

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Efecto de la administración de aceite de cáñamo *Cannabis sativa* (CBD)
sobre el índice fagocítico en perros domésticos *Canis lupus familiaris***


Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

Autor:

Ximena Karina Calle Moscoso

Director:

Jaime Eduardo Maldonado Rivera

ORCID:  0000-0003-3392-0236

Cuenca, Ecuador

2023-11-14

Resumen

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar el efecto modulador del aceite esencial de cáñamo CBD, derivado del *Cannabis sativa* sobre el índice de fagocitosis (IF), en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*). Se estudiaron 20 perros, distribuidos entre hembras, machos, adultos y gerontes: los perros recibieron CBD vía oral a razón de 2,5 mg/kg/12h por 21 días. Se establecieron las células fagocíticas y el IF en tres tiempos durante el estudio (día 0, día 10, día 21). Se analizó la varianza de los datos mediante la prueba de T Student para muestras relacionadas e independientes, así como a la prueba de Chi cuadrado para establecer asociación entre los valores del IF y las variables independientes sexo y edad. Se obtuvo diferencias altamente significativas en las células fagocíticas del suero activado e inactivado. En el IF entre perros adultos vs gerontes; y hembras vs machos, no existió diferencia significativa. La administración de CBD reduce significativamente la actividad de las células fagocíticas en sangre periférica de perros, el IF no presentó cambios ya que la actividad del CBD reduce las células fagocíticas tanto en las cultivadas en suero activado e inactivado; en cuanto a los factores edad y sexo, se consideró que estos factores no interfieren sobre el CBD en relación a la modulación de la fagocitosis por vías independientes a la activación del complemento y/o a la reducción en la expresión de receptores para opsoninas.

Palabras clave: dopaje, inmunidad, veterinaria, canes



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The aim of this study was to evaluate the modulatory effect of hemp essential oil CBD, derived from *Cannabis sativa*, on the phagocytosis index (FI) in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). Twenty dogs were studied, distributed among females, males, adults and geronts: the dogs received CBD orally at a rate of 2.5 mg/kg/12h for 21 days. Phagocytic cells and IF were determined at three times during the study (day 0, day 10, day 21). The variance of the data was analyzed using Student's t-test for paired and independent samples and chi-squared test to determine the association between IF values and the independent variables sex and age. Highly significant differences were obtained in the phagocytic cells of activated and inactivated serum. There was no significant difference in IF between adult dogs vs. geronts; and females vs. males. The administration of CBD significantly reduces the activity of phagocytic cells in peripheral blood of dogs, the IF did not present changes, since the activity of CBD reduces phagocytic cells both in those cultured in activated and inactivated serum; as for the age and sex factors, it was considered that these factors do not interfere with CBD in relation to the modulation of phagocytosis through pathways independent of complement activation and/or the reduction in the expression of receptors for opsonins.

Keywords: doping, immunity, veterinary, dogs



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	11
Objetivos	12
1.1 Objetivo general	12
1.2 Objetivos específicos.....	12
Revisión bibliográfica	13
2.1 Historia de la Medicina Cannábica.....	13
2.1.1 Reseña histórica antigua.....	13
2.1.2 Era investigativa de la Medicina Cannábica	14
2.2 Sistema endocannabinoide (SEC).....	15
2.2.1 Función del Sistema endocannabinoide (F-SEC).....	16
2.2.2 Componentes del Sistema endocannabinoide (C-SEC)	16
2.3 <i>Cannabis spp.</i>	21
2.3.1 <i>Cannabis sativa L.</i>	21
2.4 Medicina Veterinaria Cannábica	22
2.4.1 Historia evolutiva.....	22
2.4.2 Historia investigativa	23
2.4.3 Desarrollo de la Medicina Cannábica Veterinaria	24
2.4.4 Historia moderna.....	24
2.5 Legislación	25
2.5.1 Legislación internacional	25
2.5.2 Legislación vigente en Ecuador.....	25
2.6 Medicina cannábica en la especie <i>Canis lupus familiaris</i>	26
2.6.1 Cannabidiol (CBD) en la especie <i>Canis lupus familiaris</i>	27
2.6.2 Metabolismo del <i>Cannabis spp.</i> en perros.....	28
2.6.3 Farmacodinamia del <i>Cannabis spp.</i> en perros.	29
2.6.4 Farmacocinética del cannabis en perros.....	30
2.7 Sistema Endocannabinoide y Sistema Inmunológico (SEC/SI).....	31
3. Materiales y métodos.....	33

3.1 Materiales.....	33
3.1.1 Físicos	33
3.1.2 Químicos.....	33
3.1.3 Biológicos.....	34
3.1.4 Equipos.....	34
3.2 Métodos.....	34
3.2.1 Animales.....	34
3.2.2 Terapia.....	35
3.2.3 Muestras.....	36
3.2.4 Índice de fagocitosis (IF)	37
1.2.5 Cálculo del índice de fagocitosis	38
3.2.6 Análisis estadístico.....	39
4. Resultados.....	40
4.1 Células fagocíticas	40
4.1.1 Índice de Fagocitosis (IF).....	42
5. Discusión	47
Conclusiones	50
Recomendaciones.....	51
Anexos	64

Índice de figuras

Figura 1 - Resumen grafico del ensayo.....	37
Figura 2 - Microfotografías del autor.	45
Figura 3 - Células fagocíticas en suero activado e inactivado	46

Índice de tablas

Tabla 1 - Clasificación taxonómica superior del cannabis.	22
Tabla 2 - Clasificación taxonómica binomial.....	22
Tabla 3 - Farmacodinamia del cannabis en perros.....	29
Tabla 4 - Farmacocinética del cannabis en perros.	31
Tabla 5 - Mezclas.....	38
Tabla 6 - Células Fagocitadas.....	41
Tabla 7 - Índice de Fagocitosis	43
Tabla 8 - Índice de Fagocitosis Nominal.....	44

Dedicatoria

Yo Ximena Karina Calle Moscoso, quiero dedicar este trabajo de titulación a Dios, ya que gracias a él he logrado concluir mi carrera, permitiéndome marcar mis logros, plasmar mis sueños y concebir mis anhelos; los mismos que son parte de mi crecimiento y mi evolución.

Esta tesis es una más de tus bendiciones sobre mí, porque ha sido fruto de la construcción de conocimientos propios, adquiridos y la guía de las personas correctas que, en tiempo, espacio han aportado en mí; en este trabajo, y en el desarrollo del mismo.

Dedico este trabajo a mis padres Miguel Calle y Leonor Moscoso, porque aquí también está plasmado su tiempo, dedicación, esfuerzo, amor y recursos; los mismos que han sido puestos en mí y en la manifestación de mis proyectos. A mis hermanos Maritza Calle Moscoso, Miguel Calle Moscoso, Christian Calle Moscoso, por todo el apoyo moral que me aportan en cada etapa de mi vida.

A mis sobrinas y sobrinos: María Belén, Ana Paula, José Miguel, Christian Sebastián; porque su existencia fortalece la mía, engrandece mi hogar y mi entorno.

Dedico con todo el amor este trabajo y la culminación de este ciclo a mi hijo Gustavo, quien no está presente físicamente conmigo, pero quien es y será siempre mi mayor amor, mi motor, mi fortaleza, mi motivación, representando él en mí, crecimiento, sanación, sabiduría y evolución.

Y para culminar, me dedico a mí misma este trabajo investigativo donde está plasmado mi amor a la profesión, mi tiempo, mi esfuerzo, mi fortaleza y mi resiliencia. Culminando esta etapa académica en gratitud infinita con todo y todos los que fueron parte de ella y abriéndome nuevas oportunidades a seguir formándome profesionalmente.

Agradecimientos

Primero agradezco a Dios por ser mi fortaleza y guía en cada etapa de mi vida; por darme las herramientas correctas a lo largo de mi desarrollo personal y académico; en especial en este periodo de formación universitaria, el cual ha sido forjado a través de sabiduría y concretado en el aprendizaje. De igual manera agradezco de todo corazón a mis pilares fundamentales de desarrollo y crecimiento, mis queridos padres Miguel Fernando Calle Diaz y Leonor Eufemia Moscoso Granda, que día a día me han formado con amor, conciencia, valores, han invertido en mi desarrollo personal, académico; inculcándome responsabilidad y dedicación dentro de esta gratificante profesión de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Gratitud eterna a todos mis maestros que fueron los gestores de mi crecimiento personal y profesional; en especial al Doctor Jaime Eduardo Maldonado Rivera PhD. quien con respeto, sabiduría y paciencia ha sido el impulsador para que este trabajo se desarrolle y se concrete de manera exitosa. Gracias por su esfuerzo, nobleza y consagración sobre la formación académica de cada uno de los estudiantes que hemos tenido la oportunidad de aprender de usted, gracias por compartirnos sus conocimientos científicos; pero sobre todo esa calidad y calidez humana.

Gracias a la Doctora Cristina Bernardi Villavicencio PhD. que además de ser una gran amiga, ha sido un pilar fundamental en mi desarrollo personal y profesional, siendo ella quien impulsa y motiva a un progreso continuo dentro de esta extensa y gratificante área de la salud como es la Medicina Veterinaria. Y por último gracias a todas las personas que de manera consciente aportaron en mi positivamente, motivándome a aprender y a plasmar mis conocimientos de manera genuina, para ejercer en amor y conciencia esta noble profesión.

Gracias

Abreviatura y simbología

SI: Sistema inmunológico

SN: Sistema nervioso

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

MVC: Medicina Veterinaria Cannabinoide

SNM: Sistema neuromodulador

SEC: Sistema endocannabinoide

EC: Endocannabinoides

AEA: Anandamida

2AG: 2- Araquidonilglicerol

CBR: Receptor endocannabinoide

CB: Receptores endocannabinoides

CB1: Receptores endocannabinoides tipo 1

CB2: Receptores endocannabinoides tipo 2

THC: Tetrahidrocannabinidiol

CBD: Cannabidiol

FAAH: Amido hidrolasa de ácidos grasos

MAGL: Monoacilglicerol lipasa

AG: Ácidos grasos

AGE: Ácidos grasos esenciales

IF: Indicie de fagocitosis

PMN: Polimorfonucleares

Introducción

Desde el descubrimiento del sistema de comunicación intercelular endocannabinoide (SEC) y sus componentes (receptores, ligandos endógenos y enzimas) se ha generado gran interés en la comunidad científica para identificar las funciones e interacciones terapéuticas específicas de los cannabinoides exógenos sobre este sistema (Mechoulam R et al., 1995).

La interacción directa entre el SEC y las células del sistema inmunológico, como los Toll-like receptors (TLRs), es un área de investigación en la inmunología que ha despertado gran interés en la comunidad científica (McCoy K.L. 2016). Los TLRs son un tipo de receptor presente en las células del sistema inmunológico, incluidos los macrófagos y células dendríticas, que juegan un papel clave en la inmunidad innata (Ahmed, A et al.,2019). Estos receptores son responsables del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y a daño tisular (DAMPs) en el cuerpo. Cuando los TLRs detectan estos patrones, desencadenan respuestas inmunitarias para eliminar los patógenos y reparar el tejido dañado (Anil et al., 2021).

El cannabidiol, fitocannabinoide del cannabis ha sido estudiado por su capacidad para modular la respuesta inmunitaria a través de la interacción con los receptores cannabinoides en las células inmunitarias (Yekhtin et al.,2022). Estudios recientes en humanos y en animales de laboratorio marcan al CBD como un modulador negativo en la regulación de la expresión de ciertos TLRs (Anil et al., 2021).

La activación del SEC mediada por CBD marca un estímulo directo sobre el CBR-2 aumentando el tono del mismo (McPartland et al., 2006), donde; estudios recientes en humanos deducen que los cannabinoides pueden reducir la expresión de TLRs/TLR4 en células inmunitarias, lo que explicaría sus efectos antiinflamatorios y la atenuación de la respuesta inmunitaria en ciertas condiciones (Henshaw, F.R., et al., 2021).

En este trabajo analizamos las células fagocíticas e índice de fagocitosis en sangre periférica de perros domésticos antes y durante la administración de aceite esencial de *Cannabis sativa* (CBD) como una terapia moduladora sobre la fagocitosis. Siendo la fagocitosis el colofón de la respuesta inmune innata pretendemos aportar con información que permita el uso de CBD en un contexto de la regulación de la inflamación y su potencial uso en distintas patologías en el campo veterinario.

Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto regulador del aceite de CBD cáñamo, derivado del *Cannabis sativa* sobre el índice de fagocitosis en la especie *Canis lupus familiaris*.

1.2 Objetivos específicos

- Contrastar el efecto de la terapia con aceite CBD cáñamo sobre la fagocitosis considerando el factor etario y el sexo de los pacientes.
- Comparar el efecto de la regulación sobre la fagocitosis en dos momentos durante el plan terapéutico.

Revisión bibliográfica

2.1 Historia de la Medicina Cannábica.

2.1.1 Reseña histórica antigua.

Cannabis sativa es una especie herbácea de la familia Cannabaceae, que ha sido parte de la humanidad durante casi toda su historia; es una planta anual, dioica, con una gran capacidad adaptativa, originaria de las cordilleras del Himalaya, Asia; y actualmente distribuida en todo el mundo (Krüger, M. et al., 2022). Se la describe desde los años 1500 A.C. en la farmacología china y se la denomina una planta con múltiples propiedades curativas en el antiguo texto hindú del Atharvaveda (Burstein, S., 2015).

Dentro de la medicina ayurvédica, también se la destacó como una de sus plantas más importantes de la historia; en relación con sus componentes terapéuticos, curativos, medicinales, nutricionales y psicoactivos (Krüger, M. et al., 2022). Desde entonces, la han cultivado por sus diversos usos, no solo en el campo de la medicina, sino también en múltiples industrias aprovechando la totalidad de la planta, así como sus principios activos y su alta plasticidad tanto climática, ambiental y de los múltiples componentes que la conforman (Hurtado et al., 2020).

Escritos han resaltado al cannabis por su alto potencial medicinal y psicoactivo inmerso en aquel tiempo en el ámbito religioso y psicotrópico, siendo denominada y seleccionada como planta sagrada de la era neolítica (Krüger, M. et al., 2022). Medicamente el cannabis fue aplicado para controlar cuadros mesentéricos, gastrointestinales, procesos víricos, neurológicos, neuropáticos tanto en el hombre como en diversas especies animales; donde su potencial terapéutico resaltaba como analgésico, antiinflamatorio, sedante, tranquilizante, anticonvulsivo descrito de forma muy rudimentaria, siendo una de las plantas más usadas para controlar diversas enfermedades (Stasiłowicz, A., et al. 2021).

Hacia el año 1500 D.C. fue ampliamente examinada en diferentes herbarios de la época, uno de los más destacados de la edad media fue el Old English Herbarium en donde se resalta la participación del médico, botánico y filósofo Paracelso (1493-1541) en su libro *Das Neute Buch in der Arznei*, en el cual, mencionó al cannabis como el principal componente de la "Arcana compositum" el mismo que era considerado el medicamento más importante de su época (Komleva, N.E., et al. 2017).

2.1.1.1 Época del prohibicionismo

Se remarca los años 1800-1900 en Estados Unidos, como la era dorada del cannabis medicinal, donde fue utilizado como parte de la terapéutica en diversas patologías y aplicada en diferentes especies. Sin embargo, Harry J. Anslinger, (1930-1934) fue electo como el “primer comisionado de drogas narcóticas de la Oficina Federal de Narcóticos (FBN)” del Departamento del Tesoro de los EE. UU. el cual, difundió información muy drástica sobre las industrias, usos, consumo y aplicaciones del cannabis; utilizando datos estadísticos erróneos, clasificando a esta sustancia como el narcótico más destructivo de la humanidad (Kopustinskiene, D. M., et al., 2022).

A partir de 1940 se observó como el FBN inundó los EE. UU. con propaganda en contra del consumo de cannabis, catalogándolo como el principal narcótico de control masivo, dicha información se expandió a nivel global, restringiendo totalmente su cultivo y sus diversas aplicaciones a nivel mundial (Pérez Ricart, C.A., 2019). Estas restricciones se mantuvieron sólidas basadas en políticas drásticas y controladas hasta finales del siglo XX, limitando la investigación científica e industrial de la planta (Kogan, L., et al., 2019).

Hoy en día se conoce que toda aquella información infundida a inicios del siglo XX tenía un “trasfondo político de dominio y de intereses personales por parte de Anslinger” (Pérez Ricart, C.A., 2019). La historia de la evolución en la investigación científica parte de los trabajos de Raphael Mechoulam (1995), dicho investigador es considerado el padre la medicina cannábica.

Antes del prohibicionismo (1930-1940) el *Cannabis sativa L.* era parte fundamental de la farmacopea veterinaria; y fueron diversas especies de animales modelos que han dado origen al descubrimiento de este sistema de comunicación intercelular (SEC); siendo la Medicina Veterinaria la principal rama de investigación científica dentro de este campo médico. (Canadian Association of Veterinary Cannabinoid Medicina., 2019).

2.1.2 Era investigativa de la Medicina Cannábica

2.1.2.1 Raphael Mechoulam

Raphael Mechoulam, médico, químico herbolario, israelí; de la Universidad Hebrea de Jerusalén. Da origen al renacimiento de la investigación de esta planta atribuyéndole el descubrimiento de la principal estructura química del cannabis, cannabidiol (CBD); y paralelo el aislamiento de la molécula psicoactiva Delta 9-tetrahidrocannabinol (THC), las mismas que

hoy en día siguen siendo las principales moléculas de interés clínico, terapéutico (Mechoulam, R., et al., 1995).

2.1.2.2 Descubrimiento del Sistema Endocannabinoide SEC

Posteriormente, Mechoulam et al (1995) dan a conocer el aislamiento y estructura de un componente cerebral que se une al receptor cannabinoide; el cual es un receptor acoplado a la proteína G aislado de células de neuroblastoma; esta investigación se realizó en cerebros de porcinos denominando a este componente receptor cannabinoides tipo 1 (CB1).

Partiendo de este estudio se aísla de células de leucemia humana el receptor cannabinoides tipo 2 (CB2), que se encuentra en abundancia en las células inmunes, en microglía y astrocitos activados; hallazgos que dan indicios al descubrimiento del sistema endocannabinoide (SEC), el cual es una red de comunicación intercelular presente en el organismo de los vertebrados; marcando un antes y un después en la ciencia médica cannábica (Mechoulam, R., et al., 1995).

El aislamiento de los EC da origen al SEC, un sistema neuromodulador, conformado por compuestos químicos que se producen de forma natural en el organismo de individuos que han desarrollado este sistema (Mechoulam, R. et al., 1995). Los componentes del SEC se forman a partir de nutrientes como los ácidos grasos (AG) y ácidos grasos esterificados (AGE) de donde parte la síntesis de la anandamida y ácido araquidónico como respuesta al aumento de Ca intracelular, usando como base estructural los fosfolípidos de membrana (Guiffrida, A., et al., 2001).

2.2 Sistema endocannabinoide (SEC).

El SEC comprende una serie de: receptores (CBR), ligandos (EC) y enzimas de metabolización (EM); que actúan sobre la recaptación de proteínas de biosíntesis, transporte y degradación, para la síntesis, estabilización y formación de los componentes que lo conforman (Ángeles López G.E., et al., 2014). Se encuentra como una red en todo el organismo de individuos que han desarrollado este sistema, se encuentra constituido principalmente por dos receptores fijos denominados (CBR-1 y CBR-2), y una serie de receptores recirculantes (GPR55, GPR18, GPR119); donde, sus ligandos fisiológicos (lípidos sintetizados a partir del ácido araquidónico endógeno) y enzimas de metabolización (FAAH y MAGL) son responsables de la síntesis y degradación de los endocannabinoides que

conforman esta red moduladora sistémica de comunicación intercelular (Iffland, K. y Grotenhermen, F., 2017).

La acción del SEC está determinada por la unión que emerge entre los canales de los receptores y sus ligandos (CBR/1-2 y los EC), los cuales que actúan del mismo modo que lo hacen una cerradura y su llave, acoplándose para ser mediador de la actividad intra y extracelular, teniendo como función la activación de rutas metabólicas y la formación de factores de transcripción que desembocan en cambios en la proteómica celular que se traducen como las acciones finales del sistema endocannabinoide sobre los procesos fisiológicos del cuerpo (Henshaw, F., et al., 2021).

2.2.1 Función del Sistema endocannabinoide (F-SEC)

El SEC juega un papel esencial sobre la regulación de la ingesta y metabolismo energético, con la finalidad de mantener la homeostasis, así como tiene una acción reguladora directa sobre la neurotransmisión y el funcionamiento de diversos órganos y sistemas (Noriega Prieto, J. a., et al., 2023).

Su principal acción se encuentra establecida por la interacción directa con las células que conforman el sistema inmunológico (SI), el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP); de esa manera participa en la regulación de funciones fisiológicas vitales en cada uno de los sistemas que constituyen un organismo (Du Pérez, K., et al., 2021).

2.2.2 Componentes del Sistema endocannabinoide (C-SEC)

2.2.2.1 Cannabinoides

Los cannabinoides son moléculas químicas que interactúan sobre receptores endocannabinoides específicos (CB1, CB2, GPR55, GPR18-19, TRPV) (Henshaw, F., et al., 2021), endógenamente se sintetizan de manera constitutiva a partir de fosfolípidos de membrana en respuesta al incremento de calcio intracelular en la remodelación de la membrana celular y el metabolismo de los lípidos; donde se liberan enzimas receptoras de AGE, que actúan como ligandos de receptores cannabinoides (CBR/CB), teniendo como función principal modular la red de comunicación psiconeuroinmunoendocrinológica, en la cual emerge simultáneamente la participación de ligandos receptores enzimáticos sobre el proceso biológico de síntesis, activación y degradación de dichos componentes (Gabriele, V., et al., 2023).

2.2.2.1.1 Tipos de Cannabinoides

Existen tres fuentes principales de donde provienen los cannabinoides:

Endocannabinoides son los denominados cannabinoides producidos por el cuerpo, los mismos que se sintetizan a través de ácidos grasos esenciales AGE como es el Araquidonoil glicerol (AEA/2-AG) (Gabriele, V., et al., 2023); los cannabinoides exógenos son extraídos principalmente de plantas y se los denomina fitocannabinoides, la principal planta donde se extrae este compuesto es el *Cannabis sativa L.* (Gilchrist, E., Wang, S. y Quilichini, T., 2023); siendo el CBD y el THC las principales moléculas que interactúan con los receptores del SEC ya que su función y estructura es similar entre (AEA y TCH) y (2-AG y CBD) (Iuvone, T., et al., 2009). También existen cannabinoides sintéticos los cuales son químicos artificiales, su uso y aplicación en clínica e investigación están restringidos por la inestabilidad molecular de sus componentes (acción tóxica y letal). (Osei-Hyiaman, D., et al., 2005).

2.2.2.2 Receptores

Los receptores son proteínas transmembrana, capaces de transmitir una señal extracelular, los receptores CBR tipo 1 se encuentran principalmente en el cerebro (SNC), mientras que los receptores CBR tipo 2 se encuentran principalmente en células del sistema inmunológico (SI) y en tejidos periféricos, siendo estos receptores puntos de anclaje de la red de comunicación intercelular donde se desencadena su acción moduladora (Henshaw, F.R., et al., 2021).

Las proteínas expresadas en la superficie celular de diferentes órganos que conforman los sistemas poseen la plasticidad para mantener una regulación mediada por el SEC (Jones, N., et al., 2012).; su mecanismo de modulación sobre este sistema y la regulación de la función celular se da por el reclutamiento de factores de transcripción del núcleo, el cual determina la homeostasis del metabolismo mitocondrial ajustando el metabolismo celular energético a las necesidades celulares (Clarke, T.L., et al., 2021).

Los principales receptores son (CBR-1) y (CBR-2); autores como Bonini, S. A., et al (2018) describen un tercer receptor denominado "huérfano o recirculante" (CBR-GPR55), el mismo que posee la capacidad de interactuar simultáneamente sobre los receptores 1 y 2. Dicho receptor recirculante tiene actividad regulatoria mediadora sobre el SEC, lo que facilita la recaptación endotelial de los CBR1- CBR2 para mantener la homeostasis. (Mastinu, A., et al., 2018).

Los denominados receptores no clásicos o huérfanos; GPR55, GPR18, GPR19 son CBR recirculantes que tienen como principal función modular la presión arterial, se distribuyen por

sangre y además participan en la distribución de los cannabinoides de manera sistémica para la fijación sobre los principales receptores (Ryberg, E., et al., 2007).

2.2.2.2.1 Receptor tipo 1 (CBR-1)

El CBR-1, metabotrópico es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), se encuentra distribuido principalmente en el sistema nervioso central, con altas concentraciones a nivel de la corteza, núcleo estriado (núcleo caudado y putamen), ganglios basales, hipocampo, cerebelo y en menor cantidad a nivel del hipotálamo, amígdala, materia gris periaqueductal, medula espinal; así como en otras zonas del cerebro, principalmente en el telencéfalo y el diencefalo (Mechoulam, R., et al., 1995).

Se expresan también en menor densidad sobre varios órganos periféricos, tejido adiposo, hígado, pulmones, musculatura lisa, tracto gastrointestinal, células beta del páncreas, endotelio vascular, órganos reproductivos, células inmunes, estructuras nerviosas periféricas sensoriales y simpáticas (Ryberg, E., et al., 2007).

En el estudio realizado por Mastinu et al, (2018) determinaron que los receptores CB1, en los seres humanos no se expresan en ningún grado en el tronco del encéfalo o en el bulbo raquídeo, razón por la cual se considera que el uso de cannabinoides es seguro en esta especie, y en la mayoría de primates no humanos, ya que no se involucran en funciones autónomas vitales como la regulación cardio-respiratoria.

2.2.2.2.1.1 Localización anatómica de los CBR-1 en la especie *Canis lupus familiaris*.

Mediante análisis inmunohistoquímicos, se ha determinado que el receptor CB1 se expresa en mayor cantidad en el córtex cerebral, tálamo, hipotálamo, cerebelo, núcleo accumbens, globo pálido de perros clínicamente sanos (Freundt-Revilla, J., et al., 2017; Kra, G., et al., 2022); existe una notable acción de los CBR-1 sobre el SNC y los mecanismos moduladores de la profundidad, frecuencia y ritmo cardio-respiratorio; por la alta densidad de expresión de CB1 en los centros neurales del tronco encefálico que controlan principalmente estos sistemas se determina la mayor sensibilidad de esta especie a los fitocannabinoides como el THC y sus derivados (Corsato et al., 2023).

Canadian Association of Veterinary Cannabinoid Medicine (2019), determinó la presencia de CBR1 en el SNP, a nivel de terminaciones nerviosas, células satélites de las vainas de Schwann mielinizantes, ganglios de la raíz dorsal, resaltan mediante inmunomarcaje una elevada reactividad de PMN en astrocitos, estructuras meníngeas anexas a la corteza

cerebral, cornu ammonis, circunvolución dentada del hipocampo, mesencéfalo, cerebelo, bulbo raquídeo y la materia gris de la médula.

En un estudio realizado por Fernández Trapero et al (2017) encontraron una menor expresión de CB1 en el SNC de perros gerontes al compararlos con perros jóvenes. A partir de estos hallazgos se planteó un trabajo similar comparando la expresión en cachorros y neonatos humanos, donde se observó una expresión reducida en los tejidos neonatales (Campora, L., et al., 2021). Benavides Melo et al, (2022) examinaron embriones caninos de 30 días, con la finalidad de localizar receptores CB1 mediante inmunohistoquímica, donde obtuvieron una mayor inmunoreactividad principalmente en los tejidos epiteliales; y también una extensa reactiva en estructuras SNC, SNP, tejido oftálmico, tiroides, oído interno, epitelio olfatorio y las estructuras anexas.

2.2.2.2 Receptor tipo 2 (CBR-2)

Los CBR-2 participan en la activación de canales de potasio como mecanismo de señalización para transportar EC al interior de la célula, y de esa forma tener acceso a la membrana mitocondrial externa y su ligando en proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (Ryan, D., et al., 2009; Hassan, S et al., 2014).

La activación de los receptores (CB2) dentro del SEC reduce la actividad de la adenilciclase regulando negativamente la vía del Camp; desencadenando la modulación de procesos nociceptivos al desensibilizar la señalización neuronal (TRPV1), inhibiendo la vía adenilciclase, misma que es esencial para mantener la fosforilación y sensibilización de TRPV1 (canal catiónico potencial receptor transitorio subfamilia V miembro 1, también conocido como “receptor de capsaicina” y “receptor vanilloide 1”). Teniendo como acción la disminución de la actividad eléctrica periférica (De Almeida, D., y Levi, L. A., 2020).

El CBR-2 metabotrópico (GPCR), se localiza principalmente en células del sistema inmunológico; macrófagos, neutrófilos, monocitos, linfocitos T y B; células microgliales (Vuic, B., et al., 2022). La activación de células inmunitarias moduladoras de procesos inflamatorios mediados por el SEC inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias y posteriormente la liberación de citocinas antiinflamatorias (Fernández-Trapero, M., et al., 2017).

En los linfocitos la activación de CB2 por cannabinoides inhibe la actividad de la adenilciclase y por lo tanto la formación de AMP cíclico que regula la expresión de distintos receptores celulares haciendo que las células modulen la expresión de proteínas transmembrana,

especialmente las moléculas estimuladoras de la sinapsis inmunogénica durante la presentación de antígenos (Henshaw, F.R., et al., 2021).

Las cascadas de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), modulan canales iónicos y modifican los niveles de calcio intracelular produciendo a la liberación de señalizadores celulares para compensar el daño tisular (De Almeida, D., y Levi, L. A., 2020).

2.2.2.2.1 Localización anatómica de los CBR-2 en la especie *Canis lupus familiaris*.

En cuanto a la distribución se ha identificado en caninos una ligera expresión de CBR-2 en células del SNC; astrocitos, células microgliales y neuronas del tronco del encéfalo, marcando una elevada densidad de CBR-2 en el SNP, células gliales y células que conforman el sistema inmune (linfocitos T), (Campora, L., et al., 2017).

Kano, (2014) en su análisis identifico la presencia de CB2 en tejido epitelial, en queratocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas, en células óseas (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), en hepatocitos, células secretoras de somatostatina en el páncreas (Beta), macrófagos, neutrófilos y monocitos.

2.2.2.3 Enzimas

Las principales enzimas involucradas son las hidrolasas de amida de ácido graso (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), responsables de la síntesis y degradación de los endocannabinoides en el organismo (Katamaya, K., et al., 1997).

2.2.2.3.1 FAAH

Del grupo de enzimas serin hidrolasas, implicada en el metabolismo de los cannabinoides, encargada de degradar a la anandamida (AEA); con propiedades catalíticas usuales, pero es más propensa a la degradación proteolítica, tiene una vida media plasmática corta (30 minutos), llevando a un aumento en la señalización de N-aciletanolamina (NAE) y AEA en los receptores CB1 (Osei-Hyiaman, D., et al., 2005).

2.2.2.3.2 MAGL

Pertenece a la familia de enzimas serin hidrolasas, es la encargada de la activar procesos como la síntesis, metabolización y degradación de los cannabinoides, ejerce acción sobre el ácido araquidónico para la producción del endocannabinoide 2 Araquidonilglicerol 2-AG (Campora, L., et al., 2017). Su vida media plasmática oscila entre de 120 y 130 minutos (Mechoulam R., 1995).

Encargada de Hidrolizar mono ésteres de glicerol de ácidos grasos (AGE) de cadena larga por acción de la lipasa sensible a hormonas (LIPE), también hidroliza las reservas intracelulares de triacilglicerol de los adipocitos en ácidos grasos (AG) y glicerol (Blankman, J., Simon, G., y Cravatt, B., 2007). Como consecuencia de la actividad de esta enzima se produce recaptación de cannabinoides en receptores CB1- CB2. (Araque, A., et al., 2017).

2.2.2.4 Ligandos

Son derivados del ácido araquidónico, que se asocian a la proteína fijadora de guanina (proteína G) expresadas en las llamadas células señaladoras, uno de los principales ligandos del SEC es el N-Araquidonoiletanolamina, este actúa directamente sobre receptores endocannabinoides de las células diana en conjunto con el segundo ligando seguido el 2-Araquidonoilglicerol (2-AG) (Russo, E., 2005). Actúan activando los receptores del SEC, permitiendo el incremento de calcio intracelular (Ca²) y activando los receptores metabotrópicos (Ryan, D., et al., 2009).

2.3 *Cannabis* spp.

Es una sola especie herbaria, a la cual, se le ha otorgado una clasificación descriptiva como especie *sativa*, *indica* y *rudelaris* en relación a la morfología de su hoja (delgada, ancha), así también, se la clasifica en Tropicalizada y Afganizada según la distribución geográfica (Ángeles López, G., et al, 2014).

2.3.1 *Cannabis sativa* L.

La especie *Cannabis sativa* posee elevadas concentraciones de CBD y reducidas de THC; las cuales son muy importantes para una aplicación terapéutica (Hanuš, L.; et al., 2016). Los principales fitocannabinoides estudiados para uso terapéutico son el Cannabigerol (CBG), precursor de los otros dos compuestos CBD y THC, ya que por acción enzimática el CBG es transformado en CBD y THC, proceso que sucede según el estado de madurez de la planta (Noriega-Prieto, J.; Kofuji, P. y Araque, A. 2023).

Además de los cannabinoides del *Cannabis* spp. se han aislado otros compuestos como los terpenos y flavonoides responsables del olor y color del color característico de la planta y sus extractos; la presencia de fitocannabinoides, terpenos y flavonoides de la planta generan una sinergia terapéutica llamada efecto séquito (Maxfield, A., 2019).

2.3.1.1 Taxonomía

2.3.1.1.1 Categoría taxonómica superior

Tabla 1-Clasificación taxonómica superior del *Cannabis spp.*

Reino	<i>Plantae</i>	Plantas
Subreino	Traqueobionta	Plantas vasculares
Superdivisión	Spermatophyta	Plantas con semilla
División	Magnoliophyta	Plantas con flor
Clase	Magnoliopsida	Dicotiledóneas

2.3.1.1.2 Categoría taxonómica binomial

Tabla 2-Clasificación taxonómica binomial del *Cannabis sativa*.

Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Genero	Cannabis
Especie	Sativa
Subespecie	Sativa

2.4 Medicina Veterinaria Cannábica

2.4.1 Historia evolutiva

El SEC, se encuentra presente en casi todo el reino animal; su principal función es mantener el equilibrio a través de los componentes de su red de modulación sistémica. McPartland et al., 2006, indican que su desarrollo filogénico está marcado de manera conjunta con el sistema nervioso en los vertebrados, trascendiendo un camino de transformaciones donde el ácido araquidónico es su fundamental representante.

El Ácido Araquidónico es la estructura fundamental que da origen a los endocannabinoides aislados hasta el momento; siendo pieza clave sobre la evolución de este sistema de comunicación intercelular (SEC) que proviene del sistema del ácido araquidónico de las plantas y termina su viaje en el gen ortólogo de la especie marina *Ciona intestinalis* (Matías, I., et al., 2005)., un pariente cercano a los vertebrados actuales en el cual se ha aislado el receptor cannabinoide CB1 (Clarke, T.L., et al., 2021).

Los mamíferos no son los únicos organismos vivos que poseen este complejo mecanismo homeostático, en la actualidad; algunos invertebrados: insectos (hormigas), anélidos e invertebrados acuáticos (sanguijuelas, caracoles), han mostrado indicios de la presencia de este sistema. Diferentes ensayos de laboratorio con cannabimiméticos sobre estos individuos, demostraron reacción del CBR-1 sobre el estímulo de algunos endocannabinoides ante la presencia de inducciones neurobiológicas, teniendo actividad frente al apetito y el dolor (Zamith Cunha, R., et al.,2023).

2.4.2 Historia investigativa

Las principales especies de interés investigativo donde se han probados estos cannabinoides provenientes de las plantas del género Cannabis, han sido animales de laboratorio como roedores, monos, perros y algunas especies de reptiles y anfibios; donde se demostró que este sistema no solo se encuentra presente en vertebrados mayores; si no también, en los dos grupos anteriormente nombradas (Carlini, T., et al., 1974). A manera rudimentaria tiene actividad sobre estímulos y marcadores medioambientales a los que han sido sometidos, evidenciando su función principal; ser modulador (Soria-Lara, D.M., et al., 2019).

Considerando que los primeros descritos investigativos están enfocados en intoxicación por cannabis; hoy en día tenemos estructuras científicas más sólidas que nos permiten desarrollar este campo medico científico; aplicándolo con seguridad, criterio y ética sobre diferentes tipos de terapias en diversas patologías, donde se encuentre comprometido este sistema (Abrahamov, A., Mechoulam, R 1995).

El Dr. Ethan Russo, Farmacéutico investigador científico más influyente en cannabis medicinal y proveniente de familia de médicos veterinarios, plantea datos específicos históricos en animales sobre aplicaciones terapéuticas en trastornos manejados con fitocannabinoides. Destacó su uso sobre sistema gastrointestinal, aplicado frecuentemente sobre cuadros entéricos, disentería en ganado vacuno, caprino y ovino en la India (2005) utilizaban para estimular el flujo de leche en las vacas y a su vez apaciguarlas. En bueyes se suministraba continuamente ya que observaban aumentos significativos energéticos, reflejados en su capacidad de trabajo (Russo, E., 2005).

Las primeras investigaciones científicas relevantes dentro del área de medicina veterinaria partieron en la Universidad de Cornell, donde destacaron la acción del cannabidiol sobre el incremento de la supervivencia de equinos infectados con tétanos; además de evaluar su uso sobre cuadros clínicos agudos de cistitis demostrando la eficacia de la interacción de diversos

cannabinoides en la fase excitatoria de la azotemia y en la rabdomiólisis por sobrecarga de equinos (Cornell University, 2022). En el centro de investigación de la Universidad de Pensilvania realizan un estudio comparativo en diversas especies de animales, evaluando la respuesta neuromotora sensorial frente al estímulo de dolor, donde resaltan las propiedades analgésicas, antiespasmódicas e hipnóticas del cannabis (Hassan, S., et al., 2014).

2.4.3 Desarrollo de la Medicina Cannábica Veterinaria

A medida que se han aislado diferentes tipos de fitocannabinoides, se han ido evaluando su acción y respuesta terapéutica en diferentes especies, en relación a la respuesta sistémica frente a sustratos que contienen mezclas de cannabinoides aislados o en combinación con THC, en respuesta a la farmacodinamia y farmacocinética, marcando diferencias de sensibilidad a los componentes entre especies (Berghuis, P., et al, 2005).

Hoy se conocen más de 100 fitocannabinoides con potencial terapéutico comprobado extraídos de la planta del cannabis y a su vez se han reconocido nuevos receptores, denominados circulantes, con importante actividad reguladora sobre el SEC (Islas-Andrade, S., et al., 2023). Esto abre un amplio abanico de posibilidades terapéuticas para su aplicación en medicina animal y humana (Wei, X., et al.,2021).

La estrecha relación neurobiológica y sistémica entre animales y personas ha permitido realizar estudios en modelos humanos y animales con resultados preclínicos extrapolables entre especies (Márquez, L., Abanades, S y Andreu, M., 2008). Sin embargo, es necesario el estudio de los fitocannabinoides en el contexto de cada especie por las particularidades biológicas e idiosincráticas, a nivel especie e individual.

2.4.4 Historia moderna

Partiendo de una descripción completa del SEC de los mamíferos, surge un entorno académico científico del cannabis y sus diversas aplicaciones en el área médica, en el que; investigadores veterinarios empiezan a enfocar análisis clínicos en distintas especies, determinando las propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiepilépticas, regenerativas, neuroprotectoras e inmunomoduladoras que poseen los compuestos, y que en principio no varían grandemente de los efectos observados en la especie humana (MacNaughton, W., et al., 2004).

Sin embargo, Soria Lara, D.M. et al (2019). mencionan que es importante considerar que hay diferencias en el SEC de cada especie y que incluso puede haber diferencias entre razas, por

lo que se pueden tener diferentes reacciones orgánicas en relación con la exposición, administración y dosis de los diferentes cannabinoides.

En la actualidad, se considera a la medicina cannábica como una rama de interés científico, con enfoque a especialidad en el área médica (Anil et al., 2021). Es importante, destacar que; debido a las diferentes leyes y regulaciones en cada país la aplicación y uso de cannabis puede variar y estar sujeto a restricciones legales (Baratta, et al., 2022).

2.5 Legislación

A nivel mundial, la regulación de terapéuticos derivados del *Cannabis Sativa L.* varía considerablemente de un país a otro, su aplicación clínica e investigativa están bajo regímenes legislativos (Voelker, 2020). Algunos países han establecido agencias específicas para regular el uso medicinal del cannabis y sus derivados; mientras que otros han integrado la regulación de productos de cannabis en agencias de salud ya existentes (FDA) (Baratta et al., 2022); con la finalidad de establecer industrias controladas que generen salud desde una perspectiva ética y científica (Bantjes, Myers y Parry, 2022).

2.5.1 Legislación internacional

La FDA ha establecido un límite federal de 0,3% de THC con cantidades variables de CBD que van desde 0-88mg/ml de extracto esencial de cannabis que sean de extracción industrial con aplicación terapéutica investigativa, considerando que el THC (molécula psicoactiva) tiene grandes propiedades terapéuticas su uso en microconcentraciones potencializa el efecto del resto de cannabinoides no psicoactivos (Pérez Ricart, C.A., 2019). La implementación tanto en el área clínica terapéutica e investigativa deben ir ligados a las normativas vigentes del país donde se desarrolla este tipo de terapéutica.

2.5.2 Legislación vigente en Ecuador

Ecuador, el 17 de septiembre de 2019. Art. 127 de la reforma orgánica, retira de las sustancias controladas al cannabis. Desde el 21 de junio de 2020, las reformas que establece la Ley al Código Orgánico Integral Penal (COIP), incluyen la despenalización de la tenencia de drogas que contengan como principio activo cannabis con menos del 1% de THC (compuesto psicoactivo), es decir; permite el cultivo, venta, expendio de cáñamo y sus derivados de grado medicinal no psicoactivo (Alcívar Trejo, C., et al., 2023).

Donde se aprueba el uso de extractos derivados del cannabis para fines terapéuticos, paliativos, médicos, científicos. Permitiendo la implementación del consumo y comercialización de *Cannabis Sativa L.*

2.5.2.1 Regulación vigente del Ecuador

Su regulación está dada a través del ministerio de agricultura que otorga las licencias para siembra, producción, comercialización, importación, exportación de semillas y derivados del cáñamo industrial. En Ecuador, el ARSA es la entidad encargada de la vigilancia y control de productos derivados del cannabis para consumo humano.

Agrocalidad es la agencia regulatoria de productos de uso veterinario; a quien corresponde manejar el control y vigilancia sobre la reglamentación legal de productos derivados del cannabis y aplicados en diversas especies animales, basándose en fundamentos científicos y éticos que permitan desarrollar esta terapéutica en nuestra área.

2.6 Medicina cannábica en la especie *Canis lupus familiaris*.

Luongo et al, (2012) en su estudio sobre la estimulación y sensibilidad sistémica en humanos y perros, exponen las significativas diferencias entre estas dos especies frente a la exposición de *Cannabis spp*, en la expresión y captación del SEC y sus componentes.

McGrath et al, (2018) en su estudio específico sobre “Localización y cuantificación de los receptores cannabinoideos en perros”, determinó que la distribución de receptores es similar a la de los humanos. Sin embargo; los receptores cannabinoideos tipo 1 y 2 están expresados y distribuidos en mayor porcentaje en la especie canina a nivel cerebral y sistema inmunológico, esta sería la razón primordial por la que los perros son más sensibles a los fitocannabinoideos como el THC, ya que el receptor CB1 abunda en el sistema nervioso central.

Bartner et al, (2018) indican que es fundamental conocer la doble metabolización de los fitocannabinoideos en los perros, esto genera el desdoblamiento del TCH en dos metabolitos activos con potencial psicoactivo con efecto más potente que Delta 9-THC, estudiado en humanos. Siendo estos el 8-Tetrahidrocannabinol y el 11-Delta –Tetrahidrocannabinol, también es destacable la gran expresión del receptor CB2 que permite una mayor captación de CBD, especialmente en células inmunitarias lo que se conoce como una “alta recaptación sistémica” (Gabriele, V., et al., 2023).

2.6.1 Cannabidiol (CBD) en la especie *Canis lupus familiaris*.

Según algunos autores el uso del CBD en perros requiere mucho estudio para establecer una terapéutica segura debido al doble metabolismo hepático de los fitocannabinoides en esta especie (Stasiłowicz, A., et al., 2021). Además, aún no hay una adecuada estandarización de procesos de extracción, almacenamiento, que garanticen la concentración, estabilidad y pureza de los compuestos (Wimalasiri, E., et al., 2021).

Las primeras investigaciones del cannabis en perros fueron toxicológicas en el contexto del consumo accidental por perros con dueños consumidores. Estos estudios se enfocaron en los niveles de toxicidad y sus efectos (Miranda-Olivos, R., et al., 2023). Uno de los principales usos ha sido la aplicación conjunta de CBD con fenobarbital en el control de la epilepsia, conocida como terapia multimodal, con importantes efectos positivos (Góngora-Gómez et al., 2020).

Otros aspectos del uso medicinal del CBD en perros incluyen, la actividad antiproliferativa en procesos tumores mamarios y gliomas al interaccionar directamente con los CBR/1-2 y receptores recirculantes en el SEC expresados en células que ya han modificado su morfología (Gross, C., et al., 2021); activa su potencial agonista y antagonista frente al tejido tisular comprometido en diversas patologías proliferativas con la finalidad de reducir o inhibir el proceso (Iuvone et al., 2009).

También se ha usado el CBD en la terapia antiinflamatoria para la inhibición de los compuestos producto de la acción de COX-1 y COX-2 (Burststein, 2015); Se ha estudiado el CBD como inhibidor de la neurodegeneración en perros con moquillo, por su acción inhibitoria de la toxicidad por glutamato o de la muerte inducida por especies reactivas de oxígeno (ROS) al generar un ambiente antioxidante (Krishnan et al., 2009).

El CBD tiene una importante acción analgésica al reducir los niveles de varios mediadores del dolor como la prostaglandina E2, peróxido de lípidos, óxido nítrico; además de su efecto sedante y al modular o inhibir la neuropercepción. (Kopustinskiene, D.M., et al., 2022); tiene acción sobre el SEC del sistema músculo esquelético, al activar los CBR-2 regula la hiperalgesia térmica, modula la percepción sensorial del musculo (Komleva, N.E., et al., 2017). También facilita la proliferación del fenotipo microglial antiinflamatorio en la asta dorsal de la médula espinal, en cuadros de osteoartritis, displasia de cadera y rotura de ligamento cruzado (Kogan et al., 2019).

2.6.2 Metabolismo del *Cannabis spp.* en perros.

Samara E et al, (1988) determinaron que el CBD en solución hidroalcohólica con 45 a 90 mg en 1,5 ml, vía endovenosa y vía oral en capsulas de gelatina con 180 mg, dejó una vida media plasmática (V.M.P) de 7 a 9 horas, por ambas rutas. Tanto el CBD como el THC son sustancias lipofílicas que tienden a ser poco solubles en agua, y por otro lado tienen una gran afinidad por los receptores de origen lipídico, por lo que luego de su administración los valores plasmáticos caen notablemente por su unión a receptores y ligandos específicos, sin embargo, su efecto permanece de manera variable dependiendo de los sitios de expresión de receptores en el SEC, que tiene relación directa con la ruta de administración del compuesto (Schofs, L., et al., 2021). Es importante destacar que el THC es inestable en el pH gástrico, por lo que la administración oral del compuesto puede no alcanzar niveles terapéuticos sostenidos, por lo que la dosis debe ser ajustada a estas consideraciones, pero especialmente la presentación farmacológica, aceites y tinturas tienen diferentes tasas de absorción por vía oral (Wakshlag, J.J., et al., 2020).

Bartner et al, (2018) hicieron un estudio usando tres formulaciones de CBD para su aplicación en perros, aceite oral microencapsulado, aceite oral simple, y pomada transdérmica, con dosis de 75 o 150 mg / 12 h./ 6 semanas consecutivas. Los resultados mostraron que la reacción sistémica es proporcional a la dosis y que la vía oral proporciona un perfil farmacocinético más favorable con el uso de aceite microencapsulado.

Vaughn et al, (2021) realizaron un estudio doble ciego para la administración de CBD en perros (CBD, placebo) CBD, 2mg/kg oral cada 12 horas, o placebo cada 12 horas. Se reveló una vida media de eliminación de 4,2 h sin efectos secundarios observables. La evaluación mostró una disminución del dolor durante el tratamiento con CBD. Los propietarios no informaron efectos secundarios, aunque se evidencio aumento de la fosfatasa alcalina.

La asociación canadiense de medicina veterinaria cannábica nombra que es importante resaltar que en el perro las enzimas que son encargadas de metabolizar fitocannabinoides también actúan en el metabolismo de AINES, Warfarina y diazepam, esto aumenta el riesgo de intoxicación cuando se suministra CBD junto con estos medicamentos (Cinar, R., et al., 2020). Por otro lado, la enzima CYP3A participa como catalizador en alrededor del 30% fármacos (Gill, A.R., et al., 2022). Por lo tanto, es importante considerar estas particularidades especialmente cuando se dosifican cannabinoides en terapia multimodal (Kale, V.P., et al., 2019).

Los compuestos de amplio espectro que aplican nanotecnología con partículas menores a 25 nanómetros se evitan el doble metabolismo hepático en perros, y se alcanza una biodisponibilidad del 95%. Esto permite suministrar el producto con intervalos que de 8 horas sin riesgo de intoxicación (Kra, G., et al., 2022).

2.6.3 Farmacodinamia del *Cannabis spp.* en perros.

Los fitocannabinoides modulan al SEC, por su acción directa sobre los receptores, por tanto, su movimiento y vida media depende directamente de la expresión de dichos receptores, que como se ha mencionado se expresan de manera diferente en los distintos sistemas. (Deabold, K., et al., 2019). Su comportamiento es muy diferente a los endocannabinoides ya que estos se producen de manera corta y rápida bajo estímulos puntuales, mientras que los fitocannabinoides poseen un tiempo de acción mayor con una V.M.P alrededor de 8-10 horas (Benavides Melo, C. J., et al., 2022).

Los fitocannabinoides Interactúan con múltiples neurotransmisores como: glutamato (principal neurotransmisor inhibitor), GABA (principal neurotransmisor excitador), dopamina, serotonina, acetilcolina, dopamina, histamina, prostaglandinas, norepinefrina y péptidos opioides; siendo moduladores agonistas y antagonistas de las células que son reguladas por estos mensajeros químicos al excitar o inhibir señalizaciones y respuestas (Freundt-Revilla, J., et al., 2017). El CBD, además de interactuar con los neurotransmisores anteriormente nombrados tiene la capacidad de fijarse y accionar sobre todos los receptores del SEC (CB1, CB2, TRPV (TRPV-1; TRPV-1,3; TRPV 1-4), GPR55, GPR18, GPR19, 5-HT1A); regulando la homeostasis de los mecanismos psiconeuroinmunoendocrinológicos (Corsato Alvarenga et al., 2023).

Tabla 3-Farmacodinamia del cannabis en perros relación (EC, CBR, CB acción).

FITOCANNABINOIDE	RECEPTOR	ACCIÓN
THC	CB1	Modulador agonista
THC	CB2 / TRPV	Parcialmente agonista
CBD	CB2/ TRPV	Modulador agonista
CBD	CB1/ GPR55	Antagonista
CBD	5-HT1A	Subtipo CBR Serotoninérgico

2.6.4 Farmacocinética del cannabis en perros

2.6.4.1 Vía de administración oral

Es la vía más utilizada en diversas especies para usada para la administración extractos terapéuticos de CBD. En perros se emplea esta vía por su buena absorción y la facilidad para suministrar compuestos, en esta especie no existe diferencia significativa si se suministra en ayuno o después de la ingesta de alimentos (Kogan, L., et al., 2019).

2.6.4.2 Metabolismo

El CBD administrado en perros vía oral tiene principalmente un metabolismo hepático que de acuerdo al tamaño molecular puede tener un doble mecanismo metabólico (microemulsión liposomal) esto incide fundamentalmente en la absorción plasmática de las moléculas del CBD. El citocromo PY450 es el grupo enzimático encargado del desdoblamiento de estas biomoléculas, el PY450 es principalmente aportado por el metabolismo hepático (Schofs, L., et al., 2021).

Las proteínas del citocromo PY450 utilizan un margen amplio de compuestos endógenos y exógenos como sustratos de sus reacciones enzimáticas. Para la metabolización de moléculas cannabinoides en el perro participan dos grupos de familias enzimáticas provenientes del CPY450 (Zgair, A.; Wong J.C., 2016).

En el primer paso metabólico actúan principalmente las enzimas CYP2C9 y CYP2C19, reduciendo las partículas a grado nanométrico. Las enzimas CYP3A trabajan en el segundo paso metabólico generando una microemulsión para que los compuestos de CBD puedan adherirse a las lipoproteínas plasmáticas, distribuidas y absorbidas hacia el torrente sanguíneo (Bradley, S., et al., 2022).

2.6.4.2.1 Pasos metabólicos del CBD

1. El CBD se encuentra en la planta como CBDa (forma ácida del cannabidiol), en el proceso calórico del proceso de extracción de transforma en CBD.
2. El CBD al ingresar al organismo sufre un doble metabolismo hepático para ser distribuido y absorbido.
3. En el hígado es hidrolizado a 7-OH-CBD por enzimas CYP3A y CYP2C.
4. Posteriormente se genera un metabolismo adicional CYP35 y CYP2C19.
5. Los metabolitos resultantes son excretados por las heces y la orina.

Tabla 4-Farmacocinética del cannabis en perros.

Metabolismo: hepático
Biodisponibilidad: 40-60 %
Vida media plasmática: 8-10 horas
Concentración plasmática: alcanzan picos elevados entre 30 minutos a 2 horas.
Vida media de eliminación: 72 horas
Excreción: 95% de los residuos del metabolismo de cannabinoides se elimina en heces y el 5% en orina.

2.6.4.2.2 Distribución

Aunque es dependiente de las características físico-químicas de los extractos, en la sangre el 90% está transportado por el plasma y el 10% ligado a proteínas de superficie de los glóbulos rojos. El CBD por su característica lipofílica se une a lipoproteínas que lo transportan y distribuyen en tejidos vasculares (Bonini, S., et al., 2018).

En los perros apenas el 1% de THC tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Benavides Melo, C.J., et al., 2022), esto brinda un amplio margen de seguridad para la aplicación de terapéuticos de full espectro, pero con bajas concentraciones de THC, sin embargo; el doble metabolismo hepático de los fitocannabinoides en esta especie, se debe considerar para evitar intoxicación potencialmente letal (Chicoine, A., et al., 2020). Investigaciones sobre el riesgo de ingesta de fitocannabinoides del cannabis en perros, determino que esta sustancia no llega a ser letal (Góngora-Gómez et al., 2020), no obstante, la mayoría de intoxicaciones corresponden a casos donde se están suministrando otros medicamentos en terapia multimodal (McCOY, K.L., 2016). En otros casos la intoxicación se ha presentado cuando el animal ingiere chocolate y fitocannabinoides, la teobromina del chocolate no es metabolizada por los perros lo que puede sumar una carga extra al doble metabolismo hepático de los cannabinoides (Burstein, 2015).

2.7 Sistema Endocannabinoide y Sistema Inmunológico (SEC/SI)

El sistema inmunológico (SI) interactúa con el SEC formando barreras de defensa que mantienen la homeostasis en los organismos vertebrados (Katayama, K., et al., 1997). El SI modula la expresión de enzimas, ligandos endógenos, receptores tipo 1 y 2 del SEC; donde se remarca la abundancia de receptores CB2 expresados en células del (Henshaw et al., 2021).

La inmunidad innata en perros, al igual que en otros organismos, es la primera línea de defensa del sistema inmunológico contra patógenos invasores (Kogan, L., et al., 2019). Esta forma de inmunidad es rápida y no específica, lo que significa que actúa de manera general contra una amplia variedad de agentes infecciosos sin la necesidad de reconocer específicamente a cada uno de ellos (Anil, S., et al., 2021).

La inflamación es una respuesta fisiológica que se desencadena frente a patógenos y lesiones tisulares, con la finalidad de eliminar y restablecer la funcionalidad sistémica de los tejidos lesionados para devolverle al organismo la homeostasis (Gamble, L.J., et al., 2018). Sin embargo, restablecimiento de dicha homeostasis se ve involucrado cuando las células del sistema inmunológico y los componentes del SEC no son competitivas; frente a su función de mantener el equilibrio (Góngora-Gómez, O., et al., 2020)

La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima que desempeña un papel clave en los procesos inflamatorios; esta enzima es responsable de la generación de prostaglandinas (PG) a partir de ácido araquidónico dando como resultado (PG-glicerol). Una propiedad menos conocida de COX-2 es su capacidad para metabolizar los endocannabinoides, *doñoiletanolamina* (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Hassan et al., 2014; McCoy., 2016).

El metabolismo endocannabinoide por la COX-2 no es simplemente un medio para poner fin a sus acciones. Por el contrario, genera análogos de PG, concretamente PG-glicerol, ésteres (PG-G) para 2-AG y PG-etanolamida (PG-EA) para AEA (Anil, et al., 2021)

McCoy et al, (2016) mencionan que, la formación de estos metabolitos de los endocannabinoides derivados de la COX-2 se conocen desde hace algún tiempo, su desencadenamiento biológico en la interacción de las células inmunitarias y el metabolismo, síntesis y degradación de los componentes del SEC no se han descrito por completo.

Los estudios se han centrado en el papel de estos PG-G o PG-EA. en vivo. Enfocándose en la expresión de lípidos bioactivos pertenecientes a estos dos sistemas (SI-SEC) y su papel en la inflamación (Hassan et al., 2014).

Las interacciones entre el SI y el SEC son fenómenos parcialmente conocidos, y las particularidades de esa interacción en las distintas especies, razas y estadios fisiológicos aún no están claramente definidas. La investigación en esta área está en crecimiento, en el futuro se tendrá mayor claridad permitiendo el uso terapéutico seguro y eficaz de los fitocannabinoides sobre la acción de diversas células inmunitarias.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales.

3.1.1 Físicos

- Registros de consentimiento para los tutores (hoja informativa de pacientes en estudio).
- Hoja de registro de pacientes (intervalo de periodo de toma de muestras).
- Máquina para rasurar.
- Cuchilla N°40.
- Guantes de nitrilo.
Mandil.
- Algodón.
- Torniquete.
- Jeringas desechables de 5 ml 21G, 22G, 23G x 1.5 pulgadas.
- Tubos al vacío sin aditivo (tapa roja).
- Tubos al vacío con heparina de litio (tapa verde).
- Caja de transporte de muestras biológicas (Cooler isotérmico) (25 x 21 x 40 cm).
- Gradilla de laboratorio.
- Geles refrigerantes.
- Termómetro.
- Frascos de vidrio ámbar con gotero dosificador.
- Portaobjetos.
- Puntas para pipeta azul 50- 1000 ul.
- Puntas para micropipeta amarilla 20-200 ul.
- Etiquetas de rotulación.
- Marcador de laboratorio para rotular muestras.
- Lápiz graso para rotular placas (polietileno).
- Recipientes para desecho de material punzocortante.
- Computador (base de datos).

3.1.2 Químicos

- Solución estéril de buffer fosfato de sodio (PBS) 2 litros.
- Medio de cultivo RPMI 1640.

- Suspensión de ácido acético glacial al 2%.
- Tinción de Wright.
- Aceite de inmersión.
- Alcohol antiséptico.

3.1.3 Biológicos.

- Muestras de sangre de perro con anticoagulante (heparina de litio) y muestras sin aditivo (5 ml).
- Extracto esencial de cannabidiol CBD en aceite de cáñamo (aislado).
- Suspensión bacteriana índice Mcfarland 4 (*Staphylococcus aureus*).

3.1.4 Equipos.

- Baño de maría.
- Micropipeta.
- Refrigerador.
- Estufa de cultivo bacteriológico.
- Mechero de bunsen.
- Centrífuga.
- Placa térmica.
- Placas porta objetos.
- Microscopio óptico.
- Contador de células.

3.2 Métodos.

3.2.1 Animales.

Se trabajó con 20 perros clínicamente sanos, con una muestra representada homogéneamente por 10 canes machos (5 adultos >1año y 5 gerontes >7años) y 10 canes hembras (5 adultas >1año y 5 gerontes >7). Los factores de inclusión de los individuos para este estudio fueron: estar castrados, contar con carnet de vacunación y desparasitación completo, no haber estado cursando ningún tipo de tratamiento con un tiempo mínimo de un mes antes de la aplicación de terapéutica de este estudio, no ingerir ningún tipo de medicación, que vivan en condiciones medioambientales similares, y como referencia la escala de condición corporal de González María S., (2011) tener una condición corporal entre 2,5 a 3 /5 y un rango de peso entre 5kg y 20kg.

Se conversó previamente con los tutores de los animales en estudio, donde a través de un consentimiento informativo (ANEXO B) se les detalló el protocolo de estudio, el tipo de medicación, las dosis por paciente y los días que corresponden a la toma de muestras. Se hizo una clara descripción, manteniendo énfasis de los posibles efectos secundarios del tratamiento con CBD y los riesgos de sobredosificación. Los tutores firmaron dicho consentimiento acordando la responsabilidad de las dos partes involucradas; comprometiéndose a suministrar el terapéutico durante los días que duró el ensayo y manteniéndoles a los perros sin cambios en su entorno, dieta y actividad.

3.2.2 Terapia.

3.2.2.1 Tratamiento con CBD.

Se aplicó un tratamiento que consistió en la administración de 5mg/kg día de extracto aislado de Cannabidiol (CBD) vía oral por 21 días consecutivos. La vida media plasmática del CBD es de 8-10 horas, en nuestro plan terapéutico el CBD fue repartido en tomas de 2.5 mg/kg cada 12 horas para mantener concentraciones plasmáticas constantes, según lo recomendado en la literatura (Deabold et al., 2019). Se consideró para esta dosificación un rango de 2 a 8 mg/kg día descrito para la especie canina como modulador sistémico (Bartner et al., 2018).

3.2.2.2 Fases de estudio

El estudio se dividió en 3 fases: Día 0 inició el estudio con la toma de muestras de sangre (medición de primer índice de fagocitosis (IF)) e iniciación de la terapia. Día 10 segunda toma de muestra de sangre (Medición del segundo IF), Día 21 tercera toma de muestras de sangre (Medición del tercer IF) último día de la terapia.

3.2.2.3 Dosificación

Las dosis de cada individuo en estudio, según su peso estuvieron previamente calculadas, rotuladas en los goteros de dosificación, especificadas en el consentimiento informado firmado por cada tutor. Los perros recibieron el extracto cada doce horas según la dosis que correspondía a cada sujeto.

3.2.2.4 Control terapéutico

Se tuvo un control diario y estricto sobre los perros, en relación con la administración de la dosis terapéutica, intervalo de aplicación, cantidad de alimento y agua que ingerían; mantenimiento de las condiciones medioambientales de cada individuo para que no afecte los resultados del estudio.

Durante todo el ensayo los individuos en estudio fueron monitoreados diariamente para observar algún posible cambio negativo en relación a la presentación de reacciones adversas específicas de esta especie y en general de la aplicación de fitoterapéuticos del cannabis mencionadas en la literatura, y en relación al producto que se aplicó en esta investigación (Wakshlag et al.,2020).

El producto usado en este trabajo fue “UBINEY PET PURE ORGANIC HEMP OIL®” (Liland cress, 102304, Arkansas, USA). Producto importado por “Billion Pets”. U.S.A. diseñado exclusivamente para perros y gatos, de amplio espectro, producto que cumple con los estándares fisicoquímicos para la absorción, metabolismo y biodisponibilidad en perros y gatos. El producto cuenta con la aprobación de la Administración de Alimentos y Drogas de los estados unidos FDA. Todos los frascos del producto usado en este trabajo correspondieron al mismo lote de fabricación, número lote (CBDX0028TS1XF2023).

El prospecto de este producto indica que los posibles efectos secundarios incluyen; aumento de peso progresivo, polifagia, polidipsia e hipersomnias; y que la sobre dosificación puede provocar pérdida de la conciencia, hipertensión, como signos de intoxicación. Esto fue indicado a los propietarios. Y los perros fueron monitoreados durante el ensayo y hasta 15 días de finalizar la administración. Los tutores no reportaron ninguna manifestación de signo o síntoma, ni durante ni después del desarrollo del estudio; dentro de los chequeos clínicos diarios en cada paciente no se observó ningún cambio significativo en relación a sus constantes fisiológicas, estado de ánimo y comportamiento.

3.2.3 Muestras.

Las muestras de sangre periférica se tomaron de la vena cefálica o safena en 2 tubos con y sin anticoagulante (tubo tapón verde/heparina de litio y tubo tapón rojo/ sin aditivo). El volumen sanguíneo recolectado por tubo para el ensayo fue de 5ml. Las muestras se tomaron en el domicilio de cada paciente para reducir cualquier factor de estrés que pueda alterar el estudio; Los perros incluidos en el estudio estaban acostumbrados a un régimen de control médico regular, lo que facilitó su manipulación al momento de tomar las muestras.

Las muestras identificadas fueron transportadas en refrigeración al Laboratorio de Inmunología Veterinaria de la Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias para ser procesadas.

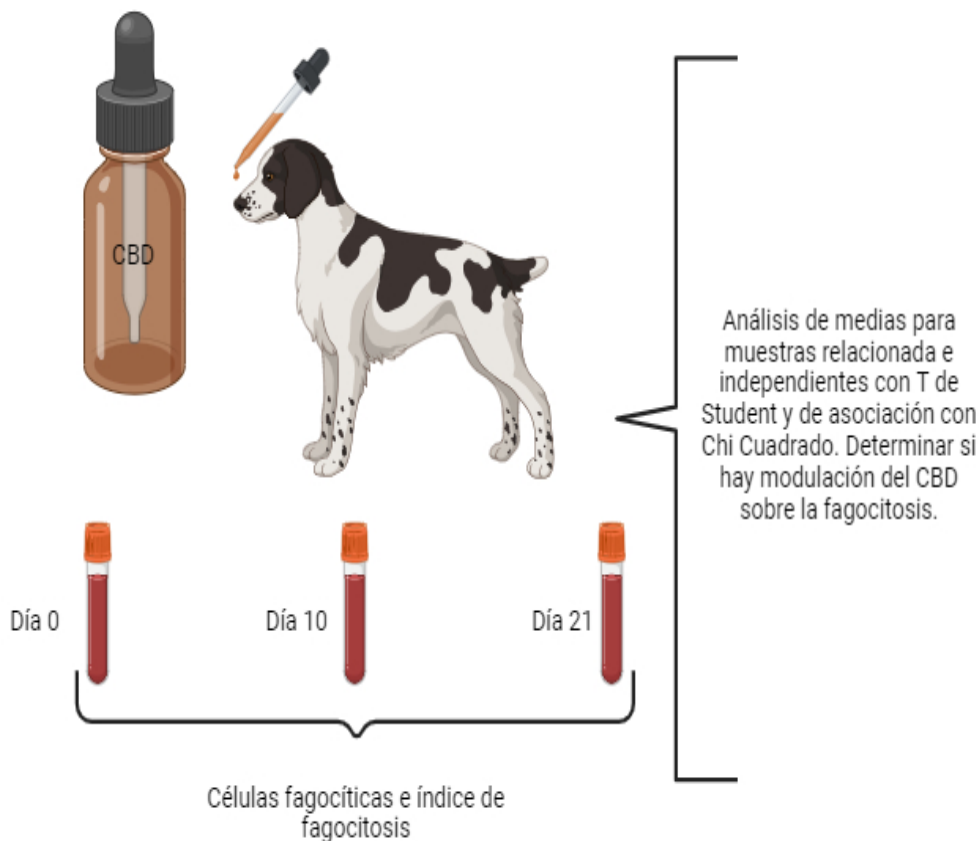


Figura 1 Resumen grafico del ensayo

3.2.4 Índice de fagocitosis (IF)

El índice de fagocitosis determina la capacidad fagocítica, se calcula teniendo en cuenta la cantidad de patógenos que fagocitaron los polimorfonucleares (PMN). La prueba de función fagocítica (FF) requiere conteos de la ingestión de las partículas o microorganismos aun tiempo determinado.

3.2.4.1 Ensayo para establecer células fagocíticas e índice de fagocitosis.

Se siguió la siguiente metodología citada por distintos autores (Arce-Mendoza et al., 2007, Shanmugan et al., 2015).

Se detalla a continuación la secuencia de pasos brevemente:

- 1) Toma de muestras de sangre, 2 muestras de sangre con y sin heparina (2 ml).
- 2) Sedimentación de las muestras de sangre en baño de hielo por 2 horas.
- 3) Separación de plasma y suero.

- 4) Lavar el plasma 3 veces con buffer fosfato de sodio (PBS), después de cada lavado se resuspenden las células sanguíneas adicionando 2 ml de PBS homogeneizando nuevamente, y centrifugar a 1200 rpm por 8 minutos.
- 5) Después del último lavado resuspender en 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA).
- 6) Contar el número de células leucocitarias por ml, haciendo una dilución 1 en 10 con ácido acético al 2% (ajustar las células a 2×10^6).
- 7) El suero se separa en dos porciones de 1 ml (Suero A y B).
- 8) El suero A se coloca en baño de agua a 56°C por 30 min (para inactivar el complemento).
- 9) El suero B se coloca en baño de hielo a 4 ° C.
- 10) Preparar suspensión de bacterias (una asada de bacterias en 2 ml de PBS), equivalente a un índice de Mcfarland 4.
- 11) Mezclas:

Tabla 5 - Mezclas

Mezcla 1		Mezcla 2	
Suero activado	0,5 ml	Suero inactivado	0,5 ml
Células	0,5 ml	Células	0,5 ml
Suspensión bacteriana	0,5 ml	Suspensión bacteriana	0,5 ml

- 12) Incubar a 37°C por 30 minutos.
- 13) Centrifugar los tubos a 1300 rpm por 5 min (para realizar un frotis de los concentrados)
- 14) Hacer tinción de Wright (Wright 5 minutos, luego lavar con PBS por 5 min) lavar con agua corriente y dejar secar al ambiente.
- 15) Lectura en microscopio; el conteo es numérico y se mide en porcentaje (%).
- 16) Se contaron 100 células por cada frotis (células cultivadas con suero A y B), luego se determinó el número de células fagocíticas en suero A y B para calcular el índice de fagocitosis.

1.2.5 Cálculo del índice de fagocitosis

Índice de fagocitosis se calculó según la formula a continuación, donde IF= índice de fagocitosis, SA= suero activado, y SI = suero inactivado.

$$IF = \frac{\text{Células fagocíticas SA}}{\text{Células fagocíticas SI}}$$

3.2.6 Análisis estadístico

Para establecer diferencias significativas en las células fagocíticas tanto en suero activado e inactivado de todos los perros del estudio y por separado de hembras, machos, adultos y gerontes se usó la prueba para comparación de medias de T de Student para muestras relacionadas, luego de establecer la normalidad de los datos mediante la aplicación del estadístico de Kruskal Wallis. De la misma manera se usó el estadístico de comparación de medias de T de Student para muestras independientes cuando se comparó las células fagocíticas en hembras vs machos y adultos vs gerontes.

Para analizar el IF se estableció el mismo análisis usando el estadístico de comparación de medias de T de Student para muestras relacionadas e independientes y la determinación de la normalidad de los datos a través del estadístico de Kruskal Wallis.

Para establecer asociación de las variables independientes sexo y edad de los perros con la modificación del IF categorizado como una variable dicotómica (aumenta o disminuye) se aplicó el estadístico de Chi cuadrado.

4. Resultados

En este trabajo se obtuvieron los siguientes resultados:

4.1 Células fagocíticas

Considerando todos los perros evaluados sin distinción entre sexo y grupo etario no hubo diferencia entre el número de células fagocíticas con suero activado entre el día cero y el día 10 ($p > 0.05$). Pero si hubo diferencia altamente significativa entre el día 0 y día 21 y entre el día 10 y 21 ($p < 0.05$). Considerando las células con suero inactivado hubo diferencias significativas entre el día 0 y el día 10 ($p < 0.05$). Entre el día 0 y 21 y entre el día 10 y 21 hubo una diferencia altamente significativa ($p < 0.05$).

Considerando los grupos etarios, en los perros adultos no hubo diferencia en el número de células fagocíticas entre el día 0 y el día 10; sin embargo, la diferencia fue altamente significativa entre día 0 y 21 y 10 y 21 ($p < 0.05$). En los perros gerontes no hubo diferencia significativa entre el día 0 y 10 ($p > 0.05$). De igual forma que en los adultos si hubo diferencia significativa entre el día 0 y 21 y 10 y 21 ($p < 0.05$).

Cuando se analizó las células fagocíticas de suero activado en los perros adultos vs los gerontes en los días 0 y 10; 0 y 21 y 10 y 21 no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). De la misma forma cuando se analizó células fagocíticas en suero activado en hembras vs machos no se observó diferencias significativas durante el estudio ($p > 0.05$) (ver tabla 1).

Cuando se analizó células fagocíticas en suero inactivado entre perros adultos y gerontes solo se observó diferencias significativas entre los días 0 y 10 ($p < 0.05$). En las hembras vs los machos no se observó diferencias significativas durante todo el estudio ($p > 0.05$) (ver Tabla 6).

Tabla 6 – Células Fagocitadas

Análisis	Categoría	Días 0 vs día 10 /p valor*	Días 0 vs día 21 /p valor*	Días 10 vs día 21 /p valor*
Células fagocíticas suero activado	Todos los	0.1245	0.0001	0.0001
Células fagocíticas suero inactivado	perros del estudio	0.0115	0.0001	0.0001
Células fagocíticas suero activado	Adultos vs gerontes	0.257	0.764	0.454
	Hembras vs machos	0.902	0.074	0.755
Células fagocíticas suero inactivado	Adultos vs gerontes	0.041	0.292	0.706
	Hembras vs Machos	0.178	0.068	0.637

*T de Student muestras relacionadas; **T de Student muestras independientes

4.1.1 Índice de Fagocitosis (IF).

Cuando se analizó el IF en todos los perros estudiados se observó diferencias significativas entre el día 0 y el día 10 ($p < 0.05$); sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre los días 0 y 21 y 10 y 21 ($p > 0.05$).

Cuando se realizó el análisis del IF considerando si se reduce o aumenta en relación a los días 10 y 20 usando Chi cuadrado y estimación de riesgo, no se encontró diferencias significativas al día 10 y 21 ($p > 0.05$) (ver tabla 7). Al analizar los sexos, las hembras presentaron diferencias significativas en el IF solamente entre los días 10 y 21 ($p < 0.05$). Los machos de manera contraria solo mostraron diferencias significativas entre los días 0 y 10 ($p < 0.05$). Y cuando se consideró el estrato etario, tanto en perros adultos y gerontes solo presentaron diferencias significativas al principio del ensayo entre los días 0 y 10 ($p < 0.05$) (ver tabla 7).

Al considerar el IF dicotomizado, si se reduce o aumenta, no se observaron diferencias significativas entre hembras y machos, y adultos y gerontes al día 10 y día 21 ($p < 0.05$) (ver tabla 7).

Tabla 7 - Índice de Fagocitosis

Análisis	Categoría	Días 0 vs día 10 /p valor *	Días 0 vs día 21 /p valor*	Días 10 vs día 21 /p valor *
Índice de fagocitosis	Todos los perros del estudio	0.0004	0.8681	0.0982
	Hembras	0.067	0.134	0.037
	Machos	0.043	0.918	0.296
	Adultos	0.007	0.275	0.770
	Gerontes	0.026	0.502	0.055
		Día 0 /p valor**	Día 10/ p valor**	Día 21/p valor **
Índice de fagocitosis	Hembras vs macho	0.189	0.378	0.603
	Adultos vs Gerontes	0.155	0.082	0.519

Tabla 8 - Índice de Fagocitosis Nominal

Análisis	Categoría		Día 10		Día 21
			p valor/ OR (IC)*		p valor/OR (IC)*
Índice de fagocitosis nominal	de Adultos vs gerontes		0.383 / (0.074-2.660)	0.444	0.170 /0.250 (0.034-1.819)
Índice de fagocitosis nominal	de Hembras vs machos		1.000/ (0.173-5.772)	1.000	0.648/ 1.556 (0.244-9.913)

* Chi cuadrado de Pearson

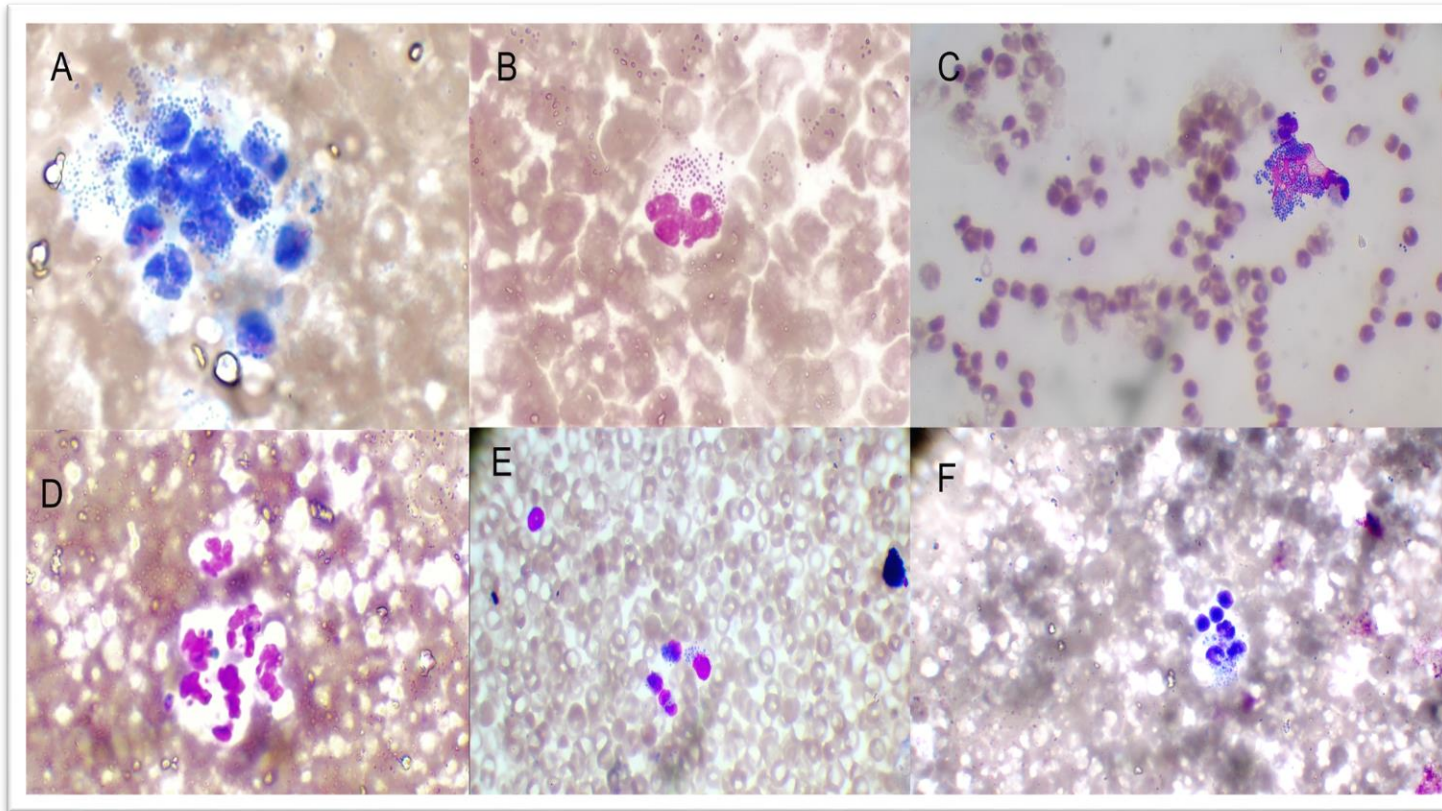


Figura 2 - Microfotografías del autor, citología de muestra de sangre de perros mostrando las células analizadas. Imagen A. Cúmulo de polimorfonucleares (PMN) con intensa actividad fagocítica (nótese la gran cantidad de estructuras bacterianas de color azul y forma redondeada). Imagen B. PMN altamente segmentados con actividad fagocítica. Imagen C. PMN con formación de NETs (trampas extracelulares). Imagen D. Cúmulo de PMN con nula actividad fagocítica. Imagen E. PMN con escasa actividad fagocítica; Imagen F. Escasos PMN con escasa actividad fagocítica junto con mononucleares.

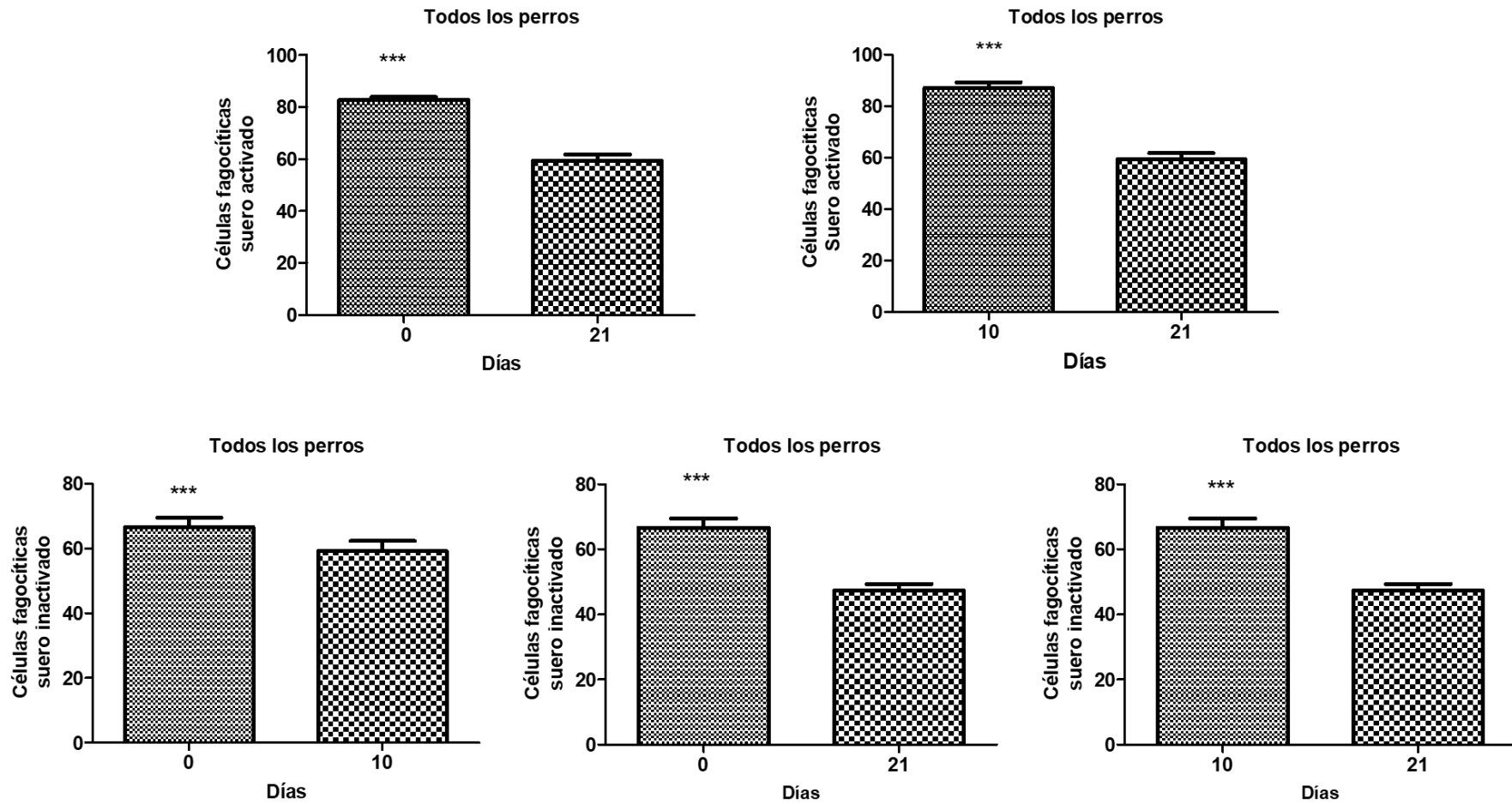


Figura 3 - Células fagocíticas en suero activado e inactivado (se presenta solo los datos que presentaron diferencias estadísticas) nótese la importante actividad inhibitoria del CBD especialmente en las células cultivadas en suero inactivado durante los tres momentos de medición.

5. Discusión

Consideramos que la aplicación de CBD modificó significativamente el número de células que fagocitan tanto en el suero activado como en el inactivado; sin embargo, el efecto fue mayor en el suero inactivado, esto podría explicarse en que la aplicación de CBD modula la actividad de los distintos mecanismos innatos que desatan la inflamación y que su vez son independientes de las moléculas del complemento, Anil y colaboradores (2021), reportaron diferentes mecanismos antiinflamatorios del extracto de *Cannabis sativa*, en pacientes con COVID-19 desarrollados en estudios de células epiteliales pulmonares donde se comprobó la inhibición o reducción de distintas citoquinas como IL-6 e IL-8, TNF- α , es destacable que en este estudio la modulación fue mayor para el extracto alto en CBD y bajo en THC, esto coincide con el tipo de extracto usado en este trabajo y explicaría la modulación independiente de las opsoninas. También se ha demostrado que el CBD reduce la expresión de quimioquinas como CCL2 y CCL7 por lo que la migración y cinética de los leucocitos puede verse disminuida y quizás su concentración en ciertos tejidos, por lo que es posible que tenga influencia sobre el desplazamiento activo en la fagocitosis (Anil et al., 2021). Otros trabajos han encontrado un efecto reductor del CBD sobre la activación de los macrófagos considerando la producción del óxido nítrico (NO), lo que un modelo de colitis en ratones se manifestó con una notable reducción de la inflamación local, en este mismo trabajo se notó un cambio del fenotipo de los macrófagos en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), siendo mayor la modulación al CMH II implicando que su papel sería mayor como célula presentadora de antígeno que como célula fagocítica (Yekhtin et al., 2022). De igual forma hubo una reducción significativa de células fagocíticas en el suero activado, esto implicaría una reducción en la expresión de receptores para opsoninas en las células fagocitas, la modulación de la activación del complemento o la liberación de inmunoglobulinas circulantes. En distintos trabajos se ha demostrado el efecto depresor del CBD en la producción de una gran variedad de citoquinas, quimioquinas y de la expresión génica de estas moléculas, sin embargo, llama la atención que el CBD aumenta considerablemente citoquinas como la IL-10 y el regulador de interferón tipo 3 (IRF3) generando un ambiente antiinflamatorio, pero a su vez muy activo frente a la replicación viral. Otro aspecto muy importante que regulan los fitocannabinoides es la expresión de receptores tipo Toll (TLRs), el CBD reduce significativamente algunos tipos, esto explica una reducción de la fagocitosis por una menor acción de células centinelas (McCoy, 2016). Por otro lado, también se ha mencionado en la literatura que el CBD puede reducir la diferenciación de linfocitos B, esto podría explicar la reducción de células fagocíticas en el suero activado e inactivado considerando la posible reducción en la producción de inmunoglobulinas (Corsato

et al., 2023). La variación en las células fagocíticas de nuestro trabajo también se puede explicar en el efecto mismo de los fitocannabinoides, al considerarse la variación individual, ya que en este trabajo no se conocía el estatus inmunitario de los perros en relación a su experiencia previa con el patógeno *S. aureus* (usado en la prueba de fagocitosis); sin embargo, las diferencias observadas hacen pensar que el sistema inmune de los perros estudiados respondió en general de manera similar. Por otro lado, en la literatura llama la atención que el CBD incrementa la fagocitosis de células microgliales en cultivo celular interactuando en la expresión de receptores transitorios Vaniloide (TRPV), cuya función principal es responder a los estímulos inflamatorios, estos hallazgos difieren con nuestros resultados, pero es posible que esas diferencias responden al diferente contexto de nuestro trabajo (Hassan et al., 2014; McCoy 2016).

No hubo diferencias en el número de células fagocíticas tanto en hembras vs machos y adultos vs gerontes en suero activado e inactivado. Por tanto, en nuestro estudio el efecto modulador del CBD sobre la fagocitosis no se ve influenciado por el sexo o la edad. Sin embargo, hubo diferencias entre el número de células fagocíticas (adultos vs gerontes) día 0 vs día 10. Quizá esto se pueda explicar en procesos propios de asimilación del compuesto y acostumbamiento de los pacientes, por lo que la dosis esperada pudo no ser alcanzada de la misma manera en todos los perros. Así también la variación fue en el suero inactivado, donde esta suprimida la actividad del complemento, por lo que las modificaciones por acostumbamiento y dosificación afectarían más al fenómeno de fagocitosis.

Considerando el índice de fagocitosis, todos los perros del estudio mostraron variación significativa al comparar el día 0 vs el día 10, no así en los siguientes días (10 y 21). Podríamos decir que la regulación de la fagocitosis se manifiesta de manera más clara al principio de la terapia y luego se mantiene estable durante el resto del estudio. Por tanto, que el efecto modulador del CBD redujo la actividad de células fagocíticas tanto en el suero activado como en el inactivado, por lo que el índice de fagocitosis no vario significativamente durante los siguientes días del ensayo.

Hubo diferencia significativa en el índice de fagocitosis (IF) de las hembras (día 10 vs 21), es posible que esto se deba a que en algunos individuos se pueden dar fenómenos de saturación o resistencia y quizás esto pudo variar el efecto modulador del CBD al final del estudio en el grupo de hembras. Siendo llamativo que también hubo diferencias en el IF en los machos, pero al principio del ensayo (día 0 y 10). Como ya se mencionó esto podría atribuirse a variaciones propias de adaptación y dosificación.

Al analizar el IF dicotomizado (aumenta o disminuye), no presento variaciones significativas durante el estudio esto se debe a que las variaciones fueron mínimas y tanto los aumentos o disminuciones del índice fueron en decimas de la unidad. Esto se entiende ya que el índice se calcula a partir de las células fagocíticas tanto en suero activado como en el inactivado, como el efecto del CBD tiende a reducir el número de células fagocíticas en el suero activado e inactivado, el índice presenta variaciones mínimas (ver tabla 3).

Conclusiones

- La administración de CBD reduce significativamente la actividad de las células fagocíticas en sangre periférica de perros.
- El índice de fagocitosis no sufre cambios significativos ya que la actividad del CBD reduce las células fagocíticas tanto en las cultivadas en suero activado e inactivado.
- Consideramos que el CBD modula la fagocitosis por vías independientes a la activación del complemento y /o a la reducción en la expresión de receptores para opsoninas.
- Esta modulación fue independiente del sexo y la edad de los perros estudiados. (obsérvese las tablas para conocer la significancia estadística).
- Al no evidenciar efectos adversos en los pacientes podemos concluir que el aceite esencial de *Cannabis sativa* alto en CBD fue bien tolerado por los perros tanto adultos y gerontes como hembras y machos durante el tiempo que se desarrolló el estudio.
- El efecto del CBD sobre la fagocitosis fue notable por lo que consideramos que en los perros del estudio reguló la inmunidad innata en el contexto de la inflamación.

Recomendaciones

La medicina cannábica está creciendo a medida que los nuevos descubrimientos dan luces sobre sus potenciales usos terapéuticos en las distintas áreas de la salud, en medicina veterinaria ha tenido un avance importante a partir de su desregulación para uso médico y el creciente auge de empresas que ofrecen productos formulados para su uso especialmente en perros y gatos.

Actualmente es considerada como una área de especialización tanto en Medicina humana como veterinaria; hoy en día contamos con respaldo científico sólido para fundamentar aplicaciones terapéuticas seguras y eficaces dentro de nuestra rama médica; es importante recalcar que el SEC al ser una red moduladora tisular la sensibilidad entre individuos y especies puede ser variable ya que el equilibrio de este sistema está regido a los diversos desafíos que rompen el equilibrio sistémico, los mismos que determinan el estado fisiológico de cada individuo; por lo cual es recomendable partir de una evaluación individual del paciente y ajustar la terapia en base a sus necesidades, ya que la respuesta orgánica por el estado innato de cada individuo es única.

Cuando se rompe el equilibrio sistémico, el sistema endocannabinoide se ve comprometido como la primera barrera de protección desencadenando acción directa de las células de defensa que constituyen el sistema inmune, por lo que enfoques investigativos específicos sobre la acción que ejercen estos dos sistemas frente al desencadenamiento de diversas enfermedades, patologías y trastornos, nos permitiría abordar de una manera más directa la aplicación de tratamientos de modulación sistémica; siendo las terapias con CBD hasta el momento seguras y naturales. Los resultados de nuestro trabajo son un posible inicio para continuar con la investigación en tratamientos alternativos para enfermedades puntuales y manejo de procesos crónicos, degenerativos, terapia del dolor, control de procesos inflamatorios, regulación del estrés y la ansiedad. Recomendamos continuar con la investigación en distintas especies de manera especial en la regulación terapéutica del sistema inmune.

Referencias

- Abrahamov, A., & Mechoulam, R. (1995). An efficient new cannabinoid antiemetic in pediatric oncology. *Life Sciences*, 56(23–24), 2097–2102. doi:10.1016/0024-3205(95)00194-b
- Alcívar Trejo, C., Albert Márquez, J. J., Murillo Mena, A., & Alvarado Porras, F. M. (2023). Analysis and evolution of environmental law in Ecuador with the constitution of 2008 and its relation to political marketing in the good way of living. *HUMAN REVIEW. International Humanities Review / Revista Internacional de Humanidades*, 21(1), 105–112. doi:10.37467/revhuman. v21.5037
- Ángeles López, G. E., Brindis, F., Cristians Niizawa, S., & Ventura Martínez, R. (2014). *Cannabis sativa L., una planta singular*. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(4). Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57940028004>
- Anil, S. M., Shalev, N., Vinayaka, A. C., Nadarajan, S., Namdar, D., Belausov, E., Shoval, I., Mani, K. A., Mechrez, G., & Koltai, H. (2021). Cannabis compounds exhibit anti-inflammatory activity in vitro in COVID-19-related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages. *Scientific reports*, 11(1), 1462. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81049-2>
- Araque, A., Castillo, P. E., Manzoni, O. J., & Tonini, R. (2017). Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*, 124, 13–24. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.06.017
- Asociación Veterinaria Estadounidense. Cannabis en medicina veterinaria agosto de 2020. Consultado el 9 de enero de 2023. <https://www.avma.org/sites/default/files/2021-03/APH-CannabisResources-Report-20201207.pdf>.
- Astaiza-Martínez, J. M., Chaves-Velasquez, C. A., Gonzales-Paya, G., Vallejo-Timarán, D. A., & Benavides-Melo, C. J. (2014). Cannabinoides como tratamiento en neoplasias mamarias en caninos. *Revista Investigación Pecuaria*, 3(1). <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/revip/article/view/1705>
- Baratta, F., Pignata, I., Ravetto Enri, L., & Brusa, P. (2022). Cannabis for medical use: Analysis of recent clinical trials in view of current legislation. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 888903. doi:10.3389/fphar.2022.888903.

- Bartner, L. R., McGrath, S., Rao, S., Hyatt, L. K., & Wittenburg, L. A. (2018). Pharmacokinetics of cannabidiol administered by 3 delivery methods at 2 different dosages to healthy dogs. *Revue Canadienne de Recherche Veterinaire [Canadian Journal of Veterinary Research]*, 82(3), 178–183.
- Benavides Melo, C. J., García-Cabrera, M. C., Guerron-Morales, O. T., & Astaiza-Martínez, J. M. (2022). Sistema endocannabinoide y cannabidiol en el manejo del dolor en perros: revisión narrativa. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 50(3). doi:10.15446/rcciquifa.v50n3.92935.
- Berghuis, P., Dobszay, M. B., Wang, X., Spano, S., Ledda, F., Sousa, K. M., Harkany, T. (2005). Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19115–19120. doi:10.1073/pnas.0509494102.
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 300–315. doi: 10.1016/j.jep.2018.09.004
- Bornheim LM, Correia MA (1998). Efecto del cannabidiol sobre el citocromo P-450. *Farmacología Bioquímica.*; 38(17): 2789-2794.doi:10.1016/0006-2952(89)90432-2
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(7), 1377–1385. doi: 10.1016/j.bmc.2015.01.059
- Blankman, J. L., Simon, G. M., & Cravatt, B. F. (2007). A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chemistry & Biology*, 14(12), 1347–1356. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.006
- Bradley S, Young S, Bakke AM. (2022). Los perros sanos toleran bien la alimentación diaria a largo plazo con cannabidiol. *Ciencia veterinaria frontal.*; 9:977457. doi:10.3389/fvets.2022.977457
- Campora, L., Miragliotta, V., Ricci, E., Cristino, L., Di Marzo, V., Albanese, F., ... Abramo, F. (2021). Cannabinoid receptor type 1 and 2 expression in the skin of healthy dogs and

- dogs with atopic dermatitis. *American journal of veterinary research*, 73(7), 988–995.
doi:10.2460/ajvr.73.7.988
- Canadian Association of Veterinary Cannabinoid Medicine. (2019). January Veterinary Medical Ethics - Cannabinoids to treat dogs and cats. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne*, 60(4), 345.
- Cannabis Medicinal En Veterinaria. - Modulación Del Sistema Endocannabinoide. (2022). De https://www.youtube.com/watch?v=9aNvZdJhO58&t=4054s&ab_channel=Squenda
- Carlini, E. A., Karniol, I. G., Renault, P. F., & Schuster, C. R. (1974). Effects of marijuana in laboratory animals and in man. *British Journal of Pharmacology*, 50(2), 299–309.
doi:10.1111/j.1476-5381.1974.tb08576.x
- CBD: What you need to know about its uses and efficacy. (2022, diciembre 1). Recuperado el 14 de octubre de 2023, de Cornell University College of Veterinary Medicine website: <https://www.vet.cornell.edu/departments-centers-and-institutes/riney-canine-health-center/canine-health-information/cbd-what-you-need-know-about-its-uses-and-efficacy>
- Cinar, R., Iyer, M. R., & Kunos, G. (2020). The therapeutic potential of second and third generation CB1R antagonists. *Pharmacology & Therapeutics*, 208(107477), 107477.
doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107477
- Chicoine A, Illing K, Vuong S, Pinto K.R, Alcorn J, Cosford K.(2020). _ "Evaluación farmacocinética y de seguridad de varias dosis orales de un nuevo extracto de hierba de cannabis THC: CBD 1:20 en perros". *Ciencia veterinaria frontal.*; 7:583404. doi:10.3389/fvets.2020.583404
- Clarke, T. L., Johnson, R. L., Simone, J. J., & Carlone, R. L. (2021). The endocannabinoid system and invertebrate neurodevelopment and regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 2103. doi:10.3390/ijms22042103
- Corsato Alvarenga, I., Panickar, K. S., Hess, H., & McGrath, S. (2023). Scientific validation of cannabidiol for management of dog and cat diseases. *Annual Review of Animal Biosciences*, 11(1), 227–246. doi:10.1146/annurev-animal-081122-070236
- Deabold, K., Schwark, W., lobo, I., & Wakshlag, J. (2019). Farmacocinética de dosis única y evaluación de seguridad preliminar con el uso de nutracéuticos de cáñamo rico en CBD en perros y gatos sanos. *ANIMALS* 9, 10:832 .

- De Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(6), e00682. doi:10.1002/prp2.682
- Du Preez, K., Rautenbach, Y., Hooijberg, E. H., & Goddard, A. (2021). Oxidative burst and phagocytic activity of phagocytes in canine parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 33(5), 884–893. doi:10.1177/10406387211025513
- Fernández-Trapero, M., Espejo-Porras, F., Rodríguez-Cueto, C., Coates, J. R., Pérez-Díaz, C., de Lago, E., & Fernández-Ruiz, J. (2017). Up-regulation of CB2 receptors in reactive astrocytes in canine degenerative myelopathy, a disease model of amyotrophic lateral sclerosis. *Disease Models & Mechanisms*. doi:10.1242/dmm.028373
- Freundt-Revilla, J., Kegler, K., Baumgärtner, W., & Tipold, A. (2017). Spatial distribution of cannabinoid receptor type 1 (CB1) in normal canine central and peripheral nervous system. *PloS One*, 12(7), e0181064. doi: 10.1371/journal.pone.0181064
- Gabriele, V., Bisanzio, D., Riva, A., Meineri, G., Adami, R., & Martello, E. (2023). Long-term effects of a diet supplement containing Cannabis sativa oil and Boswellia serrata in dogs with osteoarthritis following physiotherapy treatments: a randomised, placebo-controlled and double-blind clinical trial. *Natural Product Research*, 37(11), 1782–1786. doi:10.1080/14786419.2022.2119967
- Gamble, L.-J., Boesch, J. M., Frye, C. W., Schwark, W. S., Mann, S., Wolfe, L., ... Wakshlag, J. J. (2018). Pharmacokinetics, safety, and clinical efficacy of cannabidiol treatment in osteoarthritic dogs. *Frontiers in veterinary science*, 5. doi:10.3389/fvets.2018.00165
- Gilchrist, E. J., Wang, S., & Quilichini, T. D. (2023). The impact of biotechnology and genomics on an ancient crop: Cannabis sativa. En C. López-Correa & A. Suarez-González (Eds.), *Genomics and the Global Bioeconomy* (pp. 177–204). San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier.
- Gill, A. R., Loveys, B. R., Cowley, J. M., Hall, T., Cavagnaro, T. R., & Burton, R. A. (2022). Physiological and morphological responses of industrial hemp (Cannabis sativa L.) to water deficit. *Industrial Crops and Products*, 187(115331), 115331. doi: 10.1016/j.indcrop.2022.115331

- Giuffrida, A., Beltramo, M., & Piomelli, D. (2001). Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(1), 7–14.
- Góngora-Gómez O, Gómez-Vázquez YE, Riverón-Carralero WJ, Bauta- Milord R. (2020). Efectos terapéuticos de los cannabinoides. *Rev EsTuSalud* 2
- Gross, C., Ramirez, D. A., McGrath, S., & Gustafson, D. L. (2021). Cannabidiol induces apoptosis and perturbs mitochondrial function in human and canine glioma cells. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 725136. doi:10.3389/fphar.2021.725136
- Hartsel JA, Boyar K, Pham A, Silver RJ, Makriyannis A. (2019). _Cannabis en medicina veterinaria: terapias con cannabinoides para animales. En: *Nutraceuticos en Medicina Veterinaria*. Editorial Internacional Springer.; 121-155.doi:10.1007/978-3-030-04624-80
- Hanus, L., Avraham, Y., Ben-Shushan, D., Zolotarev, O., Berry, E. M., & Mechoulam, R. (2003). Short-term fasting and prolonged semistarvation have opposite effects on 2-AG levels in mouse brain. *Brain Research*, 983(1–2), 144-151. doi:10.1016/s0006-8993(03)03046-4
- Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/terpenoids in cannabis: Are they important? *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 25–60. doi:10.1159/000509733
- Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33(12), 1357–1392. doi:10.1039/c6np00074f
- Hassan, S., Eldeeb, K., Millns, P. J., Bennett, A. J., Alexander, S. P., & Kendall, D. A. (2014). Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *British journal of pharmacology*, 171(9), 2426–2439. <https://doi.org/10.1111/bph.12615>
- Henshaw, Frances R., Dewsbury, L. S., Lim, C. K., & Steiner, G. Z. (2021). The effects of cannabinoids on pro- and anti-inflammatory cytokines: A systematic review of in vivo studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 6(3), 177–195. doi:10.1089/can.2020.0105
- Hurtado Henriquez, A. M., Salgado N., S., & Falcón P., N. (2020). Percepción y conocimientos de los médicos veterinarios de Lima Metropolitana sobre el uso de fitocannabinoides de

- uso medicinal en animales de compañía. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 31(4), e17368. doi:10.15381/rivep.v31i4.17368
- Iffland, K., & Grotenhermen, F. (2017). An update on safety and side effects of cannabidiol: A review of clinical data and relevant animal studies. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 139–154. doi:10.1089/can.2016.0034
- Isabella Corsato Alvarenga, Kiran S. Panickar, Hannah Hess, Stephanie McGrath, Scientific (2023). Validation of Cannabidiol for Management of Dog and Cat Diseases *Annual Review of Animal Biosciences* 11:1, 227-246
- Islas-Andrade, S., Rocha-Arrieta, L. L., Arrieta, O., Celis, M. A., Domínguez-Cherit, J., Lifshitz, A., ... Verástegui, E. (2023). Cannabinoides y su uso terapéutico. *Gaceta medica de México*, 159(1). doi:10.24875/gmm.22000184
- Iuvone T, Esposito G, De Filippis D, Scuderi C, Steardo L. (2009). Cannabidiol: ¿a promising drug for neurodegenerative disorders? *CNS Neurosci Ther* 15: 65- 75. doi: 10.1111/j.1755-5949.2008.-00065.x
- Jones, N. A., Glyn, S. E., Akiyama, S., Hill, T. D. M., Hill, A. J., Weston, S. E., ... Williams, C. M. (2012). Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures. *Seizure: The Journal of the British Epilepsy Association*, 21(5), 344–352. doi: 10.1016/j.seizure.2012.03.001
- Kale, V. P., Gibbs, S., Taylor, J. A., Zmarowski, A., Novak, J., Patton, K., ... Terse, P. S. (2019). Preclinical toxicity evaluation of JD5037, a peripherally restricted CB1 receptor inverse agonist, in rats and dogs for treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 109(104483), 104483. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104483
- Kano, M. (2014). Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 90(7), 235–250. doi:10.2183/pjab.90.235
- Katayama, K., Ueda, N., Kurahashi, Y., Suzuki, H., Yamamoto, S., & Kato, I. (1997). Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1347(2–3), 212–218. doi:10.1016/s0005-2760(97)00078-7

- Knopf, A. (2022). From the FDA: Cannabis edibles copycatting cereals, candy. *The Brown University Child and Adolescent Behavior Letter*, 38(7), 9–10. doi:10.1002/cbl.30643
- Kogan LR, H. P. (2016). Percepciones de los consumidores sobre los productos de cáñamo para animales. *Amer Hol Vet Med Assoc J.*, 42:41–48. Used with permission of the Journal of the American Holistic Veterinary Medical Association (JAHVMA). Article first appeared in Volume 42, Spring Issue.
- Kogan, L., Schoenfeld-Tacher, R., Hellyer, P., & Rishniw, M. (2019). US veterinarians' knowledge, experience, and perception regarding the use of cannabidiol for canine medical conditions. *Frontiers in veterinary science*, 5. doi:10.3389/fvets.2018.00338
- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S. A., Kirkham, T. C., Garcia, E. A., Mitchell, S. E., ... Korbonits, M. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25196–25201. doi:10.1074/jbc.C500175200
- Komleva, N. E., Marjanovsky, A. A., Danilov, A. N., & Agasarov, L. G. (2017). The novel approaches to the rehabilitation of the patients presenting with gastroesophageal reflux disease and co-morbid pathology. *Voprosy Kurortologii, Fizioterapii, i Lechebnoi Fizicheskoi Kultury*, 94(2), 20. doi:10.17116/kurort201794220-23
- Kopustinskiene, D. M., Masteikova, R., Lazauskas, R., & Bernatoniene, J. (2022). Cannabis sativa L. bioactive compounds and their protective role in oxidative stress and inflammation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(4), 660. doi:10.3390/antiox11040660
- Kra, G., Daddam, J. R., Moallem, U., Kamer, H., Ahmad, M., Nemirovski, A., ... Zachut, M. (2022). Effects of environmental heat load on endocannabinoid system components in adipose tissue of high yielding dairy cows. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 12(6), 795. doi:10.3390/ani12060795
- Krishnan S, Cairns R, Howard R. (2009). Cannabinoids for the treatment of dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2009(2). doi: 10.1002/14651858.CD0- 12820.pub2
- Krüger, M., van Eeden, T., & Beswa, D. (2022). Cannabis sativa cannabinoids as functional ingredients in snack foods—historical and developmental aspects. *Plants*, 11(23), 3330. doi:10.3390/plants11233330

- Luongo, L., Petrelli, R., Gatta, L., Giordano, C., Guida, F., Vita, P., ... Maione, S. (2012). 5'-Chloro-5'-deoxy-(±)-ENBA, a potent and selective adenosine A(1) receptor agonist, alleviates neuropathic pain in mice through functional glial and microglial changes without affecting motor or cardiovascular functions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(12), 13712–13726. doi:10.3390/molecules171213712
- McCoy K. L. (2016). Interaction between Cannabinoid System and Toll-Like Receptors Controls Inflammation. *Mediators of inflammation*, 2016, 5831315. <https://doi.org/10.1155/2016/5831315>
- MacNaughton, W. K., Van Sickle, M. D., Keenan, C. M., Cushing, K., Mackie, K., & Sharkey, K. A. (2004). Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(5), G863-71. doi:10.1152/ajpgi.00482.2003
- Márquez, L., Abanades, S., & Andreu, M. (2008). Sistema endocannabinoide e inflamación intestinal. *Medicina clinica*, 131(13), 513–517. doi:10.1157/13127285
- Mastinu, A., Premoli, M., Ferrari-Toninelli, G., Tambaro, S., Maccarinelli, G., Memo, M., & Bonini, S. A. (2018). Cannabinoids in health and disease: pharmacological potential in metabolic syndrome and neuroinflammation. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 36(2). doi:10.1515/hmbci-2018-0013
- Matias, I., McPartland, J. M., & Di Marzo, V. (2005). Occurrence and possible biological role of the endocannabinoid system in the sea squirt *Ciona intestinalis*. *Journal of Neurochemistry*, 93(5), 1141–1156. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03103.x
- Maxfield, A. (2019). Intellectual property survey: Cannabis plant types, methods of extraction, IP protection, and one patent that could ruin it all. *SSRN Electronic Journal*. doi:10.2139/ssrn.3376060
- McPartland, J. M., Matias, I., Di Marzo, V., & Glass, M. (2006). Evolutionary origins of the endocannabinoid system. *Gene*, 370, 64–74. doi: 10.1016/j.gene.2005.11.004
- Mechoulam, R., & Gaoni, Y. (1995). Hashish—IV. *Tetrahedron*, 21(5), 1223–1229. doi:10.1016/0040-4020(65)80064-3

- Mechoulam, Raphael, Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N. E., Schatz, A. R., ... Vogel, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology*, 50(1), 83–90. doi:10.1016/0006-2952(95)00109-d
- Miranda-Olivos, R., Baenas, I., Steward, T., Granero, R., Pastor, A., Sánchez, I., ... Fernández-Aranda, F. (2023). Exploring the influence of circulating endocannabinoids and nucleus accumbens functional connectivity on anorexia nervosa severity. *Molecular Psychiatry*. doi:10.1038/s41380-023-02253-2
- McGrath S, Bartner LR, Rao S, Packer RA, Gustafson DL (2019) . Ensayo clínico controlado, aleatorio y ciego para evaluar el efecto de la administración oral de cannabidiol además del tratamiento antiepiléptico convencional sobre la frecuencia de las convulsiones en perros con epilepsia idiopática intratable. *J Am Vet Med Assoc.*; 254(11):1301-1308. _ doi:10.2460/javma.254.11.1301
- Nicholas, P., & Churchill, A. (2012). The Federal Bureau of narcotics, the states, and the origins of modern drug enforcement in the United States, 1950–1962. *Contemporary Drug Problems*, 39(4), 595–640. doi:10.1177/009145091203900402
- Noriega-Prieto, J. A., Kofuji, P., & Araque, A. (2023). Endocannabinoid signaling in synaptic function. *Glia*, 71(1), 36–43. doi:10.1002/glia.24256
- Olejar, K. J., & Kinney, C. A. (2021). Evaluation of thermo-chemical conversion temperatures of cannabinoid acids in hemp (*Cannabis sativa* L.) biomass by pressurized liquid extraction. *Journal of Cannabis Research*, 3(1), 40. doi:10.1186/s42238-021-00098-6
- Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., ... Kunos, G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1298–1305. doi:10.1172/jci200523057
- Pérez Ricart, C. A. (2019). El papel del Federal Bureau of Narcotics en el diseño de la política de drogas en México (1940-1968). *Frontera norte*, 31, 1–23. doi:10.33679/rfn.v1i1.2045
- Ren, G., Zhang, X., Li, Y., Ridout, K., Serrano-Serrano, M. L., Yang, Y., ... Fumagalli, L. (2021). Large-scale whole-genome resequencing unravels the domestication history of *Cannabis sativa*. *Science Advances*, 7(29). doi:10.1126/sciadv. abg2286

- Russo, E. (2005). Cannabis in India: ancient lore and modern medicine. En *Cannabinoids as Therapeutics* (pp. 1–22). Basel: Birkhäuser-Verlag.
- Ryan, D., Drysdale, A. J., Lafourcade, C., Pertwee, R. G., & Platt, B. (2009). Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 2053–2063. doi:10.1523/JNEUROSCI.4212-08.2009
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., ... Greasley, P. J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology*, 152(7), 1092–1101. doi: 10.1038/sj.bjp.0707460
- Samara, E., Bialer, M., & Mechoulam, R. (1988). Pharmacokinetics of cannabidiol in dogs. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 16(3), 469–472.
- Schofs, L., Sparo, M. D., & Sánchez Bruni, S. F. (2021). The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(2), e00761. doi:10.1002/prp2.761
- Sokabe, T., Bradshaw, H. B., Tominaga, M., Leishman, E., Chandel, A., & Montell, C. (2022). Endocannabinoids produced in photoreceptor cells in response to light activate *Drosophila* TRP channels. *Science Signaling*, 15(755), eabl6179. doi:10.1126/scisignal.abl6179
- Soria-Lara, D. M., Gaitán-Vélez, B. V., Jiménez-Islas, H., & Miranda-López, R. (2019). El Sistema de Endocannabinoides como regulador de la lipogénesis y su posible modulación por la mangiferina. *REVISTA BIOMÉDICA*, 30(2). doi:10.32776/revbiomed.v30i2.638
- Stasiłowicz, A., Tomala, A., Podolak, I., & Cielecka-Piontek, J. (2021). *Cannabis sativa* L. as a natural drug meeting the criteria of a multitarget approach to treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 778. doi:10.3390/ijms22020778
- The forbidden fruit and the tree of knowledge: an inquiry into the legal history of American marijuana prohibition. (s/f).
- Shahbazi F, Grandi V, Banerjee A, Trant JF. Cannabinoids y receptors of cannabinoides: la historia hasta ahora. *iCiencia*. 2020; 23(7):1–22. doi: 10.1016/j.isci.2020.101301

- Takeda S, Misawa K, Yamamoto I, Watanabe K. "Ácido cannabidiólico como componente inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 en el cannabis". Eliminación de metabólicos de medicamentos. 2008; 36(9):1917-1921. _ doi:10.1124/dmd.108.020909
- Vaughn DM, Paulionis LJ, Kulpa JE. "Evaluación aleatoria, controlada con placebo, de seguridad y farmacocinética de 28 días de la administración oral repetida de cannabidiol en perros sanos". Soy J Vet Res. 2021; 82(5):405–416. doi:10.2460/ajvr.82.5.405
- Voelker, R. (2020). FDA says it supports cannabis drug development via regulatory pathways. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 323(7), 600. doi:10.1001/jama.2020.0833
- Vuic, B., Milos, T., Tudor, L., Konjevod, M., Nikolac Perkovic, M., Jazvinscak Jembrek, M., ... Svob Strac, D. (2022). Cannabinoid CB2 receptors in neurodegenerative proteinopathies: New insights and therapeutic potential. Biomedicines, 10(12), 3000. doi:10.3390/biomedicines10123000
- Wakshlag, J. J., Cital, S., Eaton, S., Prussin, R., & Hudalla, C. (2020). Cannabinoid, Terpene, and Heavy Metal Analysis of 29 Over-the-Counter Commercial Veterinary Hemp Supplements. Department of Clinical Sciences, Cornell University College of Veterinary Medicine, Ithaca, NY 14853, USA; and Scientific Communications, Portland, ME, DOI: 10.1111/jvp.13016 USA., 45-55.
- Wei, X., Zhao, X., Long, S., Xiao, Q., Guo, Y., Qiu, C., ... Wang, Y. (2021). Wavelengths of LED light affect the growth and cannabidiol content in Cannabis sativa L. Industrial Crops and Products, 165(113433), 113433. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113433
- Wimalasiri, E. M., Jahanshiri, E., Chimonyo, V. G. P., Kurupparachchi, N., Suhairi, T. A. S. T. M., Azam-Ali, S. N., & Gregory, P. J. (2021). A framework for the development of hemp (Cannabis sativa L.) as a crop for the future in tropical environments. Industrial Crops and Products, 172(113999), 113999. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113999.
- Yekhtin, Z., Khuja, I., Meiri, D., Or, R., & Almogi-Hazan, O. (2022). Differential Effects of D9 Tetrahydrocannabinol (THC)- and Cannabidiol (CBD)-Based Cannabinoid Treatments on Macrophage Immune Function In Vitro and on Gastrointestinal Inflammation in a Murine Model.

ęebkowska-Wieruszewska B, S. F. (2019). Farmacocinética de Bedrocan®, un extracto de aceite de cannabis, en perros en ayunas y alimentados: un estudio exploratorio. *Res Vet Sci*, 23:26–28. abril de 2019: 123: 26-28. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.12.003.

Zamith Cunha, R., Salamanca, G., Mille, F., Delprete, C., Franciosi, C., Piva, G., ... Chiocchetti, R. (2023). Endocannabinoid system receptors at the hip and stifle joints of middle-aged dogs: A novel target for the therapeutic use of Cannabis sativa extract in canine arthropathies. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13(18). doi:10.3390/ani13182833

Zgair A, Wong JC, Lee JB,(2016). Las grasas dietéticas y los excipientes lipídicos farmacéuticos aumentan la exposición sistémica al cannabis administrado por vía oral y a los medicamentos a base de cannabis. *Soy J Transl Res.*; 8(8):3448–3459

Anexos

Anexo A. Base de datos estadísticos del estudio.

Cuadro 1. Células fagocíticas en suero activado e inactivado al día 0, 10 y 21 con relación al sexo de los perros. Estadísticos descriptivos, media, desviación estándar, valores máximos y mínimos.

Sexos perros		CFSA	CFSA	CFSA	CFSI	CFSI	CFSI
		día 0	día 10	día 21	día 0	día 10	día 21
	Media	82,6000	91,0000	58,5000	70,5000	64,9000	48,3000
	N	10	10	10	10	10	10
Hembra	D.E	5,98517	7,45356	10,53302	12,52775	16,33979	9,79853
	Mínimo	75,00	71,00	40,00	48,00	45,00	30,00
	Máximo	92,00	97,00	72,00	86,00	88,00	60,00
	Media	82,9000	83,0000	60,1000	62,8000	53,5000	46,3000
Macho	N	10	10	10	10	10	10
	D.E	4,62961	11,03530	11,99491	12,05358	8,86002	8,79457

	Mínimo	75,00	65,00	43,00	41,00	41,00	35,00
	Máximo	90,00	97,00	75,00	84,00	69,00	60,00
	Media	82,7500	87,0000	59,3000	66,6500	59,2000	47,3000
	N	20	20	20	20	20	20
Total	D.E	5,21006	10,04202	11,01721	12,60023	14,06601	9,11967
	Mínimo	75,00	65,00	40,00	41,00	41,00	30,00
	Máximo	92,00	97,00	75,00	86,00	88,00	60,00

CFSA= Células fagocíticas suero activado; CFSI= Células fagocíticas suero inactivado; D.E= Desviación estándar

Cuadro 2. Células fagocíticas en suero activado e inactivado al día 0, 10 y 21 con relación a la edad de los perros. Estadísticos descriptivos, media, desviación estándar, valores máximos y mínimos.

Edad perros		CFSA	CFSA	CFSA	CFSI	CFSI	CFSI
		día 0	día 10	día 21	día 0	10	21
	Media	84,1000	86,3000	61,2000	72,3000	62,6000	46,5000
	N	10	10	10	10	10	10
Adultos	D.E	5,38413	12,34729	11,32156	12,73708	15,39986	8,98455
	Mínimo	75,00	65,00	45,00	53,00	41,00	35,00
	Máximo	92,00	97,00	75,00	86,00	88,00	60,00
	Media	81,4000	87,7000	57,4000	61,0000	55,8000	48,1000
	N	10	10	10	10	10	10
Gerontes	D.E	4,92612	7,70353	10,95648	10,09950	12,44365	9,66609
	Mínimo	75,00	71,00	40,00	41,00	45,00	30,00
	Máximo	87,00	95,00	70,00	74,00	87,00	60,00

	Media	82,7500	87,0000	59,3000	66,6500	59,2000	47,3000
	N	20	20	20	20	20	20
Total	D.E	5,21006	10,04202	11,01721	12,60023	14,06601	9,11967
	Mínimo	75,00	65,00	40,00	41,00	41,00	30,00
	Máximo	92,00	97,00	75,00	86,00	88,00	60,00

CFSA= Células fagocíticas suero activado; CFSI= Células fagocíticas suero inactivado; D. E= Desviación estándar

Cuadro 3. Índice de fagocitosis en los días 0, 10 y 21 con relación al sexo de los perros. Estadísticos descriptivos, media, valores máximos y mínimos.

Sexos perros		IF día 0	IF día 10	IF día 21
	Media	1,2049	1,4658	1,2574
	N	10	10	10
Hembra	D.E	,22355	,29992	,39277
	Mínimo	,92	1,05	,94
	Máximo	1,56	1,94	2,33
	Media	1,3684	1,5683	1,3570
	N	10	10	10
Macho	D.E	,30556	,19586	,44744
	Mínimo	1,00	1,25	,77

	Máximo	2,10	1,93	2,14	
	Media	1,2867	1,5170	1,3072	
	N	20	20	20	
Total	D.E	,27374	,25207	,41293	
	Mínimo	,92	1,05	,77	
IF=	Máximo	2,10	1,94	2,33	Índice de Fagocitosis; D.E =
Desviación					estándar

Cuadro 4. Índice de fagocitosis en los días 0, 10 y 21 con relación al sexo de los perros. Estadísticos descriptivos, media, valores máximos y mínimos.

Edad perros		IF día 0	IF día 10	IF día 21
	Media	1,1985	1,4191	1,3689
	N	10	10	10
Adultos	D.E	,23414	,22364	,42160
	Mínimo	,92	1,05	,94
	Máximo	1,55	1,68	2,14
	Media	1,3748	1,6150	1,2455
	N	10	10	10
Gerontes	D.E	,29343	,25060	,41686
	Mínimo	1,09	1,08	,77
	Máximo	2,10	1,94	2,33

	Media	1,2867	1,5170	1,3072
	N	20	20	20
Total	D.E	,27374	,25207	,41293
	Mínimo	,92	1,05	,77
	Máximo	2,10	1,94	2,33

IF= Índice de Fagocitosis; D.E =
Desviación estándar

Anexos B.Formato de formulario de consentimiento y base de datos de cada paciente.

TRABAJO DE TITULACIÓN EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE ACEITE DE CAÑAMO CBD, SOBRE INFIJE FAGOCITICO EN LA ESPECIE *CANIS LUPUS FAMILIARIS*

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

TESISTA

Yo, Ximena Karina Calle Moscoso por medio del presente formulario doy a conocer a los tutores de los pacientes en estudio:

- 1.- La finalidad del estudio: ¿qué resultados buscamos? ¿cómo aporta la participación y el compromiso de las dos partes? en que consiste la terapia, período establecido de fase de estudio.
- 2.- Los datos de control que vamos a considerar durante este proceso.
- 3.- Los posibles efectos secundarios del uso, administración y manejo de terapéuticas con CBD.
- 4.- Los efectos secundarios marcados en el producto que se utilizó en el desarrollo de este estudio.
- 5.- Base de datos de los pacientes en estudio dividido en el período de desarrollo del mismo (21 DÍAS)
- 6.- Firma de aceptación y compromiso por las dos partes (TESISTA/TUTOR)

NOMBRE DEL PROPIETARIO: : INICIO OL CLINICO DOSIS TERAPEUTICA ESTABLECIDA EN EL ESTUDIO:

NOMBRE DEL PACIENTE: IALIZAC 2.5 mg/kg CADA 12 HORAS.

TERAPEUTICIDAD DOSIS DEL PACIENTE POR TOMA /DIA :

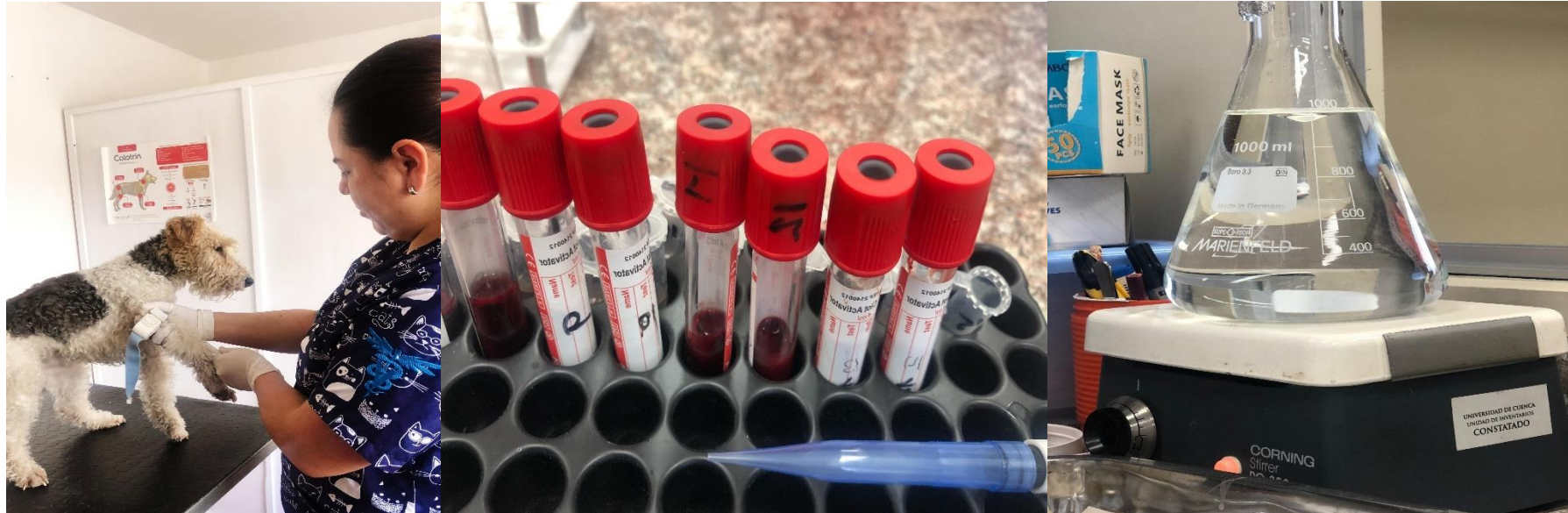
DATOS DEL PACIENTE

EDAD:
SEXO:
PESO:
CONDICION CORPORAL:
TIPO DE ALIMENTACION:

Anexo C. FOTOGRAFIAS



Fotografías A, B, C. Cultivo bacteriológico de la cepa *Staphylococcus aureus*



Fotografías D, F, G: toma y procesamiento de muestras



Fotografías G, H, I: separación de suero Activado e Inactivado, adiconamiento de reactivos.



Fotografías J, K, M: preparación de muestras



Fotografías N, L, O: tinción celular para la lectura (IF)



Fotografías P, Q, R: lectura de resultados.