

El CBD puede restaurar la capacidad de defensa inmunitaria en ratas viejas. Mecanismos de acción

Este estudio se ha llevado a cabo para profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en el daño que presenta el sistema inmunitario por el envejecimiento y el posible efecto protector del CBD.

**JESUS A F TRESGUERRES, LISA RANCAN*,
BEATRIZ LINILLOS*, MIRIAM DIAZ DE LAMO*,
SERGIO PAREDES, NELIA JOYERA SANDOVAL** Y
MONICA DE LA FUENTE DEL REY****

* DEPTOS DE FISIOLÓGICA Y DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA CELULAR DE LA FACULTAD DE
MEDICINA Y DEPTO DE GENÉTICA, FISIOLÓGICA
Y MICROBIOLOGÍA (UNIDAD DE FISIOLÓGICA
ANIMAL)

** FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

Se administró CBD de la marca Phexia durante 2,5 meses a la dosis de 10 mg / Kg de peso en la comida a ratas viejas Long Evans de 15 meses. La mitad de ellas (un total de 14) se alimentaron durante 2,5 meses con el CBD y la otra mitad con comida standard. Se utilizaron además animales de 2 meses y de 5 meses como controles jóvenes para comparar. Se estudió el timo, el bazo y también las células sanguíneas para investigar por PCR la expresión génica y por Western Blot la cantidad de proteína de los parámetros de estrés oxidativo, inflamación y apoptosis más comunes. También se estudió en los tres tejidos la función inmunitaria a través de la actividad NK, la quimiotaxis y la linfoproliferación. Se puede observar que los animales viejos presentan un incremento muy significativo de parámetros de estrés oxidativo, de inflamación y de apoptosis tanto en los tres tejidos, así como una disminución de la función inmunitaria en comparación con los animales jóvenes. Además, se constata el papel relevante de la activación del inflammasoma en estos procesos de los animales viejos ($p < 0.01$) con incremento de niveles de citoquinas ($p < 0.05$). La administración de CBD Phexia no solo es capaz de retornar todos los parámetros de estrés oxidativo e inflamación a valores similares a los de los animales jóvenes sino que también frena al inflammasoma y restablece las funciones inmunitarias y por lo tanto es un excelente protector frente a la disminución de la función de este sistema asociado al envejecimiento.

Tanto los mamíferos como las personas nos oxidamos porque una parte del oxígeno



que respiramos, en vez de irse a la fabricación de energía del organismo, el adenosín trifosfato (ATP) concretamente, se va a la fabricación de radicales libres. Éstos no solamente actúan sobre la piel y la estropean, sino que también dañan todos los tejidos y órganos del cuerpo, lo que nos va deteriorando gradualmente. El envejecimiento se caracteriza pues por la acumulación progresiva de daño oxidativo que conduce a la inflamación y apoptosis en las células (Tabibzadeh 2021) que conduce al deterioro del sistema inmunitario (inmunosenescencia) y esto se asocia con una mayor morbilidad y mortalidad. La puesta en marcha de estos procesos de oxidación e inflamación puede ocurrir a través de la activación del inflammasoma NLRP3. Por ello, es muy importante encontrar estrategias que permitan ralentizar tanto el envejecimiento como sus consecuencias sobre el sistema inmunitario.

El cannabidiol (CBD), principal componente no psicoactivo del cannabis, se ha propuesto como buen tratamiento antioxidante y anti-inflamatorio, pero apenas se ha estudiado su papel en el efecto que lleva a cabo sobre el sistema inmunitario. Aunque el cannabidiol se aisló ya en los años 40 del pasado siglo y su estructura molecular se pudo establecer en los años 60 solo muy recientemente se ha incrementado de

forma importante el interés en dicha sustancia. (Bonini et al 2018, Zuairi et al 2006) Su mecanismo de acción no está todavía completamente claro hoy, aunque se conocen muchos receptores a través de los que ejerce su acción.

La variedad de acciones del CBD, ocurren a través de acciones farmacológicas diversas utilizando diversos tipos de receptores como el de serotonina, el GPR 55 o el Vanilloide. Además de los mencionados el CBD parece actuar también inhibiendo la recaptación de anandamida (endocannabinoide).

Sin embargo, debemos insistir que el CBD tiene una interacción mínima con los receptores principales del THC y de los endocannabinoides, que son CB1 y CB2 por lo que carece totalmente de efectos psicotrópicos.

El CBD es capaz de bloquear las reacciones de los radicales libres, quelando estos o bien transformándolos en otros productos menos reactivos (Atalay et al 2020). Concretamente el CBD impide la formación de radicales superóxido que se generan normalmente a partir de la Xantina oxidasa y NADPH oxidasa (Pan et al., 2008) y también se ha visto en cultivos de células endoteliales coronarias (HCAEC) (Rajesh et al 2007) También es capaz de reducir los niveles de NO en el hígado de ratones tratados con doxorubicina (Fouad et al .2013).



NEXT-GENERATION IN STANDARD TABLETING TECHNOLOGY

F30p

The F30p unites flexibility, state-of-the-art technology and performance for large batches of mono- and bi-layer tablets.

Discover more on our website:

fette-compacting.com



FETTE
COMPACTING

El CBD reduce también la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la quelación de las sustancias metálicas involucradas en la reacción de Fenton que conduce a formar radicales hidroxilos altamente reactivos. (Hamelink et al 2005) evitando la oxidación de sustancias involucradas en dicha reacción

La actividad antioxidante del CBD comienza activando el factor nuclear relacionado con el eritroide 2- (Nrf2) (Juknat et al 2013) responsable de la transcripción de genes citoprotectores incluyendo algunos antioxidantes potentes (Vomund et al 2017). También es capaz de aumentar el mRNA de la superóxido dismutasa (SOD) y de la actividad enzimática de varios enzimas acoplados a metales como las diversas variedades de la propia SOD que forma heterodímeros con Mn, Zn o Cu que son responsables de su acción antiinflamatoria al actuar sobre el metabolismo de los radicales superóxido en varios modelos experimentales de ratón. (Rajesh et al 2010). Además, bloquea la activación del inflammasoma NLRP3.

El inflammasoma NLRP3 es un compuesto de diversas proteínas y que está formado por el propio NLRP3, la proteína de conexión ASC, también denominada pyCARD (proteína speck-like asociada a apoptosis y conteniendo CARD), y la proteína efectora pro-caspasa-1. El inflammasoma NLRP3 juega un papel muy importante como iniciador de la inflamación generando una plataforma a través de la que se activan factores como la caspasa1 que da lugar a su vez a citoquinas tales como IL-1 β and IL-18. Algunos estudios indican que el CBD es capaz de impedir la activación del inflammasoma precisamente a través de los receptores CB1 en la membrana celular. (Qui et al 2022)

El Sistema de señalización a través de NF- κ B juega un papel muy importante en el efecto anti inflamatorio del CBD. NF- κ B es un regulador crítico del envejecimiento debido a su actuación sobre el inflammasoma, donde estimula citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, and TNF- α . (Songkiatisak et al 2018) De hecho el bloqueo de NF- κ B se ha probado que es capaz de revertir la expresión de genes asociados al envejecimiento que llevan la proliferación celular y además reducen la senescencia (Tabibzadeh 2021)

Por tanto, una sustancia como el CBD puede ser un gran aliado puesto que es capaz de bloquear los procesos de oxidación, que

Este trabajo investiga el efecto de la administración de CBD sobre las funciones de las células inmunitarias y sobre los parámetros de estado redox tanto de la sangre como del bazo y del timo

secundariamente, conducen a procesos de inflamación y, por tercera derivada, a un proceso de muerte celular programada (Rancan et al 2023) con la correspondiente disminución de su actividad.

Objetivos

El objetivo de este trabajo es investigar el efecto de la administración diaria de CBD por vía oral durante 10 semanas sobre las funciones de las células inmunitarias y sobre los parámetros de estado redox tanto de la sangre como del bazo y del timo. Asimismo, comprobar si estos procesos se ponen en marcha por la activación del inflammasoma NLRP3

Material y métodos

Se emplearon 40 ratas macho Long Evans, las cuales se dividieron en cuatro grupos experimentales: i) grupo control de ratas jóvenes (2 meses de vida N=8); ii) grupo control de ratas jóvenes (5 $\pm$ 1 meses de vida. N=8) iii) grupo control de ratas viejas (15 $\pm$ 1 meses, N=12); y ii) grupo de ratas viejas tratadas con CBD (15 $\pm$ 1 meses, N=12), las cuales recibieron 10 mg de CBD/kg (CBD full spectrum Phexia, Madrid) diariamente durante 2,5 meses. De hecho, en estudios anteriores los autores habían observado ya que el CBD podría tener efectos beneficiosos a estos niveles por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antiapoptóticas. Sin embargo, las investigaciones sobre el posible efecto protector del CBD sobre el sistema inmunitario aún no se ha comprobado de manera exhaustiva.

Con el fin de investigar estos posibles efectos se utilizó CBD (cedido por Phexia y con una pureza superior al 99% y libre de THC) Una vez terminadas las 10 semanas de tratamiento con CBD o comida standard en los animales viejos y para estudiar precisamente las funciones inmunitarias, los investigado-

res determinaron la actividad citotóxica de las células natural killer (NK), quimiotaxis la linfoproliferación y el estrés oxidativo tras realizar cultivos de la sangre, del bazo y del timo. Se ha medido en muestras de homogenizados de bazo, timo y en las células sanguíneas la actividad de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST) y también los niveles de MDA, TNF α e IL1 y la de caspasa 1 y AIF como indicadores de apoptosis. Se ha medido también la actividad del inflammasoma NLRP3 y de sus derivadas las citoquinas IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α .

Resultados

Los datos obtenidos tanto en la sangre como a nivel del bazo y del timo muestran que no existen diferencias en el nivel de estrés oxidativo medido en forma de Malondialdehído (TBARS) entre los dos grupos de animales jóvenes de 2 meses y de 5 meses. Sin embargo, en las ratas de 15 meses se produce un **aumento significativo** que se neutraliza parcialmente por el tratamiento con CBD obteniéndose en la mayoría de los casos, unos resultados equiparables a los que se obtuvieron en las ratas jóvenes.

Células sanguíneas

En los resultados de estrés oxidativo en células sanguíneas totales se observaron en las ratas viejas tratadas con CBD valores significativamente mayores en las defensas antioxidantes como en la actividad de GPx (p=0,057), de GR (p=0,058) y en la concentración de GSH (, p<0,05) con respecto al grupo control viejo sin tratamiento. En el grupo viejo tratado con CBD también se apreció de forma altamente significativa menor concentración de glutatión oxidado (GSSG) (, p<0,001) y un menor cociente GSSG/GSH (p<0,01). Los TBARS en el grupo viejo tratado con CBD también fueron significativamente menores (p<0,05) con respecto a las ratas controles viejas, pero estos seguían siendo mayores (p<0,01) con respecto al grupo control joven.

La actividad GPx no presentó diferencias significativas entre los distintos grupos. En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo se observaron valores más bajos de GSSG y menor cociente GSSG/GSH en el grupo de animales viejos tratados con CBD (, p=0,057; y p=0,059 respectivamente) con respecto a los viejos no tratados, que a su vez eran mayores a los de los controles jóvenes (p<0,01;

$p < 0,001$). Las concentraciones de los TBARs en el grupo viejo tratado con CBD también resultaron significativamente menores ($p < 0,05$) con respecto al grupo viejo no tratado. Todo ello indica que el CBD es un antioxidante potente que contribuye también al restablecimiento de la capacidad de defensa del sistema inmunitario

Bazo

Los resultados en bazo fueron similares a los de las células sanguíneas con un efecto importante del tratamiento con CBD. Aun así, el cociente GSSG/GSH en el grupo viejo tratado con CBD resultó ser mayor ($p < 0,01$) que en el grupo control joven. Las concentraciones de los TBARs en el grupo viejo tratado con CBD también resultaron ser significativamente menores ($p < 0,05$) con respecto al grupo control viejo y similares a los de los animales jóvenes.

Timo

En el caso del timo se observó en el grupo viejo tratado con CBD con respecto al control viejo, mayor actividad GPx y GR ($p < 0,05$; $p < 0,01$ respectivamente), pero no se vieron diferencias en el caso del GSH. Las concentraciones de los TBARs resultaron ser significativamente menores en el grupo de animales viejos tratados con CBD con respecto a los viejos control ($p < 0,05$), pero el cociente GSSG/GSH no fue significativamente distinto, aunque si había diferencias altamente significativas con respecto al control joven ($p < 0,0001$). Las concentraciones de los TBARs resultaron ser

significativamente menores en el grupo viejo tratado con CBD con respecto a los animales viejos control ($p < 0,05$).

Estudio inmunitario

En lo que respecta a la actividad de las células NK, se produce una disminución significativa en los animales viejos con respecto a los jóvenes que se restablece de manera muy evidente con el tratamiento con CBD. Por su parte, la quimiotaxis se ve disminuida en el bazo de las ratas de 15 meses, mientras que el tratamiento con CBD lo restablece. También se encuentra disminuida la capacidad linfoproliferativa tanto en respuesta a CONC A como en respuesta a LPS y el tratamiento con CBD es capaz de restaurar ambas respuestas. Todo ello habla en favor de un efecto muy importante del tratamiento con CBD para mejorar la actividad de un sistema inmunitario reducido en su función por el envejecimiento.

En nuestro estudio el tratamiento con CBD reduce la inflamación disminuyendo la actividad de los componentes del inflammasoma, hasta alcanzar valores similares a los de los animales jóvenes. La disminución del mRNA de pyCARD y NLRP3 determinan la reducción de las citoquinas inflamatorias como la IL18. La IL-1 β sin embargo no se ve afectada por el CBD. La activación del inflammasoma resulta en la hidrólisis y rotura de la procaspasa 1 con formación de caspasa-1 activa que a su vez. Activated caspase-1 permite que pro-IL-1 β y pro-IL-18 pasen a sus conformaciones activas. (Guan et al 2022)

Discusión

Los resultados en las ratas viejas que fueron tratadas con CBD tuvieron menores niveles de estrés oxidativo en células sanguíneas, bazo y timo con respecto a los individuos viejos controles, ya que presentaron mayores defensas antioxidantes y menor cantidad de prooxidantes, consiguiendo que en la mayoría de los casos se alcanzaran resultados equiparables a los obtenidos en los controles jóvenes. Esto pone de manifiesto la elevada capacidad antioxidante del CBD, como habían descrito previamente otros autores (Atalay et al., 2019; Tresguerres et al., 2024) en otros tejidos.

En cuanto a la inmunidad, las ratas viejas tratadas con CBD tuvieron una mejoría inmunitaria tanto de la respuesta innata (mayor actividad NK y mayor capacidad de quimiotaxis) como de la adaptativa (mayor linfoproliferación frente a LPS y ConA) con respecto a las ratas viejas controles, por lo que el CBD produce una mejora inmunitaria general, lo que implica una menor velocidad de envejecimiento (De la Fuente & Miquel, 2009; De la Fuente, 2018;).

Conclusiones

Todo ello nos indica que el CBD es capaz de restablecer casi totalmente la función inmunitaria en los animales viejos de la misma forma que se había demostrado anteriormente por nuestro grupo con la administración de melatonina y otras hormonas, y que además es capaz de bloquear la activación del inflammasoma NLRP3 ●

Bibliografía

- Atalay S, Jarocka-Karpowicz I, Skrzydlewska E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants*. 2020;9(1):21.
- Baeza I, Alvarado Alvarez PC, Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, De La Fuente M. Improvement of leucocyte functions in ovariectomized aged rats after treatment with GH, melatonin, oestrogens or phytoestrogens. *J Reproductive Immunology* 80:70-79(2009)
- Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccari-nelli G, Memo M, et al.
- Cannabis sativa: a comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *J Ethnopharmacol* 2018;227:300e15
- De la Fuente, M. (2018). Oxidation and Inflammation in the Immune and Nervous Systems, a Link Between Aging and Anxiety. En Springer eBooks (pp. 1-31). https://doi.org/10.1007/978-3-319-64597-1_115-1
- De la Fuente, M., & Miquel, J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des* 15:3003-3026.
- Foad A.A., Albuqali W.H., Al-Mulhim A.S., Jresat I. Cardioprotective effect of cannabidiol in rats exposed to doxorubicin toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013;36:347-357.
- Guan Y, Gu Y, Li H, Liang B, Han C, Zhang Y, Liu Q, Wei W, Ma Y. NLRP3 inflammasome activation mechanism and its role in autoimmune liver disease 2022 Sep. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. pp. 25:54(11):1577-1586.
- Juknat A, Pietr M, Kozela E, Rimmerman N, Levy R, Gao F, Coppola G, Geschwind D, Vogel Z. Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. *PLoS ONE*. 2013;8:e61462.
- Pan H., Mukhopadhyay P., Rajesh M., Patel V., Mukhopadhyay B., Gao B., Haskó G., Pacher P. Cannabidiol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008;328:708-714.
- Qi X, Lin W, Wu Y, Li Q, Zhou X, Li H, Xiao Q, Wang Y, Shao B, Yuan Q. CBD Promotes Oral Ulcer Healing via Inhibiting CMPI2-Mediated Inflammasome. 2022 Feb. *J Dent Res*. pp. 101(2):206-215.
- Rajesh M., Mukhopadhyay P., Bătkai S., Haskó G., Liaudet L., Drel V.R., Obrosova I.G., Pacher P. Cannabidiol attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammatory response and barrier disruption. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2007;293:610-619.
- Rajesh M., Mukhopadhyay P., Bătkai S., Patel V., Saito K., Matsumoto S., Kashiwaya Y., Horváth B., Mukhopadhyay B., Becker L., et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010;56:2115-2125.
- Rancan L, Linillos-Pradillo B, Centeno J, Paredes SD, Vara E, Tresguerres JAF. Protective Actions of Cannabidiol on Aging-Related Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis Alterations in Liver and Lung of Long Evans Rats. 2023 Oct. *Antioxidants (Basel)*. p. 9:12(10):1837
- Songkietasak P, Rahman SMT, Aqdas M, Sung MH. NF- κ B, a culprit of both inflamm-aging and declining immunity? doi: 10.1186/s12979-022-00277-w. PMID: 35581646; PMCID: PMC9112493. 2022 May. *Immun Ageing*. p. 17:19(1):20.
- Sottero B, Leonarduzzi G, Testa G, Gargiulo S., Poli G., Biasi F. Lipid Oxidation Derived Aldehydes and Oxysterols Between Health and Disease. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2018:121.
- Tabibzadeh. S., *Signaling pathways and effectors of aging*. Front Biosci (Landmark Ed), 2021 Jan;12(61):50-96.
- Tresguerres, J.A., Linillos-Pradillo, B., Paredes, S.D., Centeno, J., Diaz-Del Cerro, E., De la Fuente, M., Vara, E., Rancán, L. Acciones protectoras y reparadoras tisulares del CBD (cannabidiol) y efectos inmunitarios. *An RANM*. 2024;141(01): 10-18.
- Vomund S, Schäfer A, Parnham M.J., Brüne B, von Knethen A, Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:12.
- Zuardi A W History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J of Psychiatry* 2006 28:153 -157