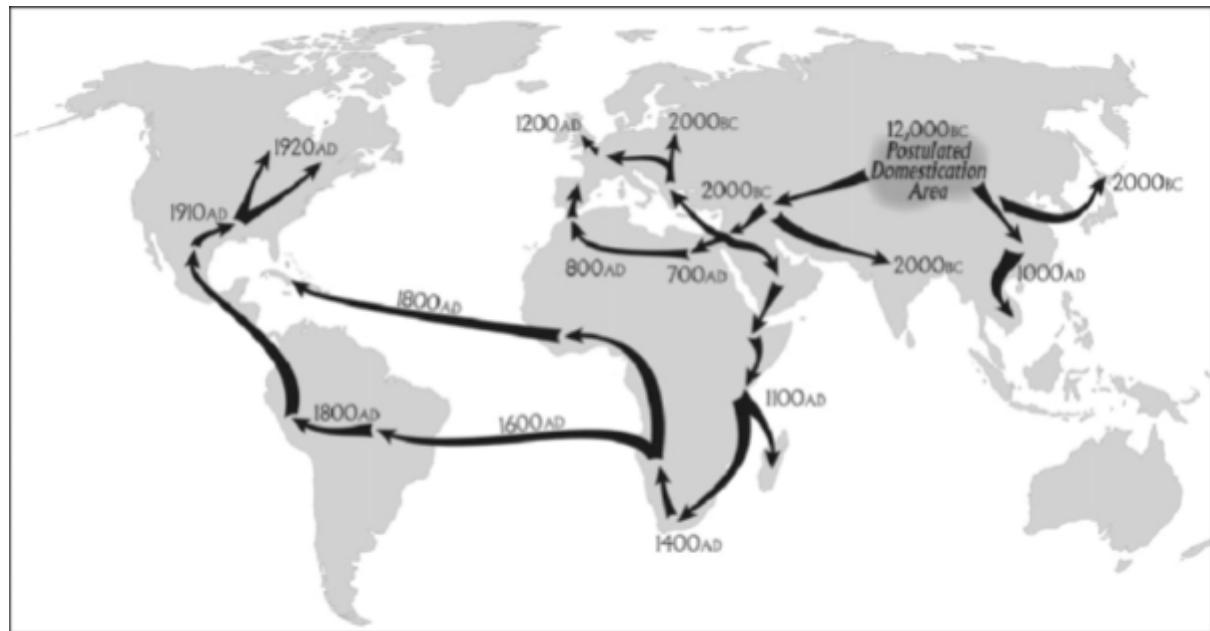


Figura 3: Migración y distribución histórica de la planta de *Cannabis sativa*. (Warf, Barney, 2014).

El Cannabis es un género de la familia Cannabaceae, la misma familia dentro de la que se encuentra el lúpulo. Dentro del género Cannabis, se encuentran tres especies: *Cannabis indica*, *Cannabis ruderalis* y *Cannabis sativa*. Sin embargo, las tres especies pueden cruzarse fácilmente entre sí, por lo tanto a veces se sugiere que hay una sola especie *Cannabis sativa* y que las distintas variedades se distinguen según sus componentes químicos (Schilling Susanne et al, 2020).



Figura 4. Planta de cannabis: Inflorescencia de cannabis (A); Planta de *Cannabis sativa* (B); Planta de *Cannabis indica* (C) (Monti *et al* 2021).

La parte más usada y codiciada de la planta son las flores, que se usan para la fabricación de aceites o para el consumo recreacional. Esta parte es la que contiene la mayor concentración de cannabinoides. Los tallos pueden ser utilizados para la extracción de fibras en el caso de las variedades de cáñamo y las hojas, muchas veces obtenidas luego de la defoliación, se usan con fines culinarios o para la preparación de tinturas.

El cannabis contiene una clase única de compuestos terpenofenólicos, los cannabinoides o fitocannabinoides, con un total de 565 constituyentes de los cuales 120 son fitocannabinoides. Los cannabinoides con mayor actividad son el tetrahidrocannabinol (9-THC) y el cannabidiol (CBD). Además la planta produce gran cantidad de metabolitos secundarios, muchos de los cuales son terpenos y flavonoides (Chandra S *et al*, 2017).

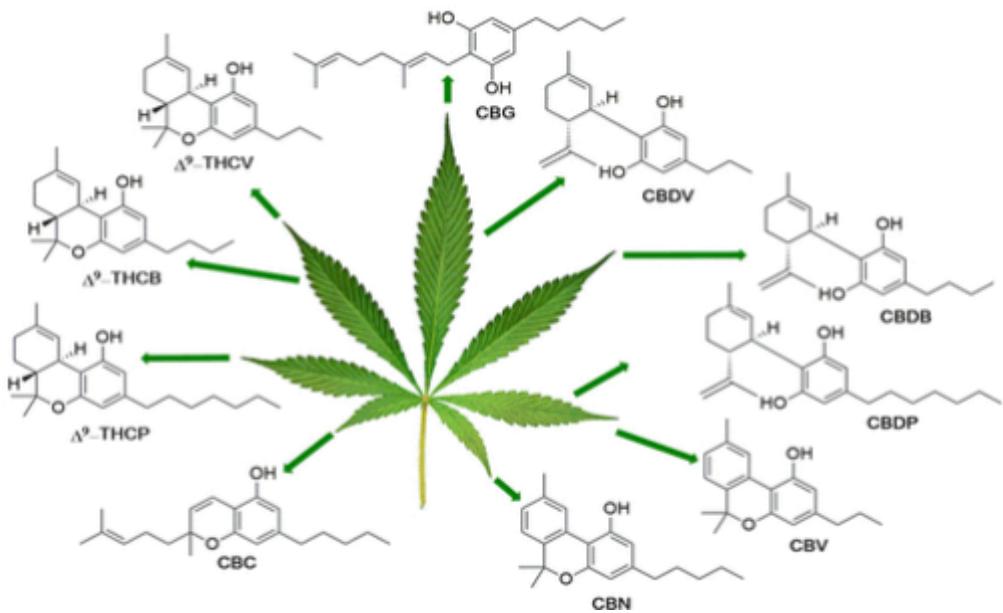


Figura 5: Esquema de los distintos cannabinoides que posee el cannabis (Sampson, Peter B. 2021).

Los cannabinoides son compuestos biológicos que se encuentran en el cannabis que se unen a los receptores cannabinoides del sistema endocannabinoide presente en mamíferos, reptiles, aves y peces. Los cannabinoides han demostrado ser útiles para tratar dolor crónico, epilepsia y para el tratamiento de la esclerosis múltiple entre otros (Sheikh NK *et al*, 2023).

El ácido cannabigerólico (CBGA) es el precursor de cuatro vías de biosíntesis de cannabinoides. Por un lado, mediante la enzima ácido cannabigerólico sintasa que cataliza la oxidación estero selectiva del CBGA se transforma en ácido cannabigerólico (CBGA) que luego a causa de la luz y el calor y a medida que va madurando la planta, se transforma en cannabigerólico (CBC). Por otro lado, mediante la enzima ácido tetrahidrocannabinólico sintasa el CBGA pasa a ácido tetrahidrocannabinólico (THCA), que también mediante la luz y el calor sufre una descarboxilación y pasa a tetrahidrocannabinol (THC). La tercera vía de síntesis es la del ácido cannabidiolico (CBDA) que ocurre mediante la enzima ácido canabidiolico sintasa y que por el mismo proceso de descarboxilación que los anteriores se transforma en cannabidiol (CBD). La última vía de síntesis es la del CBGA a cannabigerol (CBG) mediante una descarboxilación (Formato M *et al*, 2020).

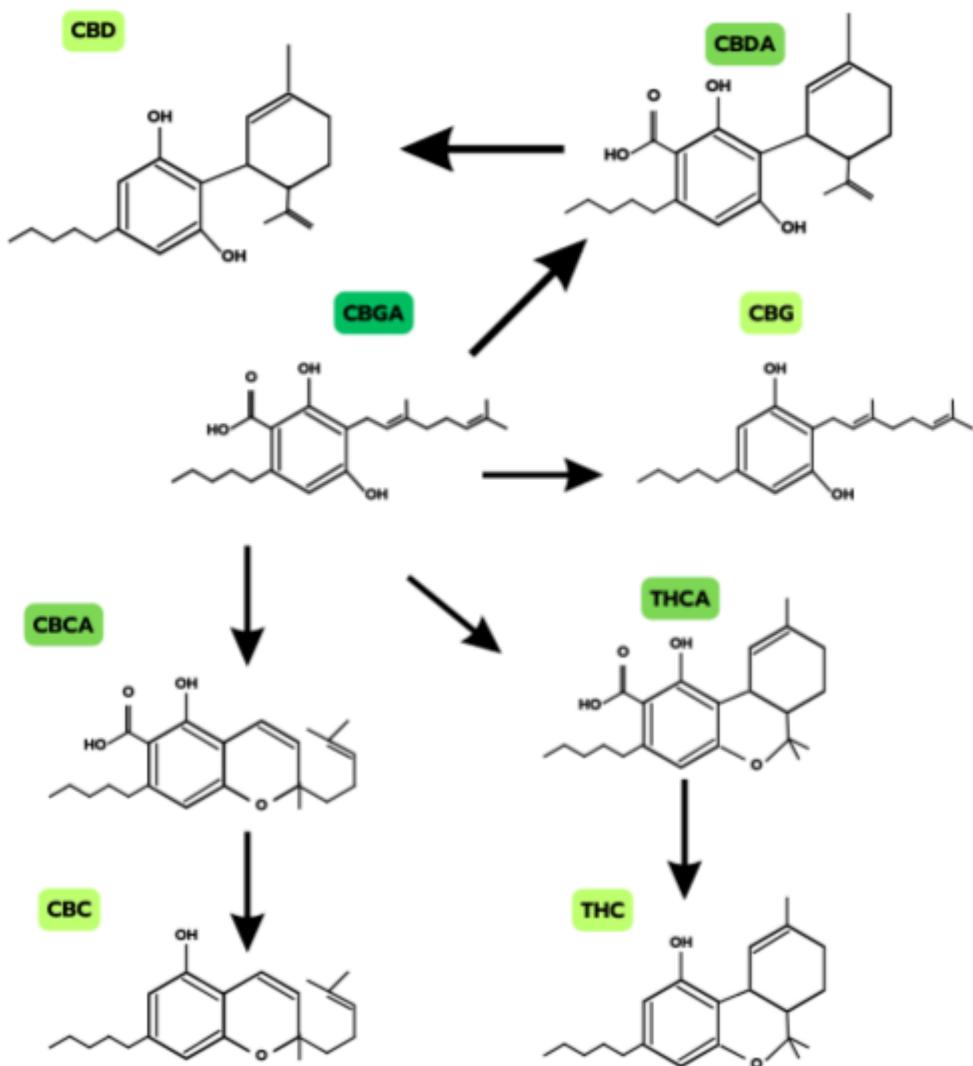


Figura 6: Esquema de las vías de biosíntesis de los distintos cannabinoides que se sintetizan a partir del CBGA.

Por otro lado, los terpenos son producidos en los tricomas presentes en las inflorescencias y en las hojas de la planta. En la mayoría de las variedades de cannabis se pueden encontrar monoterpenos como mirceno, α -pineno, limoneno y linalool y sesquiterpenos como β -cariofileno, α -humuleno, bisabolol y (E)- β -farneseno (Booth Judith K. et al, 2019).

La planta de cannabis posee numerosos metabolitos secundarios que son importantes compuestos bioactivos. Los principales compuestos que se extraen de distintas partes de la planta, hojas, semillas, flores, raíces y resina son terpenos, polifenoles y cannabinoides. Las semillas poseen gran cantidad de fibra, proteínas y aceites que son ricos en triglicéridos y

contienen una proporción alta de ácidos grasos poliinsaturados. Las hojas de la planta contienen terpenos, polifenoles, cannabinoides, aceites esenciales y alcaloides, los mismos compuestos que se encuentran en las flores.

Todos estos compuestos le confieren a la planta gran cantidad de usos, por ejemplo como pesticida, por la capacidad que tienen los extractos de inhibir a la colinesterasa. Experimentos *in silico* han demostrado el potencial que tienen los cannabinoides para combatir la malaria y la leishmaniasis así como la COVID. También se han hecho experimentos que indicarían que el CBD posee propiedades antiinflamatorias y que otras moléculas biológicas del cannabis servirían para tratar el cáncer, la epilepsia y además tendrían actividades neuroprotectoras. En resumen, la planta de cannabis presenta compuestos biológicos que le confieren a sus extractos propiedades antioxidantes, antibacteriales, anticoagulantes, insecticidas, anticancerígenas, antifúngicas, antiinflamatorias, anti epilépticas (Hourfane S *et al*, 2023).

La interacción entre los distintos compuestos que están presentes en los extractos se denomina efecto séquito. La actividad de un compuesto afecta a la actividad de otro compuesto mediante la farmacodinamia o mediante la farmacocinética. Las interacciones farmacodinámicas modifican la respuesta de los receptores y como consecuencia afecta la eficacia de la dosis del compuesto utilizada. La farmacocinética está relacionada con la biodisponibilidad del compuesto, por lo que la interacción de los distintos compuestos puede modificar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los mismos. Por otro lado, puede darse una amplia combinación de efectos, como efectos aditivos, sinergísticos y antagonistas. Los primeros son simplemente la suma de los efectos de los compuestos por separado, los efectos sinergísticos tienen que ver con que dos o más compuestos interactúen entre sí potenciando sus efectos y logrando un efecto mayor que la suma de los individuales. Por último, los efectos antagonistas en general se los considera negativos sin embargo, podría ser beneficioso si lo que disminuye son los efectos adversos (Christensen C *et al*, 2023).

Debido al efecto séquito, es más beneficioso utilizar el extracto crudo de una planta o de las hojas por sobre aislar alguno de los compuestos presentes en dicho extracto. Además, al no tener que aislar compuestos, la fabricación es más económica (Rasoanaivo P *et al*, 2011).

En el 2017 en Argentina se sancionó la Ley 27.350 (www.argentina.gob.ar, ley-27350-273801), finalmente reglamentada en el año 2020 que establece el marco regulatorio para la investigación médica y científica del uso del cannabis así como su uso medicinal. En el 2022 se sancionó la Ley 27.669 (www.argentina.gob.ar, ley-27669-365303) que regula el desarrollo de la industria del cannabis medicinal y el cáñamo industrial, finalmente reglamentada en agosto

del 2023. Esto llevó a la creación de la ARICCAME (Agencia Regulatoria de la Industria del Cáñamo y del Cannabis Medicinal).

Debido a la gran cantidad de personas que padecen infecciones causadas por los virus HSV-1 y HSV-2, las recientes reglamentaciones en cuanto al consumo y al estudio del cannabis medicinal y los potenciales beneficios que tiene, resulta interesante estudiar las propiedades antivirales de extractos etanólicos de las hojas de esta planta contra el virus del herpes.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

La hipótesis planteada es que los extractos de hojas de cannabis presentan actividad antiviral debido a la gran variedad de compuestos químicos que poseen, como terpenos, flavonoides y cannabinoides.

Objetivos

- 1- Obtener los extractos etanólicos de hojas de *Cannabis sativa L* y *Cannabis indica*.
- 2- Evaluar la actividad antiviral de los extractos obtenidos contra los virus HSV-1 y HSV-2.

Materiales y Métodos

Materia prima

Se utilizaron hojas de tres variedades distintas de cannabis, donadas por una cultivadora inscripta en el Registro del Programa Cannabis (REPROCANN).

Las variedades utilizadas fueron Medikit: 50% *Cannabis sativa* y 50% *Cannabis indica*, Strawberry Lemonade: *Cannabis sativa* dominante y Critical Cure: *Cannabis indica* dominante.

Obtención de los extractos

Los extractos se obtuvieron utilizando etanol absoluto como solvente según (Fischedick *et al*, 2010). Brevemente, se pesaron 15 g de hojas que se trituraron dentro de un tubo falcon al que se le agregaron 45 ml de etanol absoluto. El tubo falcon se colocó en agitador a 400 rpm durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 2000 rpm durante 30 segundos. Al finalizar la centrifugación, se colectó el sobrenadante y se realizaron dos extracciones más. Finalizadas las extracciones se procedió a evaporar el etanol en rotavapor. El etanol no pudo ser evaporado por completo por la formación de resinas, por lo que se trabajó con tinturas.

Para determinar las concentraciones utilizadas, se evaporó el solvente de 1 ml de extracto hasta la sequedad en la Savant y se pesó obteniendo una concentración de 82 mg/ml.

Este procedimiento se hizo con cada una de las variedades de hojas y finalmente se obtuvieron los tres extractos llamados M, SL y CC2 según la variedad de la que provienen.

Análisis de los extractos

El análisis de los extractos fue llevado a cabo por la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

El análisis cuantitativo se realizó por HPLC según metodología propia modificada respecto de Mandrioli *et al.* (2019) y validada para 7 cannabinoides (CBDA, CBG, CBD, CBN, Δ9-THC, CBC, THCA) en el laboratorio.

Para el análisis cualitativo de las muestras de tintura de cannabis se utilizó la metodología de Cromatografía en capa delgada (TLC, de sus siglas en inglés) según metodología descripta en Wagner & Bladt, 1996.

- Fase móvil: Hexano y éter dietílico (80:20)
- Fase estacionaria: Placas de Sílicagel HF 254

- Revelador: Sal B de Fast Blue al 0,5% en agua

Cultivos celulares

Se utilizó la línea celular Vero (células provenientes de riñón de mono verde africano). Las células fueron cultivadas en botellas T25 con Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (MEM 5%) y 50 µg/ml de gentamicina. Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ y mantenidas en MEM suplementado con 1,5 % de suero fetal bovino (MEM 1,5 %) luego de alcanzar la monocapa.

Virus

Se utilizaron tres cepas del virus HSV-1, la cepa KOS, la cepa B2006 (TK⁻), y el virus recombinante HSV-1 YK608.

La cepa B2006 es resistente al aciclovir y la cepa YK608 está modificada genéticamente y expresa la proteína de la cápside VP26 de expresión nuclear y la proteína del tegumento VP22 de localización citoplasmática, conjugadas con proteínas de color verde y rojo respectivamente. Además se utilizó la cepa G del virus HSV-2.

Los stocks virales se obtuvieron infectando monocapas de células Vero crecidas en botellas T25. Las células fueron inoculadas con 1 ml del virus con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,01 y se dejaron adsorber en estufa gaseada durante 1h, agitando cada 30 minutos. Finalizada la adsorción, se removió el inóculo, se agregaron 5 ml de MEM 1,5% y se incubó en estufa a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ hasta alcanzar un efecto citopático del 80-90%. Luego, se procedió a hacer dos ciclos de congelamiento y descongelamiento para lisar las células. Para finalizar, se cosechó el virus total y se lo fraccionó para su conservación a -75°C. El stock se tituló por el método de unidades formadoras de placas de lisis (UFP).

Citotoxicidad

El ensayo de citotoxicidad fue realizado en células Vero. Las células crecidas por 24 hs en monocapas se incubaron en microplacas de 96 pocillos durante 48hs con diluciones seriadas al medio de cada uno de los extractos de hojas de cannabis. Como control, se dejaron pocillos sin tratar, conteniendo solo MEM 1,5%. Pasado el período de incubación, se realizó el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) el cual es un compuesto de color amarillo que es reducido por enzimas mitocondriales a un compuesto de color azul violáceo y su densidad óptica se puede medir a 590 nm. Se asume que la reducción del compuesto es

debido a la actividad metabólica, es decir a la cantidad de células viables. Se agregaron 10 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y luego se incubó por 2 horas. Se removió el medio de cada pocillo y se resuspendió el precipitado de la sal de tetrazolio con 100 µL etanol 96%. Luego se midió la absorbancia a 500 nm en el lector de microplacas. Para cada una de las diluciones se calculó el porcentaje de viabilidad celular comparando la DO media con la DO del control de células que se tomó como el 100% de viabilidad.

A partir de estos resultados, se graficó la viabilidad celular en función de la dilución del extracto y se calculó la Concentración Citotóxica 50 (concentración del extracto que reduce la viabilidad celular en un 50%) para cada uno de los extractos. Para aquellos extractos en los que el valor obtenido fué mayor a 100, se consideró como una viabilidad del 100%.

Actividad antiviral

Ensayo de rendimiento viral

Se evaluó la actividad antiviral de los extractos frente a las cepas KOS y B2006 del virus HSV-1 y la cepa G del virus HSV-2 en células Vero, por medio de ensayos de inhibición del rendimiento viral.

Las células Vero fueron crecidas en microplacas de 96 pocillos con MEM 5% durante 24 hs. Luego, se infectaron con una m.i de 0,1 y 0,01 de cada una de las cepas de virus y se incubaron durante 1 h en estufa a 37°C con 5% de CO₂ para permitir la adsorción viral. Las células fueron tratadas luego de la adsorción con dos concentraciones de cada uno de los extractos, 70 µg/ml y 140 µg/ml y se dejaron pocillos sin tratar para usar como control de virus. Pasadas las 24 hs de incubación, se procedió a congelar la microplaca a -75°C hasta su posterior titulación por el método de UFP.

Titulación por el método de formación de placas de lisis

Los títulos virales se determinaron usando la técnica de formación de placas de lisis (UFP). Brevemente, células Vero cultivadas a confluencia en microplacas de 24 pocillos, fueron infectadas con diluciones seriadas al décimo de los sobrenadantes obtenidos en el ensayo de rendimiento viral. Luego de 1 h de adsorción, se retiró el inóculo, se agregó medio semisólido y se incubó a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 hs. Luego, las células se fijaron con formol al 10% y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Se contaron las UFP, se calcularon los títulos virales y se determinaron los porcentajes de inhibición.

A partir de los gráficos del porcentaje de inhibición en función de la concentración se calculó la CE₅₀, concentración del extracto que reduce el rendimiento viral en un 50% con respecto a las células infectadas sin tratar.

Infección con HSV-1 YK608

Las células Vero fueron crecidas sobre cubreobjetos en microplacas de 24 pocillos con MEM 5% y cultivadas a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO₂ durante 24hs. Al finalizar la incubación, las células fueron infectadas con HSV-1 YK608 con una m.i de 0,1 y luego de la adsorción fueron tratadas o no con 70 µg/ml de cada uno de los extractos. Se incubaron en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 hs y luego se fijaron con metanol a -20 °C durante 10 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS y se tiñeron los núcleos con DAPI. Los cubreobjetos se montaron con glicerina tamponada para ser observados en el microscopio de fluorescencia utilizando distintos filtros sobre el mismo campo y un aumento de 40X.

Resultados

Extractos

Obtención de los extractos

Para la obtención de los distintos extractos, se utilizaron hojas de cannabis de distintas plantas donadas por una cultivadora inscripta en el REPROCAN. Se utilizó etanol absoluto en frío como solvente porque se sabe que los cannabinoides se extraen bien con este solvente. Como se mencionó en materiales y métodos, el etanol no se pudo evaporar por completo debido a la formación de resinas.

Una vez finalizada la evaporación en rotavapor, se obtuvieron los tres extractos a partir de las tres variedades de hojas de Cannabis: Medikit (M), Strawberry Lemonade (SL) y Critical Cure (CC2) .

Análisis de los extractos

Los extractos fueron analizados por HPLC y cromatografía de capa delgada en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por la cátedra de Farmacognosia según lo especificado en Materiales y Métodos.

A continuación se muestra el cuadro 1 con los resultados obtenidos.

Cuadro 1: composición de los distintos extractos utilizados.

COMPUESTO	Extractos		
	M (mg/ml)	SL (mg/ml)	CC2 (mg/ml)
CBDA	61,35	36,21	22,2
CBG	2,92	2,39	nd
CBD	20,12	2,39	1,11
Δ9-THC (THC)	26,94	0,28	1,69
CBC	1,63	nd	0,43
THCA	59,39	1,52	8,23
*POTENCIA TOTAL CBD	74,05	34,15	20,58
*POTENCIA TOTAL THC	79,02	0,74	8,91

* La potencia CBD o THC se refiere a la cantidad potencial en mg/ml de esa sustancia que puede presentarse si la fracción ácida se decarboxila para dar las respectivas formas neutras.

La potencia se calcula de la siguiente manera:

- Potencia CBD: mg CBD + mg CBDA*0,877
- Potencia THC: mg THC + mg THCA* 0,877
- nd: no detectado (LOD CBD: 1,76 µg/ml; LOD CBG: 1,00 µg/ml)

Como se ve en el cuadro 1, cada uno de los extractos tiene distintas concentraciones de cannabinoides. La tintura M es la que tiene la mayor concentración de los distintos cannabinoides. Empezando por CBDA, el extracto M tiene 61,35 mg/ml mientras que SL y CC2 tienen 36,21 mg/ml y 22,2 mg/ml respectivamente. Los valores de CBG son similares entre M y SL teniendo el primero una concentración de 2,92 mg/ml, algo superior a los 2,39 mg/ml de SL y en la tintura CC2 no fué detectada la presencia de este compuesto. Para el caso del CBD,

uno de los compuestos más conocidos, la diferencia entre la concentración de M y los otros dos extractos es muy marcada. M tiene una concentración de 20,12 mg/ml mientras que SL tiene 2,39 mg/ml y CC2 1,11 mg/ml. Al observar el contenido de THC de los extractos, otro de los cannabinoides más conocidos, la diferencia entre M y los otros dos extractos también es muy grande. M tiene una concentración de 26,94 mg/ml seguido por CC2 con 1,69 mg/ml y SL con 0,28 mg/ml. El extracto SL no tiene cantidades detectables de CBC, M tiene 1,63 mg/ml y CC2 tiene 0,43 mg/ml. En cuanto a la concentración de THCA, también hay una gran diferencia entre M y los otros dos extractos. SL que es el de menor concentración tiene 1,52 mg/ml, seguido por CC2 con 8,23 mg/ml y finalmente M con 59,39 mg/ml. Con respecto a las potencias totales de CBD y THC, M tiene concentraciones de 74,05 mg/ml para la primera y 79,02 mg/ml para la segunda. Entre SL y CC2 también hay bastante diferencia, SL tiene una potencia total de CBD de 34,15 mg/ml mientras que la de CC2 es de 20,58 mg/ml. CC2 tiene una mayor potencia de THC con 8,91 mg/ml mientras que SL tiene 0,74 mg/ml.

Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los extractos se realizó la técnica de MTT, para ello se utilizaron células Vero crecidas en monocapas en microplacas de 96 pocillos e incubadas con diluciones seriadas al medio de cada uno de los extractos, durante 48 hs. Como control se dejaron células sin tratar, con MEM 1,5%. Finalizadas las 48 hs de incubación se realizó el ensayo de MTT. Para cada una de las concentraciones de extracto utilizadas y para cada uno de los extractos se comparó la DO obtenida con la DO del control cuya viabilidad celular se consideró del 100%.

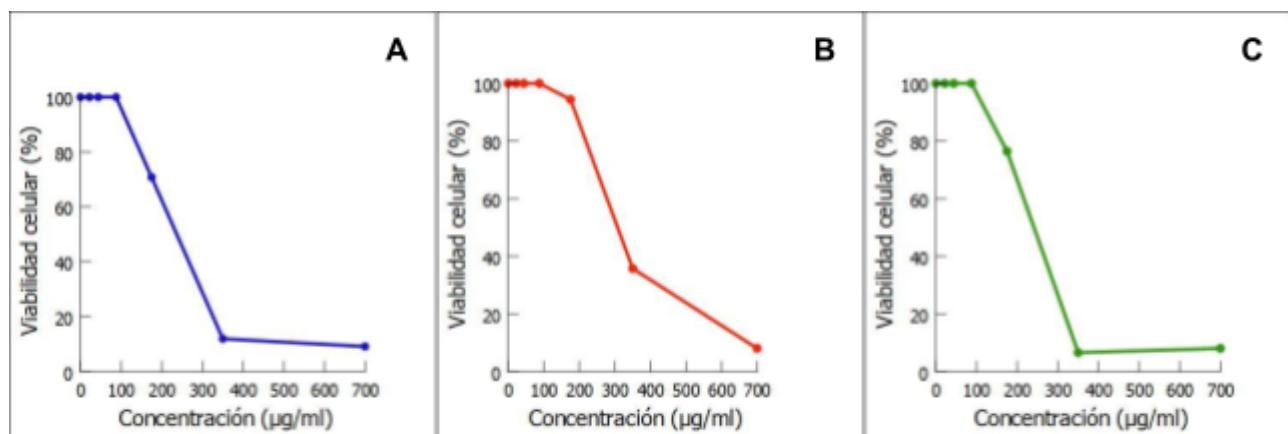


Figura 7: Citotoxicidad de los distintos extractos. La citotoxicidad fue realizada sobre células Vero tratadas durante 48 hs con diluciones seriadas al medio de los extractos y determinada por el método del MTT. Extracto M (**A**), extracto SL (**B**) y extracto CC2 (**C**).

Como se ve en la figura 7, en los tres gráficos se puede observar que hasta una concentración de 175 µg/ml la viabilidad celular es mayor al 70%. Sin embargo, al utilizar una concentración de 350 µg/ml la viabilidad celular disminuye drásticamente. La citotoxicidad observada puede deberse a la presencia de etanol en los extractos que no pudo ser evaporado por completo.

Cuadro 2: Concentración Citotóxica 50

Extractos	CC ₅₀ (µg/ml)
M	198,1
SL	298,9
CC2	202,4

A partir de los gráficos de viabilidad celular de la figura 7, se calculó la concentración citotóxica 50, que es la concentración del extracto que reduce la viabilidad celular en un 50% (Cuadro 2). El extracto con mayor CC₅₀, por lo tanto el menos citotóxico resultó ser SL.

Actividad antiviral

Una vez determinado el rango de concentraciones de los extractos que no son tóxicas para las células Vero, se evaluó la actividad antiviral de los mismos. Para ello se realizó el ensayo de inhibición del rendimiento viral con los distintos virus. La máxima concentración utilizada de los extractos en los ensayos fue de 140 µg/ml. Como se puede ver en el cuadro 2, en todos los casos la CC₅₀ es mayor que la concentración máxima utilizada pero además, para minimizar el efecto citotóxico, los ensayos de inhibición del rendimiento viral se realizaron durante 24 hs.

Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-1 KOS

Las células Vero fueron infectadas con HSV-1 cepa KOS utilizando dos multiplicidades de infección distintas: una m.i. de 0,01 y una m.i. de 0,1. Luego de la hora de adsorción se agregaron las distintas concentraciones de los extractos y se incubaron durante 24 hs. Al cabo de dicho tiempo se congelaron las microplacas y se cosecharon los sobrenadantes para determinar el título viral por el método de formación de placas.

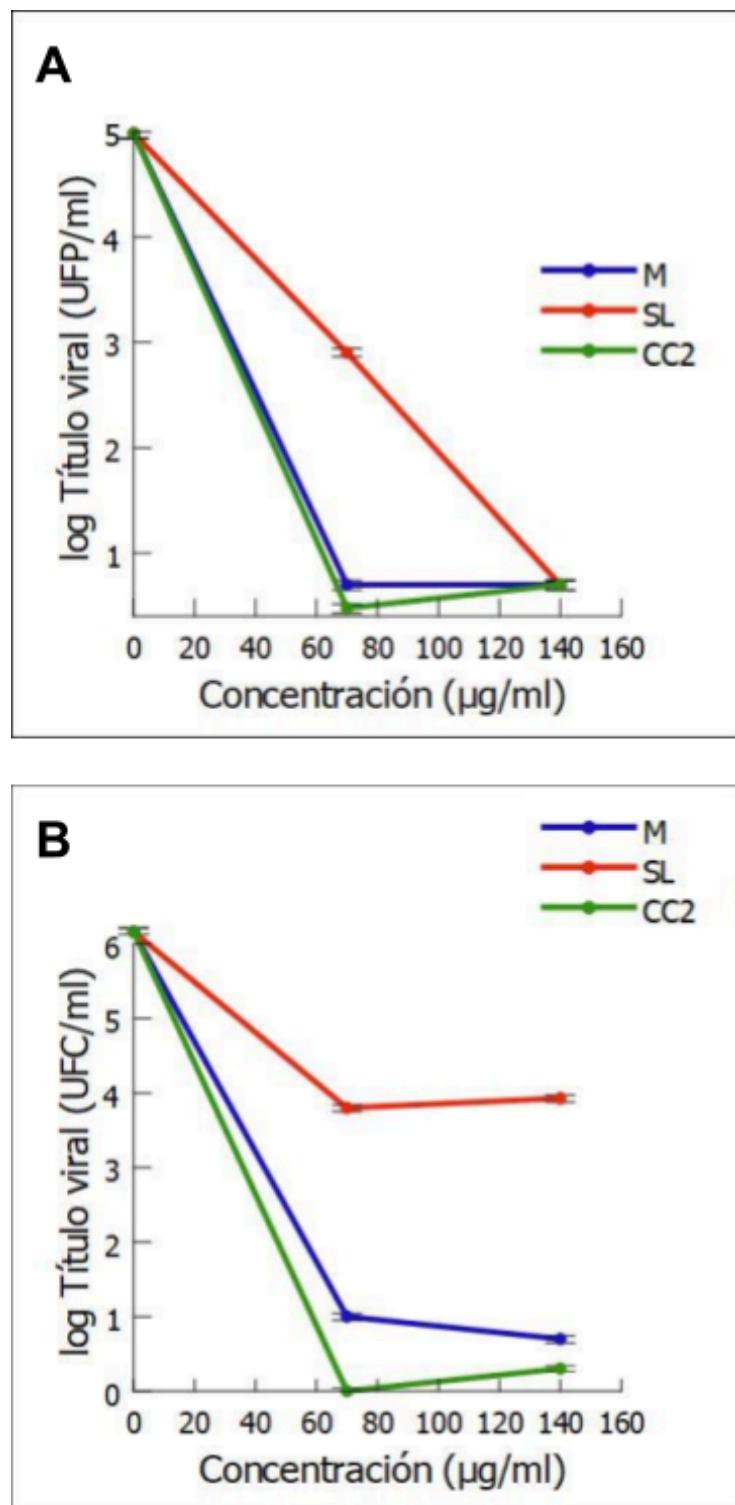


Figura 8: Inhibición del rendimiento viral. Células Vero infectadas con HSV-1 KOS fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los extractos durante 24 hs. El título viral fue determinado luego de 24 hs de tratamiento por la técnica de formación de placas. HSV-1 KOS m.i 0,01 (A); HSV-1 KOS m.i 0,1 (B).

En estos gráficos se puede ver que, en las concentraciones utilizadas y con ambas multiplicidades de infección, todos los extractos reducen la replicación del virus HSV-1 KOS. Los extractos M y CC2 reducen notablemente la replicación viral al infectar con una m.i de 0,01 aún en la concentración más baja utilizada (70 µg/ml), el primero disminuye el título viral en 4,3 logaritmos, mientras que el segundo disminuye el título viral en 4,5 logaritmos. No se observan grandes diferencias entre las dos concentraciones dado que al utilizar la concentración de 140 µg/ml ambos extractos disminuyen el título viral en 4,3 logaritmos. El extracto SL también disminuye la replicación viral a la concentración más baja ensayada pero en menor proporción que los extractos M y CC2, hay 2 logaritmos de diferencia con respecto al control. Al aumentar la concentración de SL (140 µg/ml) la inhibición obtenida es similar a la ejercida por los otros dos extractos, también de 4,3 logaritmos.

Cuando se infecta con la m.i de 0,1 nuevamente los extractos M y CC2 son los que presentan mayor inhibición y tampoco hay grandes diferencias entre las dos concentraciones utilizadas. En el caso de M, hay una disminución de aproximadamente 5 logaritmos con respecto al control (para ambas concentraciones) y en el caso de CC2 una disminución de aproximadamente 6 logaritmos también para ambas concentraciones. SL presenta una inhibición notablemente menor a la de M y CC2, de aproximadamente 2 logaritmos para las dos concentraciones utilizadas.

A partir de estos resultados, se calculó la CE_{50} y el IS para cada uno de los extractos obteniéndose los resultados presentados en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Concentración Efectiva 50 e Índice de selectividad de los extractos contra HSV-1 KOS

Extractos	CE_{50} (µg/ml)	CC_{50} (µg/ml)	IS
M	35	198,1	5,66
SL	35,3	298,9	8,47
CC2	35	202,4	5,78

Como se ve en el cuadro 3, los tres extractos presentan valores de CE_{50} muy similares, 35 µg/ml para M y CC2 y 35,3 µg/ml para SL. Los IS para M y CC2 también son muy parecidos, mientras que el valor de IS para SL es un poco superior.

A partir del experimento anterior, se determinaron los porcentajes de inhibición para las dos concentraciones de cada uno de los extractos y para ambas multiplicidades de infección.

Para determinar los porcentajes de inhibición de cada uno de los extractos se tomó como 100% de infectividad o 0 % de inhibición al control de virus.

Cuadro 4: Porcentaje de inhibición del rendimiento viral en células Vero infectadas con HSV-1 KOS y tratadas con los extractos en distintas concentraciones.

m.i	0,01		
Extracto	M	SL	CC2
Concentración	70 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,18	99,99
Concentración	140 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,99	99,99

m.i	0,1		
Extracto	M	SL	CC2
Concentración	70 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,51	99,99
Concentración	140 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,33	99,99

En el cuadro 4 se puede observar que todos los extractos tienen una inhibición de la replicación viral mayor al 99% en ambas concentraciones utilizadas y para ambas multiplicidades de infección. En algunos casos la inhibición llega al 99,99 %.

Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-1 B2006 (TK⁻)

Las células Vero fueron infectadas con la cepa B2006 de HSV-1 que es resistente al aciclovir utilizando dos multiplicidades de infección 0,01 y 0,1. Luego de la infección las células se trataron con dos concentraciones de cada uno de los extractos, se incubaron durante 24 hs y se determinó el título viral de los sobrenadantes por la técnica de formación de placas.

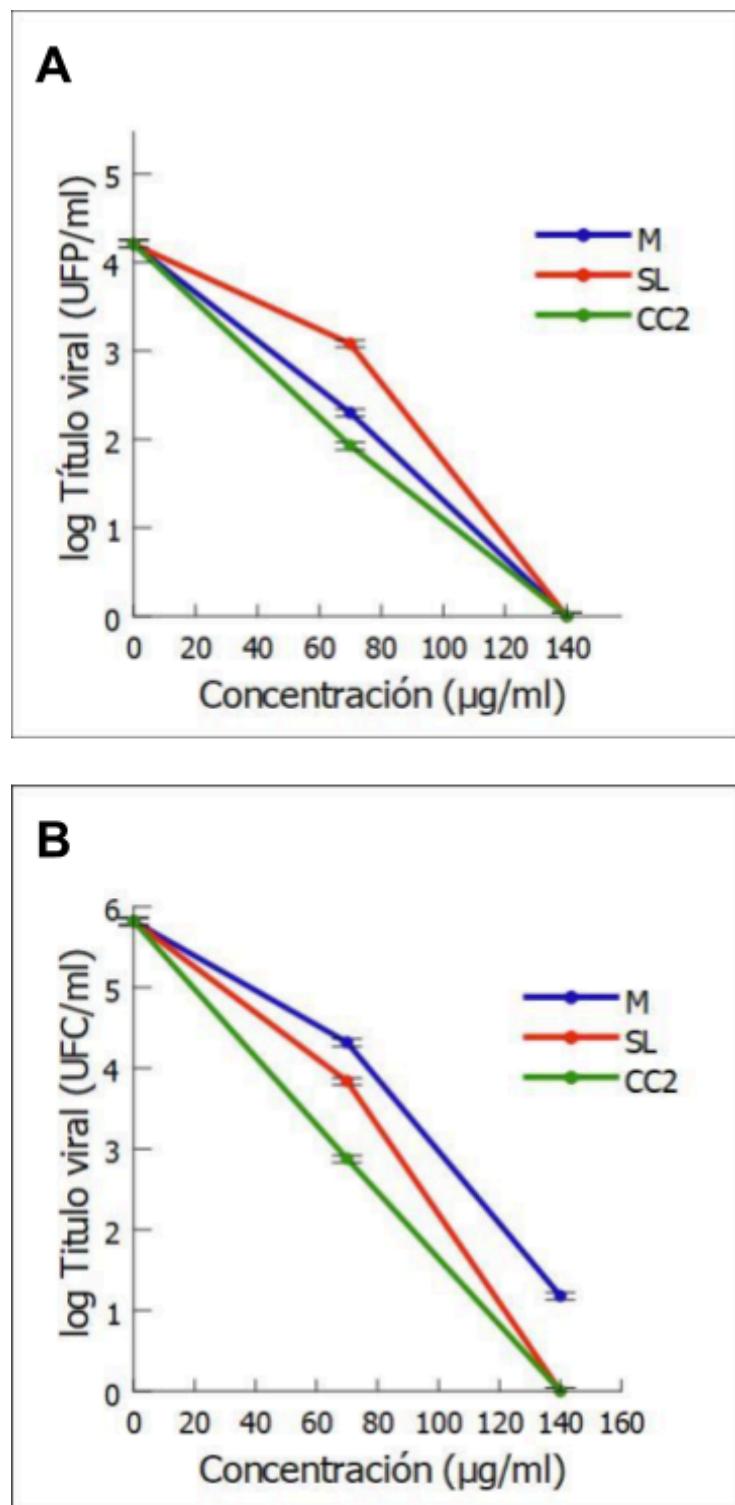


Figura 9: Inhibición del rendimiento viral. Células Vero infectadas con HSV-1 B2006 fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los extractos durante 24 hs. El título viral fue determinado luego de 24 hs de tratamiento por la técnica de formación de placas. HSV-1 B2006 m.i 0,01 (**A**); HSV-1 B2006 m.i 0,1 (**B**).

Como podemos observar en la figura 9, al infectar con la m.i de 0,01 se observa una reducción del título viral de 1 a 2 logaritmos para los tres extractos. Esta reducción se ve incrementada al tratar las células con concentraciones mayores de los extractos, llegando a una reducción de 4 logaritmos.

Cuando se infectaron las células con una m.i de 0,1 se observa que la reducción de los títulos virales es similar a la anterior y que es dependiente de la concentración de los extractos.

Cuadro 5: Concentración Efectiva 50 e Índice de selectividad de los extractos contra HSV-1 B2006.

Extractos	CE ₅₀ (μg/ml)	CC ₅₀ (μg/ml)	IS
M	31,28	198,1	6,33
SL	37,84	298,9	7,90
CC2	35,19	202,4	5,75

Como se puede ver en el cuadro 5, el extracto SL tiene la CE₅₀ más alta, de 37,84 μg/ml, seguido por CC2 con un valor de 35,19 μg/ml y por último con la menor CE₅₀ el extracto M con un valor de 31,28 μg/ml. Hay poca diferencia entre los IS obtenidos, SL es el que tiene el valor más alto con un IS de 7,9, seguido por M y CC2 con valores de 6,33 y 5,75 respectivamente.

Cuadro 6: Porcentaje de inhibición del rendimiento viral en células Vero infectadas con HSV-1 B2006 y tratadas con distintas concentraciones de los extractos.

m.i	0,01		
Extracto	M	SL	CC2
Concentración	70 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	98,75	92,50	99,47
Concentración	140 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,99	99,99

m.i	0,1		
Extracto	M	SL	CC2
Concentración	70 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	96,84	98,95	99,90
Concentración	140 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,99	99,99

Como se puede observar en el cuadro 6, al infectar con la m. i. de 0,01 los porcentajes de inhibición varían entre el 92,50 % y el 99,47% a bajas concentraciones pero llega a 99,99% a concentraciones mayores. Al aumentar la m.i. se observa que los porcentajes de inhibición se mantienen.

Podemos concluir que los extractos M, SL y CC2 presentan actividad antiviral contra la cepa B2006 de HSV-1 resistente al aciclovir.

Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-1 YK608

Las células Vero fueron crecidas sobre cubreobjetos durante 24 hs hasta alcanzar un 90-100% de confluencia, luego se infectaron con el virus HSV-1 YK608 a una m.i. de 0,01. Luego de la adsorción se trataron con 70 µg/ml de los distintos extractos durante 24hs. Posteriormente las células se fijaron con metanol a -20 °C durante 10 minutos, se lavaron con PBS y se tiñeron los

núcleos con DAPI. Los vidrios fueron montados, se observaron al microscopio de fluorescencia utilizando distintos filtros sobre el mismo campo y se fotografiaron.

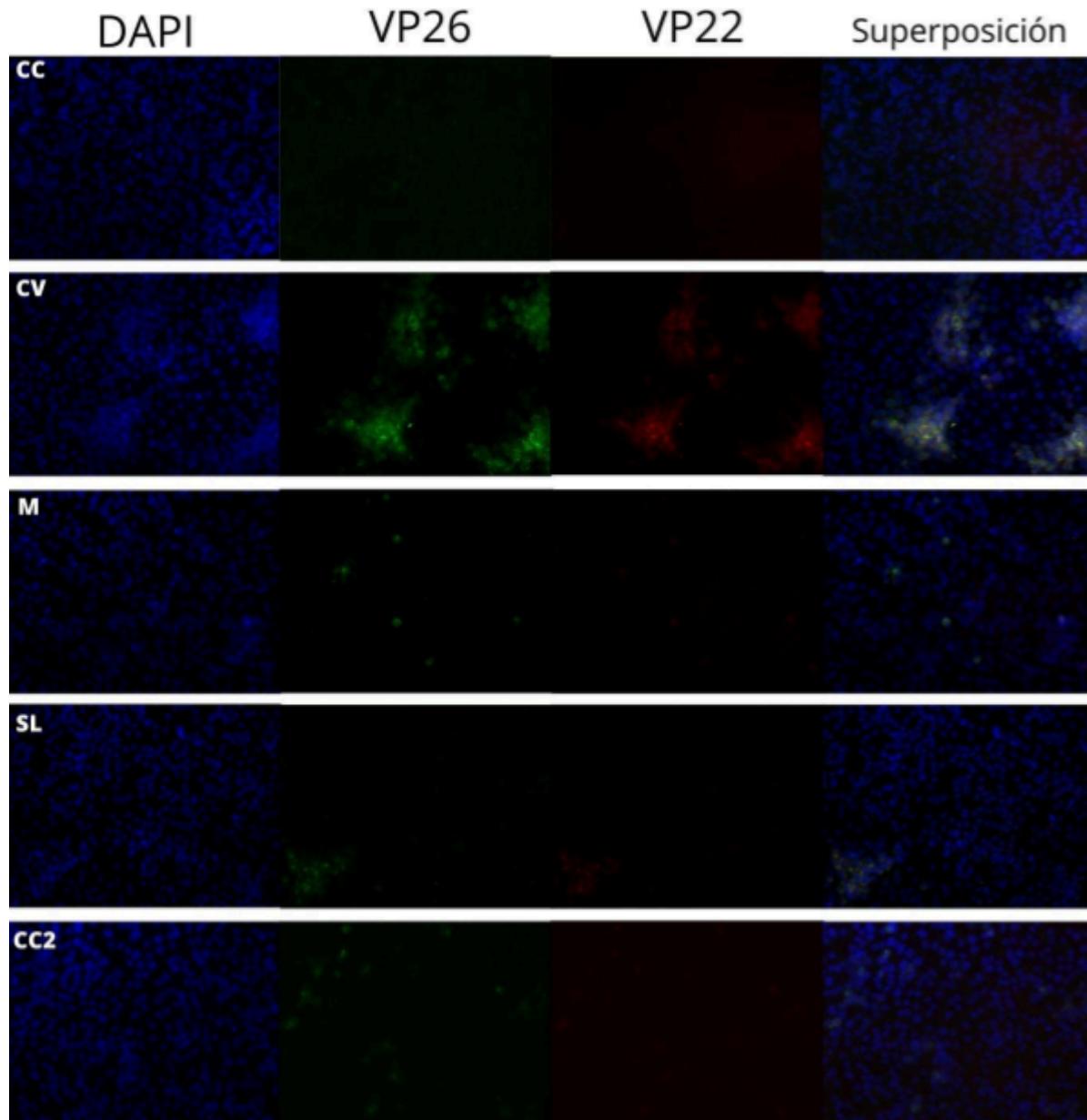


Figura 10: Efecto de los extractos de cannabis sobre la infección con la cepa YK608 de HSV-1. Las células Vero infectadas con HSV-1 YK608 y tratadas con 70 µg/ml de cada uno de los extractos se tiñeron con DAPI y se observaron al microscopio de fluorescencia. **CC:** control de células; **CV:** control de virus; **M, SL, CC2:** células infectadas y tratadas con el extracto indicado. **Superposición:** Corresponde a la superposición de las tres imágenes (DAPI+VP26+VP22). **Aumento:** 40 X.

La figura 10 muestra las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia. Se puede observar en la primera columna que tanto las células sin infectar como las infectadas y tratadas mantienen la integridad de la monocapa, como lo indican los núcleos teñidos de azul con DAPI. Además, como se esperaba, en el control de células sin infectar (CC) no hay fluorescencia de color rojo o verde correspondiente a la presencia de las proteínas del virus. En el control de virus (CV) se observa la fluorescencia de color verde correspondiente a la expresión de la proteína VP26 de localización nuclear y la fluorescencia de color rojo correspondiente a la expresión de la proteína VP22 de localización citoplasmática. Se pueden observar focos de gran tamaño y gran intensidad de fluorescencia. En la columna de superposición se pueden ver en amarillo los focos de infección expresando ambas proteínas virales. En las células infectadas y tratadas con los distintos extractos se observa que el tamaño de los focos de infección disminuye notablemente con respecto al control de virus, así como también la intensidad de fluorescencia de ambas proteínas virales. Los tres extractos inhiben la replicación del HSV-1 YK608, siendo el extracto M el que presentó mayor inhibición de la replicación viral. Además, presentó una mayor inhibición en la dispersión del virus célula a célula lo que se infiere por la presencia de células puntuales expresando las proteínas virales a diferencia de los focos de infección observados tanto en el CV como en los tratamientos con SL y CC2.

Actividad antiviral de los extractos de hojas de cannabis contra HSV-2 G

Las células Vero fueron infectadas con la cepa G del virus HSV-2 usando dos multiplicidades de infección: 0,01 y 0,1. Luego de la hora de adsorción fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los distintos extractos durante 24 hs. Se determinó el título viral mediante la técnica de formación de placas.

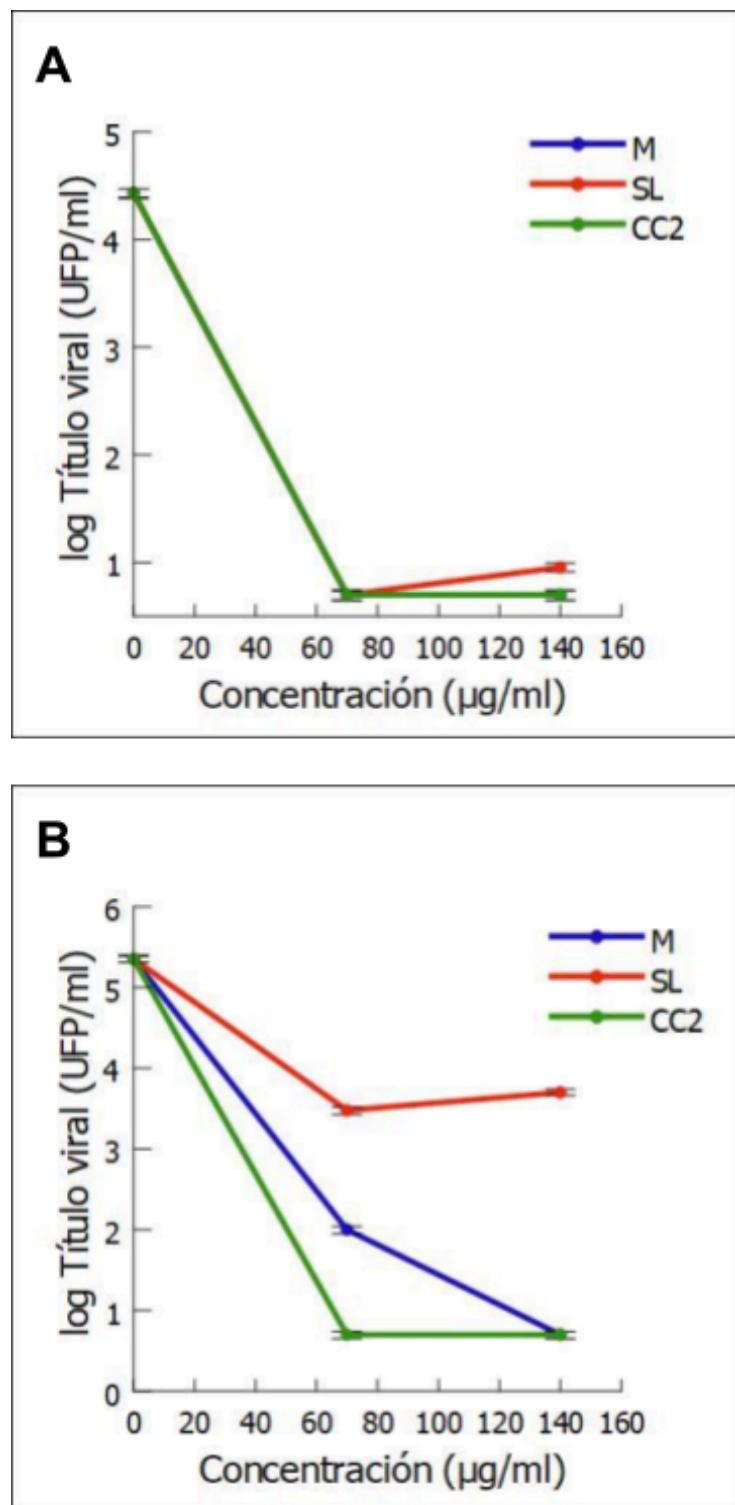


Figura 11: Inhibición del rendimiento viral. Células Vero infectadas con HSV-2 G fueron tratadas con diluciones seriadas al medio de los extractos durante 24 hs. El título viral fue determinado por la técnica de formación de placas. HSV-2 G m.i 0,01 (**A**); HSV-2 G m.i 0,1 (**B**).

La figura 11 muestra el efecto antiviral de los extractos de cannabis contra la cepa G de HSV-2. Como se puede observar, cuando se infectó con una m.i de 0,01 los tres extractos disminuyeron la replicación viral de forma considerable aún en la concentración más baja y no se observan grandes diferencias con respecto a la concentración más alta del extracto. Los extractos M y CC2 disminuyeron el título viral en aproximadamente 4 logaritmos con ambas concentraciones utilizadas. El extracto SL con la concentración más baja utilizada disminuyó el título viral en aproximadamente 4 logaritmos, mientras que para la concentración más alta la disminución fue menor, de 3,5 logaritmos. Al infectar con la m.i de 0,1 el extracto CC2 fue el que disminuyó la replicación viral en mayor proporción, logrando una disminución de 5 logaritmos con la menor concentración utilizada. Por su parte, el extracto M disminuye el título viral en 5 logaritmos a la máxima concentración utilizada. El extracto SL, es el que menor inhibición presenta aunque disminuye el título viral en 2 logaritmos, lo que representa una inhibición mayor al 98%.

Cuadro 7: Concentración Efectiva 50 e Índice de selectividad de los extractos contra HSV-2 G

Extractos	CE ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	IS
M	35	198,1	5,66
SL	35	298,9	8,54
CC2	35	202,4	5,78

El cuadro 7 muestra los valores de CC₅₀, CE₅₀ y los IS obtenidos a partir de los gráficos de la figura 11. Como se puede observar, los valores obtenidos de CE₅₀ son de 35 µg/ml para los tres extractos. Para M y CC2 los IS son muy similares, con valores de 5,66 y 5,78 respectivamente. En cambio para SL el valor es un poco más alto, de 8,54.

Cuadro 8: Porcentaje de inhibición del rendimiento viral. Células Vero infectadas con HSV-2 G y tratadas con distintas concentraciones de los extractos.

m.i	0,01		
Extracto	M	SL	CC2
Concentración	70 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,97	99,99
Concentración	140 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	99,98	99,99

m.i	0,1		
Extracto	M	SL	CC2
Concentración	70 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,99	97,76	99,99
Concentración	140 µg/ml		
Porcentaje de inhibición	99,98	98,67	99,99

Como se puede observar en el cuadro 8, al infectar con la m.i de 0,01 todos los porcentajes de inhibición son del 99,9 % aún utilizando la concentración más baja de los extractos. Al infectar con una m.i mayor, los porcentajes de inhibición de M y CC2 se mantienen en 99,9% mientras que los de SL disminuyen un poco siendo de 97,76% para la menor concentración utilizada y 98,67% para la mayor concentración del extracto.

A partir de los resultados presentados podemos concluir que los tres extractos de hojas de cannabis pueden inhibir la cepa G de HSV-2 de forma similar a la observada para HSV-1.

Discusión

El uso de plantas medicinales para tratar los distintos males que afectan a las poblaciones, data de hace más de cinco mil años y aún hoy en día se utilizan para combatir muchas enfermedades y malestares.

Algunos estudios sugieren que los extractos de cannabis son buenos como antivirales, por ejemplo se ha estudiado su efectividad contra la COVID-19. Cannabinoides como el CBD o el THC entre otros, modularían la tormenta de citocinas producida por la infección viral disminuyendo la inflamación que en muchos casos termina siendo letal. Además intervendrían en el mecanismo de replicación del virus llegando a bloquear la replicación viral. Por otro lado, la planta de cannabis también posee terpenos que presentan actividad antiviral, dado que intervienen como moduladores y mediadores en distintas vías de señalización (Sea YL *et al*, 2023).

Debido a la gran cantidad y diversidad de compuestos que posee el cannabis y los distintos usos medicinales descritos, resulta imperioso el estudio de sus bioactividades. En este trabajo, se obtuvieron extractos a partir de las hojas, una parte de la planta que no es tan utilizada y que en algunos casos es descartada. Además, se utilizó etanol como solvente dado que se sabe que los cannabinoides se extraen bien con este compuesto (Addo PW *et al*, 2022).

En lugar de aislar los componentes, en esta primera instancia, se utilizaron los extractos crudos para evaluar el efecto conjunto de todos los componentes. Además, al usar el extracto crudo, es más difícil que los virus adquieran mutaciones que les confieran resistencia a todos los compuestos en simultáneo, lo que también podría convertirlo en un potencial antiviral de amplio espectro. Otra ventaja de no aislar los compuestos, es la disminución de los costos de fabricación y que no se pierde producto durante los procesos de extracción y purificación.

El objetivo de este trabajo fue obtener los extractos etanólicos de hojas de cannabis y determinar su actividad antiviral contra tres cepas del virus HSV-1 (KOS, B2006 e YK608) y contra la cepa G del virus HSV-2. Los extractos se obtuvieron según los protocolos previamente publicados aunque no se pudo evaporar completamente el etanol debido a la formación de resinas. Ante la posibilidad de perder componentes del extracto se decidió trabajar con las tinturas obtenidas. Se obtuvieron tres extractos: M, SL y CC2 correspondientes a las variedades Medikit, Strawberry Lemonade y Critical Cure respectivamente, cada uno con distinta proporción de CBD y THC. El análisis de la composición de cannabinoides de cada uno de los extractos que se realizó mediante HPLC y Cromatografía en Capa Delgada mostró que efectivamente cada variedad posee distinta composición de cannabinoides. Se prevé en

estudios posteriores el análisis de los componentes principales de los extractos como presencia y abundancia de flavonoides, terpenos y otros compuestos.

Se evaluó la citotoxicidad de los extractos mediante la técnica del MTT en células Vero. Al trabajar con tinturas se usaron diluciones altas de los extractos teniendo en cuenta que el etanol es tóxico para las células en concentraciones superiores a 1/100. Debido a esto realizamos diluciones 1/500 y 1/1000 de los extractos para evitar la interferencia del solvente. Se determinaron las CC₅₀ de cada uno de los extractos, resultando ser de 198,1 µg/ml; 298,9 µg/ml y 202,4 µg/ml para M, SL y CC2 respectivamente, aunque estimamos que en ausencia de alcohol serían más altas. Se prevé evaporar las tinturas y resuspender en DMSO para volver a evaluar la citotoxicidad y la actividad antiviral. Para evaluar la actividad antiviral se utilizaron los extractos en concentraciones a las cuales la viabilidad fue superior al 85%.

La actividad antiviral de los extractos fue testeada mediante el método de inhibición del rendimiento viral, también en células Vero. Se observó que los tres extractos presentan actividad antiviral contra las cepas de HSV-1 estudiadas tanto al infectar con una multiplicidad de infección baja como con una un poco mayor, alcanzando porcentajes de inhibición del rendimiento viral mayores al 99,9% para los tres extractos. Es importante destacar, que los tres extractos son capaces de inhibir la replicación de las cepas KOS y B2006 del virus HSV-1 llegando también a porcentajes de inhibición del rendimiento viral del 99,9%. Este resultado es prometedor teniendo en cuenta que la cepa B2006 es resistente al aciclovir, el antiviral usado en la clínica para el tratamiento del virus del herpes. Además, la observación al microscopio de fluorescencia permitió comprobar que los extractos son capaces de inhibir la expresión de las proteínas fluorescentes de la cepa recombinante YK608 del virus HSV-1, no solo disminuyendo el tamaño de los focos de infección sino también reduciendo la intensidad de la fluorescencia. Debido a que no se realizaron otros ensayos no se puede concluir que los extractos inhiben la expresión de las proteínas virales directamente sino que se supone que la disminución observada se debe a la inhibición de la replicación del virus lo que lleva a una menor expresión de las proteínas virales.

Por otro lado, se evaluó también la actividad antiviral de los extractos contra la cepa G de HSV-2 y se determinó que los extractos de las hojas de cannabis son capaces de inhibir este virus alcanzando porcentajes de inhibición del rendimiento viral del 99,9% para los tres extractos.

Conclusiones

Teniendo en cuenta la falta de antivirales, el surgimiento constante de nuevos virus y el gran número de personas que está infectada tanto con HSV-1 como con HSV-2, los resultados obtenidos en este trabajo son muy alentadores. Trabajar con extractos vegetales presenta una ventaja en relación a trabajar con compuestos aislados o sintetizados artificialmente ya que no solo es más económico porque no se necesita aislar o purificar componentes, sino que además la probabilidad de que los virus desarrollen resistencia es mucho menor. En este caso, la ventaja es mayor teniendo en cuenta que trabajamos con las hojas de la planta de cannabis que generalmente es la parte de la planta que se descarta, por lo tanto la obtención de estos extractos haría más sustentable el uso de la planta.

A pesar de trabajar con extractos crudos, pudimos observar que no resultaron citotóxicos en las células Vero. Los tres extractos etanólicos de hojas de cannabis, M, SL y CC2 presentan una alta actividad antiviral contra los virus HSV-1 y HSV-2 llegando a inhibir el título viral en más de 4 logaritmos. Asimismo, inhiben la cepa B2006 de HSV-1 resistente al aciclovir lo que aumenta su potencial uso como fitomedicamentos antivirales.

Es importante aclarar que los extractos provienen de hojas de plantas con distinta genética y aunque pudimos determinar diferencias entre los extractos con respecto a la presencia y cantidad de cannabinoides, especialmente de THC y CBD, no parecería haber grandes diferencias en la actividad antiviral. De los tres extractos, el extracto M es el que presenta mayor actividad contra todos los virus evaluados y también es el que tiene mayor potencia de CBD y THC. Es imperioso el análisis más pormenorizado de los componentes mayoritarios de los extractos para poder determinar si este efecto se debe a los cannabinoides o a algún otro compuesto.

Estos resultados sumados a las nuevas reglamentaciones con respecto a la investigación médica y científica del cannabis y su uso medicinal motivan a seguir investigando la actividad antiviral de los extractos de hojas contra otros virus de importancia médica.

Referencias bibliográficas

- Addo PW, Sagili SUKR, Bilodeau SE, Gladu-Gallant FA, MacKenzie DA, Bates J, McRae G, MacPherson S, Paris M, Raghavan V, Orsat V, Lefsrud M. Cold Ethanol Extraction of Cannabinoids and Terpenes from Cannabis Using Response Surface Methodology: Optimization and Comparative Study. 2022 Dec. Molecules. 11;27(24):8780.
- Alché L.E., Barquero A.A., Sanjuan N.A. and Coto C.E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains Herpes simplex virus type 1 propagation. (2002). *Phytother. Res.* 16: 348-352.
- Alché L.E., Berra A., Veloso M.J., Coto C.E. Treatment with meliacine, a plant derived antiviral, prevents the development of herpetic stromal keratitis in mice. (2000). *J. Med. Virol.* 61: 474-480.
- Barquero A.A., Alché L.E., Coto C.E. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase- deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. (1997). *Int. J. Antimicrob. Agents* 9: 49-55.
- Berang K. 2023. Antiviral Drug Development: Challenges and Opportunities for Emerging Viral Infections. *RRJ Med. Orgni chem*; 10:001.
- Booth Judith K, Bohlmann Jörg, Terpenes in *Cannabis sativa* – From plant genome to humans, 2019, Plant Science, Volume 284, Pages 67-72, ISSN 0168-9452.
- Chandra S, Lata H, ElSohly MA, Walker LA, Potter D. Cannabis cultivation: Methodological issues for obtaining medical-grade product. 2017. *Epilepsy & Behavior* 70 302–312.
- Christensen C, Rose M, Cornett C, Allesø M. Decoding the Postulated Entourage Effect of Medicinal *Cannabis*: What It Is and What It Isn't. 2023 Aug 21. *Biomedicines*;11(8):2323. doi: 10.3390/biomedicines11082323. PMID: 37626819; PMCID: PMC10452568.
- Elbadawy, Hossein & Gailledrat, Marine & Desseaux, Carole & Ponzin, Diego & Ferrari, Stefano. (2012). Targeting Herpetic Keratitis by Gene Therapy. *Journal of ophthalmology*. 2012. 594869. 10.1155/2012/594869
- Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarta DD, Eno Z. Medicinal plants in therapy, 1985 Bull World Health Organ; 63: 965–81.

Fischedick J, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L, cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. 2010. *Phytochemistry*. 71:2058-2073

Formato M, Crescente G, Scognamiglio M, Fiorentino A, Pecoraro MT, Piccolella S, Catauro M, Pacifico S. (–)-Cannabidiolic Acid, a Still Overlooked Bioactive Compound: An Introductory Review and Preliminary Research. 2020 Jun 5. *Molecules*;25(11):2638. doi: 10.3390/molecules25112638. PMID: 32517131; PMCID: PMC7321064.

Garber A, Barnard L, Pickrell C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. 5 de junio de 2020. *J Evid Based Integr Med*. Jan-Dec;26:2515690X20978394. doi: 10.1177/2515690X20978394. PMID: 33593082; PMCID: PMC7894602.

Hourfane S, Mechqoq H, Bekkali AY, Rocha JM, El Aouad N. A Comprehensive Review on *Cannabis sativa* Ethnobotany, Phytochemistry, Molecular Docking and Biological Activities. *Plants (Basel)*. 2023 Mar 9;12(6):1245. doi: 10.3390/plants12061245. PMID: 36986932; PMCID: PMC10058143.

<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-27350-273801/texto>

<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-27669-365303/texto>

<https://www.who.int/es/news/item/01-05-2020-billions-worldwide-living-with-herpes>

James, Charlotte et al. “Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016.” 2020. *Bulletin of the World Health Organization* 98, 315 - 329.

Ka-Wai Hui Eric, Reasons for the increase in emerging and re-emerging viral infectious diseases, 2006, Microbes and Infection, Volume 8, Issue 3, Pages 905-916, ISSN 1286-4579.

Mandrioli, M., Tura, M., Scotti, S. y Gallina Toschi, T. Fast Detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in Cannabis sativa L. (2019).

Mathew Jr J, Sapra A. Herpes Simplex Type 2. [Updated 2023 Aug 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554427/>

Miner Jonathan y Hoffhines Adam, Tex Heart Inst J. 2007; 34(2): 179–186.

Monti, Jaime & Pandi-Perumal, Seithikurippu R.. (2021). Clinical Management of Sleep and Sleep Disorders With Cannabis and Cannabinoids: Implications to Practicing Psychiatrists. *Clinical Neuropharmacology*. Publish Ahead of Print. 10.1097/WNF.0000000000000494.

Padma P, Pramod NP, Thyagarajan SP, Khosa RL. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctagineiflora* on Herpes simplex virus. *J Ethnopharmacol*. 1998 May;61(1):81-3. doi: 10.1016/s0378-8741(98)00013-0. PMID: 9687085.

Petrera E., Coto C.E. Effect of the potent antiviral 1-cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin on cytokine production by murine macrophages stimulated with HSV-2. (2014). *Phytother. Res.* 28: 104-109.

Petrera E., Coto C.E. Therapeutic effect of meliacine, an antiviral derived from *Melia azedarach* L., in mice genital herpetic infection. (2009). *Phytother. Res.* 23: 1771-1777.

Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. 6 de enero de 2012. *Pharmacogn Rev.*(11):1-5. doi: 10.4103/0973-7847.95849. PMID: 22654398; PMCID: PMC3358962.

Pifarré M.P., Berra A., Coto C.E., Alché L.E. Therapeutic action of meliacine, a plant-derived antiviral, on HSV-induced ocular disease in mice. (2002). *Exp. Eye Res.* 75: 327-334.

Rasoanaivo P, Wright CW, Willcox ML, Gilbert B. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J*. 2011 Mar 15;10 Suppl 1(Suppl 1):S4. doi: 10.1186/1475-2875-10-S1-S4. PMID: 21411015; PMCID: PMC3059462.

Saleh D, Yarrarapu SNS, Sharma S. Herpes Simplex Type 1. [Updated 2023 Aug 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482197/>

Sampson Peter B, Phytocannabinoid Pharmacology: Medicinal Properties of *Cannabis sativa* Constituents Aside from the “Big Two”. 2021. *Journal of Natural Products* 84 (1), 142-160. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00965

Schilling Susanne, Melzer Rainer, McCabe Paul F., *Cannabis sativa*, Current Biology, Volume 30, Issue 1, 2020, Pages R8-R9, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.10.039>.

Sea YL, Gee YJ, Lal SK, Choo WS. Cannabis as antivirals. *J Appl Microbiol*. 2023 Jan 23;134(1):lxac036. doi: 10.1093/jambio/lxac036. PMID: 36626776.

Sheikh NK, Dua A. Cannabinoids. [Updated 2023 Feb 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; enero 2024 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556062/>

Villamil S.M., Alché L.E. and Coto C.E. Inhibition of herpes simplex virus type I multiplication by meliacine, a peptide of plant origin. (1995). *Antiviral Chem. Chemother.* 6: 239 244.

Wagner, H., & Bladt, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. (1996). Springer Science & Business Media.; Mandrioli, M., Tura, M., Scotti, S. y Gallina Toschi, T. (2019). Fast Detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in *Cannabis sativa* L.

Warf, Barney. (2014). High Points: An Historical Geography of Cannabis. *Geographical Review.* 104. 10.1111/j.1931-0846.2014.12038.x.

Whitley RJ. Herpesviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8157/>

Yarmolinsky L, Zaccai M, Ben-Shabat S, Mills D, Huleihel M. Antiviral activity of ethanol extracts of *Ficus benjamina* and *Lilium candidum* in vitro. *N Biotechnol.* 31 de Diciembre de 2009; 26(6):307-13. doi: 10.1016/j.nbt.2009.08.005. Epub 2009 Aug 22. PMID: 19703599.