

	<p>Universidad de la República - CSIC</p> <p>Formulario de Informe final del Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil Edición 2014</p>	
---	---	---

DATOS DEL PROYECTO	
• Título del Proyecto:	Estudio de la posible modulación por <i>Ilex paraguariensis</i> y extractos de <i>Cannabis sativa</i> sobre los ciclos sueño vigilia y la radioprotección genómica.
• Número ID del proyecto:	197
• Área de conocimiento:	Salud
• Facultad o Servicio:	Facultad de Medicina
• Nombre completo de los-as Integrantes del equipo:	Pablo Rodrigo Bracesco Stankevicaite German Nicolas Lopez Cabrera
• Correo electrónico del/de la estudiante referente:	german.lopez07@gmail.com
• Nombre completo del/de la docente orientador-a:	Nelson Bracesco - Atilio Falconi
• Correo electrónico del/de la docente orientador-a:	nbracesco@fmed.edu.uy

INFORME FINAL

(Desde ítem 1 a 7 la extensión máxima POR ÍTEM es de una carilla)

- **Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada**

Objetivo generales

Investigar el impacto a nivel de la capacidad radioprotectora y sobre el ciclo sueño vigilia de dos productos naturales (la infusión yerba mate con y sin cafeína y los extractos de *Cannabis*), utilizando modelos celulares y animal.

Objetivos específicos:

- 1- Estudiar de la capacidad radioprotectora frente a radiaciones ionizantes de infusiones de *Ilex* (Ip) con y sin cafeína, utilizando como modelo poblaciones celulares.
- 2- Estudiar las fracciones sobrevivientes en presencia y ausencia de las infusiones.
- 3- Análisis de Dobles roturas del ADN
- 4- Estudio de extractos y/o fracciones obtenidas a partir del cannabis con potencial modulador de ciclo sueño vigilia

• Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto.

En el proyecto se ejecutó en el Departamento de Biofísica (laboratorio de Radiobiología) y en el Departamento de Fisiología (laboratorio de Neurofisiología del Sueño) de la Facultad de Medicina.

El grupo ha optado como tema para el proyecto, investigar dos productos naturales de gran interés para la industria, medicina y sociedad.

Se estudiarán los efectos de la Yerba Mate o *Ilex Paraguarensis* (Ip) por su alto nivel de consumo en nuestra sociedad y forma parte de un hábito tradicional y los efectos biológicos del Cannabis, en especial por el gran número de interrogantes que se han generado en nuestra sociedad en especial los potenciales usos médicos de sus derivados.

En el laboratorio de Biofísica tuvimos participación de todos los experimentos en los cuales desempeñamos tareas como:

Manipulación de instrumentos de laboratorio como son las pipetas electrónicas, microscopio, centrifuga, autoclave, estufa de crecimiento.

Preparación de medios de cultivo rico en nutrientes (YPD y YPDA). Factores de crecimiento de las mismas, condiciones de crecimiento, cultivo de levaduras.

Análisis de las probabilidades de supervivencia a diferentes agentes

Cálculo de dosis para las poblaciones celulares estudiadas.

Con respecto al Cannabis realizamos distintos tipos del extracto con fin de buscar el mejor medio para la administración en poblaciones de levaduras (en etanol 95%, en aceite y en DMSO).

En el laboratorio de Neurofisiología del Sueño se estudió la acción moduladora de una cepa del cannabis sobre el ciclo sueño vigilia, utilizando a la rata como

modelo experimental.

Los animales se implantaron para realizar el registro polisomnográfico (Observamos dicho procedimiento), en el mismo, electrodos de registro fueron implantados sobre diferentes cortezas cerebrales en el hueso frontal y parietal posterior para el registro electroencefalográfico (EEG). Dos electrodos de nichrome se implantaron en los músculos de la nuca para registrar el electromiograma (EMG). Luego de un periodo de recuperación, se efectuaron registros de 6 horas de duración durante la fase de luz. Los registros polisomnograficos, se Estadificaron en épocas de 10 segundos de duración. Dichas épocas se clasificaron en sueño REM, sueño lento o no REM (S1 y S2 que se diferencia por la mayor cantidad de ondas lentas en y la presencia de husos de sueño en S2) y vigilia (V).

Nuestra tarea en este laboratorio consistió en registrar y analizar estos registros. Participamos del cuidado de los animales y de los registros polisomnográficos basales así como durante la administración de Cannabis sp. mediante vaporización. Para esto los animales fueron colocados en una caja plástica rectangular con una capacidad de 4,5 L que contiene placas termostalizadas con control digital de temperatura en las que se colocarán entre 20 y 40 mg de material vegetal. El material vegetal fue provisto por el Grupo Interdisciplinario de Estudio de Cannabis (GIEC) de la Facultades de Química y Medicina (UdelaR). El tiempo de vaporización será de 10 minutos. Luego, se extrajo el aire y se hizo circular por una bomba conectada a un filtro de carbón activado donde quedarán retenidos los compuestos generados.

- **Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.**

El cronograma se cumplió en forma a lo expuesto en el informe.

Actividades como el estudio de doble rotura no se realizaron porque los resultados obtenidos no justificaban su estudio posterior. En cuanto a los registros polisomnográficos, realizamos los registros completos de 2 ratas, una de estas presento brotes epilépticos por lo cual los registros de esa rata fueron descartados. Al día de hoy estos estudios se siguen realizando en el Laboratorio de Neurobiología del Sueño los cuales son parte de un proyecto mayor que exceden los horizontes de este proyecto. De todas formas seguiremos conectados y colaborando con dichas actividades.

- **Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no – con los resultados esperados por parte del equipo.**

Realizamos estudios de sobrevida de poblaciones celulares con distintos tipos de productos naturales (cannabis y yerba mate), con respecto al cannabis

tuvimos dificultades ya que la mayoría de los compuestos son liposolubles y el medio de cultivo de las levaduras es acuoso. Se estudió a diferentes concentraciones de etanol (1%, 5% y 10%) teniendo como resultado un descenso de la sobrevida (95%, 70% y 60% respectivamente), el efecto del alcohol fue perjudicial para las levaduras, no pudiéndose observar resultados.

En los extractos en medio oleoso la sobrevida no fue afectada, pero al exponer los cultivos al daño producido por las radiaciones ionizantes (con una fuente de CO 60 : Nordion 220 .Tasa de dosis 6 KGy/h, dosis absorbida: 200 Gy). No tuvimos resultados significativos, sin cannabis dio una sobrevida 36.8% y con cannabis del 35.6%, lo cual nos da a pensar que este medio tampoco fue el correcto ya que las levaduras posiblemente no pudieran incorporar el cannabis.

Nosotros esperábamos que el Cannabis al tener una cantidad importante de polifenoles se comporte como un radioprotector, esto no lo pudimos identificar ya que el medio no fue el adecuado dejando la posibilidad de seguir intentando con otros medios. También se realizó el estudio de mutagénesis no observándose aumento significativo de la misma comparada con la mutagénesis espontanea para todos los tipos de extractos.

Estudiamos la sobrevida de las levaduras con yerba mate en su variedad común y otra descafeinada (por extracción súper crítica de la cafeína, proporcionada por el Prof. Eduardo Cassel de la Universidad de Luterana de Porto Alegre, Brasil).

En este caso esperábamos que el efecto radioprotector producido por la infusión de yerba mate sea menor ya que hay bibliografía que plantea el efecto protector de la cafeína.

Los resultados en este caso fueron concluyentes, tanto la yerba cafeinada como la descafeinada se comportaron de igual manera. Esto Puede darse por la baja concentración de cafeína que se la extrajo (20%) o porque la yerba mate tenga algún compuesto radioprotector. Queda en suspenso la investigación con otro tipo de extracción de la cafeína más eficiente para poder concluir si está vinculada al efecto radioprotector de la yerba mate.

Con respecto a la modulación del cannabis sobre el ciclo sueño - vigilia; el cannabis está compuesto por elementos que tienen efectos antagonistas entre ellos, por un lado tenemos a el delta9-THC tendría un efecto sedante mientras el CBD se comporta como un activador .Estos efectos varían según la vía de administración y las dosis. Igualmente nosotros estudiamos la variedad: Punto rojo y thai México en su conjunto de compuestos como una unidad.

En un principio pensamos que el cannabis iba a tener un efecto sedante sobre la rata aumentando la cantidad de sueño, por lo contrario obtuvimos, en el control 23% de vigilia, 6% de S1 (sueño no rem superficial), 54% de S2 (sueño no rem profundo) y 17% REM (sueño de movimientos oculares rápidos). Para 20 mg de cannabis obtuvimos 23% vigilia, 10% S1, 52% S2 y 15% REM. Para 40 mg de cannabis obtuvimos 29%de vigilia, 12% S1, 47% de S2 y 12 % de REM.

Con los resultados podemos observar una disminución de las etapas profundas del sueño (S2 y REM), un aumento de la vigilia y etapas superficial del sueño (S1), con respecto al registro control. También vimos que a mayor dosis de cannabis aumenta los efectos. Sin poder llegar a una conclusión por el bajo número de ratas estudiadas.

- **Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).**

El proyecto fue expuesto en el "Seminario Internacional Yerba Mate - URUGUAY 2015" realizado en la Facultad de Medicina, coordinado por Guillermo Schinella (ARG) y Nelson Bracesco (UY).

El título de la charla fue "Estudio de la posible modulación por Ilex Paraguariensis y extractos de Cannabis sativa sobre los ciclos sueño vigilia y la radioprotección genómica".

También se presentó en seminarios internos de los laboratorios.

Esperamos en futuro formen parte de una publicación en una revista arbitrada.

- **En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.**

En el marco de este proyecto tuvimos varias dificultades, con respecto al estudio del posible efecto radioprotector del cannabis nos enfrentamos a la dificultad de encontrar el medio adecuado de administración, ya que los compuestos de cannabis en su gran mayoría son liposolubles. Para esto se realizaron varios tipos extractos (en alcohol, en aceite y en DMSO) sin tener resultados en su administración.

En el laboratorio de sueño enfrentamos la dificultad, que no se pudo realizar un mayor número de ratas por razones de costos y tiempo. Una de las ratas a estudiar sufría de epilepsia y su registro no sirvió para la estadificación. Lo que nos imposibilitó de sacar una conclusión y mayores datos. De todas formas estos trabajos se siguen realizando en este laboratorio y seguiremos el desarrollo de los mismos.

- **En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.**

Podemos sugerir que se tenga un mayor seguimiento de los proyectos para tener en cuenta si realmente se necesita, se pueda otorgar mayor plazo para que las investigaciones sean más completas.

8) **Resumen publicable de no más de 250 palabras** que sea accesible para un público amplio, y en un lenguaje dirigido a no especialistas en la temática de la investigación. En este resumen se debe dar cuenta de los objetivos del proyecto, los pasos seguidos para cumplirlos y los principales resultados alcanzados.

El resumen debe contener la siguiente información:

título del proyecto

servicio

nombre de los integrantes del equipo

nombre del docente orientador

Resumen publicable:

Estudio de la posible modulación por *Ilex Paraguariensis* y extractos de *Cannabis sativa* sobre los ciclos sueño vigilia y la radioprotección genómica
Laboratorio de Radiobiología, Depto. de Biofísica y laboratorio de Fisiología del Sueño, Depto. Fisiología, Fac. Medicina, UDELAR, Montevideo Uruguay.

Integrantes del grupo: German Lopez y Pablo Bracesco

Docentes orientadores: Nelson Bracesco y Atilio Falconi

En este proyecto se investigó el impacto a nivel de la capacidad radioprotectora y sobre el ciclo sueño vigilia de dos productos naturales (la infusión yerba mate y extractos de *Cannabis*), se utilizaron dos modelos, celular (levaduras) y animal (rata). Se estudió el efecto de la cafeína en estos resultados, utilizando yerba descafeína.

Se cuantifico el daño producido por la radiación gamma, observándose una sobrevida del 20%, para tratamientos combinados de la infusión con cafeína 32% y sin cafeína 37%. Se estudio la frecuencia mutagénica no observándose diferencias significativas entre las infusiones y el control.

El modelo de levaduras mostro capacidad radioprotectora para la yerba con y sin cafeína, no observándose incrementos de la frecuencia mutagenica comparada al control. Con respecto al cannabis se intenta encontrar el vehículo apropiado para este tipo de estudios

Para el efecto modulador del cannabis sobre del ciclo sueño vigila se realizó estudios polisomnograficos de 6 horas de duración durante la fase de luz en la rata adulta.

En estos resultados pudimos ver una disminución de las etapas más profundas del sueño (S2 y REM), un aumento de la vigilia y una superficialización del sueño (más S1), con respecto al registro control. Encontramos que dicho efecto es dosis dependiente (mayor dosis mayor efecto).

Si bien el número de ratas estudiadas no son suficientes para sacar una conclusión nos deja entrever que esta cepa de cannabis parece tener un efecto activador durante el ciclo sueño y vigilia, aumentando el porcentaje de vigilia y superficializando el sueño y dicho efecto parece ser dosis dependiente. Falta ver si esta tendencia se mantiene un una población mayor de ratas y si dichos efectos son específicos de esta cepa de cannabis y si estos dependen de su composición fisicoquímica.

9) En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados

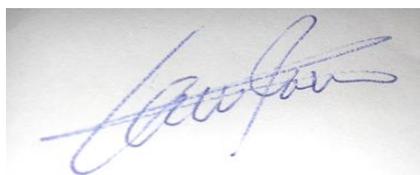
por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	ítem – descripción

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- *Un CD con el **informe final** en formato .odt o .pdf. Y con el **póster** en su versión digital en formato .jpg o .pdf*
- *Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)*



.....
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

Comentarios del docente orientador:

Los estudiantes Germán Lopez y Pablo Bracesco tuvieron un desempeño altamente destacable.

Ambos concurren asiduamente a los laboratorios y participaron de las actividades relacionadas a sus proyectos como a otros en desarrollo en ambos laboratorios.

En particular han adquirido destrezas en tareas en dos áreas bien diferentes de investigación:

- Utilización de un modelo celular vivo con lo que implica todos los protocolos de esterilidad para trabajo microbiológico
- Manejo de conceptos de radioprotección (recibieron formación).
- Técnicas de implantación de electrodos en animal de experimentación
- Manejo de animales de experimentación (bajo supervisión de personal entrenado)
- Captura de registros polisomnograficos de animales implantados
- Procesamiento de dichas señales.
- Manejo y extracción de componentes de productos naturales
- Estudios de disponibilidad y vehiculización de compuesto procedentes de la Yerba Mate y el Cannabis sativa.

Los estudiantes trabajaron con procesadores de datos específicos de cada laboratorio.

Los resultados de sus trabajos fueron presentados en actividades científicas y serán parte de una futura publicación en congreso y posiblemente en publicación arbitrada.

Ambos estudiantes plantean y de hecho lo están haciendo la continuación de estos proyectos vinculándose a los grupos de los laboratorios (Grupos Interdisciplinarios de Cannabis y Yerba mate).

