

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
MÉDICO CIRUJANO  
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

Expresión de receptores CB1 en corteza prefrontal y su relación con el nivel de ansiedad en ratones BALB/c suplementados con edulcorantes no nutritivos

**Presenta:**

M.P.S.S. Hussein Jr. Sheykh Olya Trujillo

**Directores de Tesis:**

Ph.D José Antonio Estrada Guadarrama

Ph.D. Irazú Contreras García

**Revisores de Tesis:**

Ph.D. Keila Isaac Olivé

D.C.S. Liliana Aranda Lara

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO. 2019

“If we knew what it was we were doing, it would not be called research,  
would it?”

Albert Einstein

---

## ÍNDICE

---

|   | No. página |
|---|------------|
| <b>Resumen</b>  | 5          |
| <b>1.- Antecedentes</b>   | 6          |
| 1.1. Sistema endocanabinoide  | 6          |
| 1.1.1.- Receptores para endocannabinoides   | 7          |
| 1.1.2.- Metabolismo de endocannabinoides  | 9          |
| 1.1.3.- Funciones de los endocannabinoides en el Sistema Nervioso Central                   | 12         |
| 1.2- Ansiedad   | 15         |
| 1.2.1- Neuroanatomía de la ansiedad   | 16         |
| 1.2.2- La corteza prefrontal en la ansiedad   | 16         |
| 1.3.- Endocannabinoides y ansiedad  | 17         |
| 1.4.- Pruebas para valorar la ansiedad en ratones   | 19         |
| 1.5.- Edulcorantes y alimentación   | 22         |
| 1.5.1.- Participación de los edulcorantes en la conducta alimentaria                        | 24         |
| 1.6.- Correlación entre la regulación energética metabólica y<br>el sistema endocanabinoide | 25         |
| 1.7.- Edulcorantes y ansiedad   | 26         |
| <b>2.- Planteamiento del problema</b>   | 28         |
| <b>3.- Hipótesis</b>  | 30         |
| <b>4.- Justificación</b>  | 31         |
| <b>5.- Objetivos</b>  | 32         |
| <b>6.- Operacionalización de variables</b>  | 33         |
| <b>7.- Metodología</b>  | 34         |
| <b>8.- Implicaciones éticas</b>   | 40         |
| <b>9.- Resultados</b>   | 41         |

---

|      |                                |    |
|------|--------------------------------|----|
| 10.- | Discusión                      | 46 |
| 11.- | Conclusiones y recomendaciones | 48 |
| 12.- | Perspectivas futuras           | 49 |
| 13.- | Bibliografía                   | 50 |

## RESUMEN

El consumo de edulcorantes ha sido empleado como tratamiento co-adyuvante para enfermedades crónicas no transmisibles, incluyendo la diabetes, sobrepeso, obesidad y síndrome metabólico. Sin embargo, en la actualidad, el consumo de estos compuestos se ha extendido a la población general, debido a su incorporación en una gran variedad de alimentos y bebidas para consumo humano. Por lo tanto, es importante conocer sus efectos sobre la salud, ya sean benéficos o perjudiciales. A pesar de que los edulcorantes comerciales son considerados como inocuos, existe evidencia de que su consumo frecuente y crónico puede tener efectos adversos sobre diferentes sistemas corporales, por lo que es necesario determinar las posibles consecuencias que estos aditivos alimentarios tienen en la salud humana.

Los endocannabinoides son sustancias derivadas de ácidos grasos que provienen de la remodelación de la membrana celular, cuya producción y liberación ocurren “a demanda”, generando un estado tónico en sus niveles. Actualmente, se reconoce su importancia en la regulación del metabolismo energético.

Se ha demostrado que el consumo de la llamada “dieta de cafetería o hipercalórica” se asocia con cambios en los niveles de ansiedad y de forma independiente, con cambios en las funciones del sistema de endocannabinoides; no obstante, los mecanismos que relacionan ambos sistemas aún no se conocen claramente. El propósito de este proyecto fue determinar el efecto del consumo frecuente de un edulcorante comercial (glucósidos de esteviol) sobre la expresión de receptores CB1 del sistema endocannabinoide en el tejido encefálico y su relación con el nivel de ansiedad en un modelo murino. Con este propósito, se utilizaron un total de 12 ratones hembras de la cepa BALB/c, divididos en 3 grupos experimentales, cada uno integrado por 4 ratones, respectivamente. Los animales fueron suplementados durante 6 semanas con sacarosa o con glucósidos de esteviol, además de un grupo control sin suplementación. Durante el proceso se analizó el comportamiento de ansiedad en los animales experimentales a través de prueba de labariento elevado en cruz y prueba de caja oscura, posteriormente, al completarse el tiempo establecido como tratamiento, se obtuvieron cortes histológicos del cerebro, para identificar la expresión del receptor para endocannabinoides CB1. Tras el análisis de las variables deseadas, no se encontró una diferencia significativa en la expresión del receptor CB1 ni en las pruebas de ansiedad dentro de los grupos experimentales, por lo cual, con base en los resultados preliminares obtenidos, se concluye que las suplementaciones con los edulcorantes utilizados no inducen aumento en los niveles de ansiedad ni aumento significativo en la expresión del receptor CB1 para endocannabinoides entre los grupos estudiados.

## 1.- Antecedentes:

### 1.1.- Sistema endocanabinoide

La planta *Cannabis sativa* contiene más de 460 compuestos químicos diferentes, de los cuales, más de 60 están agrupados bajo el término “cannabinoides”, haciendo referencia a las sustancias que tienen una estructura carboxílica de 21 carbonos (1). En Europa, no es sino hasta el siglo XIX cuando el cannabis se convierte en una medicina común y de uso legal por su utilidad en el tratamiento de dolor, convulsiones, espasmos y emesis. Sin embargo, en el año 1925 la Convención de Génova incluye el cannabis y hachís en la lista de drogas ilícitas y peligrosas (2). En 1964, Gaoni y Mechoulam aíslan y determinan la estructura del principal responsable de las propiedades psicoactivas de la planta, el Delta-9-tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), y en 1988, Devane descubre el receptor específico para este cannabinoide, el receptor CB1 (3). Estos hallazgos han permitido descubrir y caracterizar en los últimos 20 años un sistema de señalización endógena conocido como sistema endocannabinoide (SEC). Este sistema ejerce su papel modulador principalmente en el cerebro, pero también en la periferia, y consta de receptores, ligandos (endógenos, fitocannabinoides o sintéticos) y enzimas responsables de su síntesis y degradación (3). El nombre “SEC” hace referencia al hecho de que este sistema endógeno con efectos similares al de los cannabinoides obtenidos de las plantas (4). El SEC es un sistema de comunicación intercelular, es decir, un sistema de señalización con amplia distribución, abarcando desde estructuras encefálicas hasta células del sistema inmunológico, destacando que no es exclusivo del cerebro. Se encuentra implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos, como la modulación de la liberación de neurotransmisores, regulación de la percepción del dolor, funciones cardiovasculares, gastrointestinales y hepáticas (5).

### *Endocannabinoides*

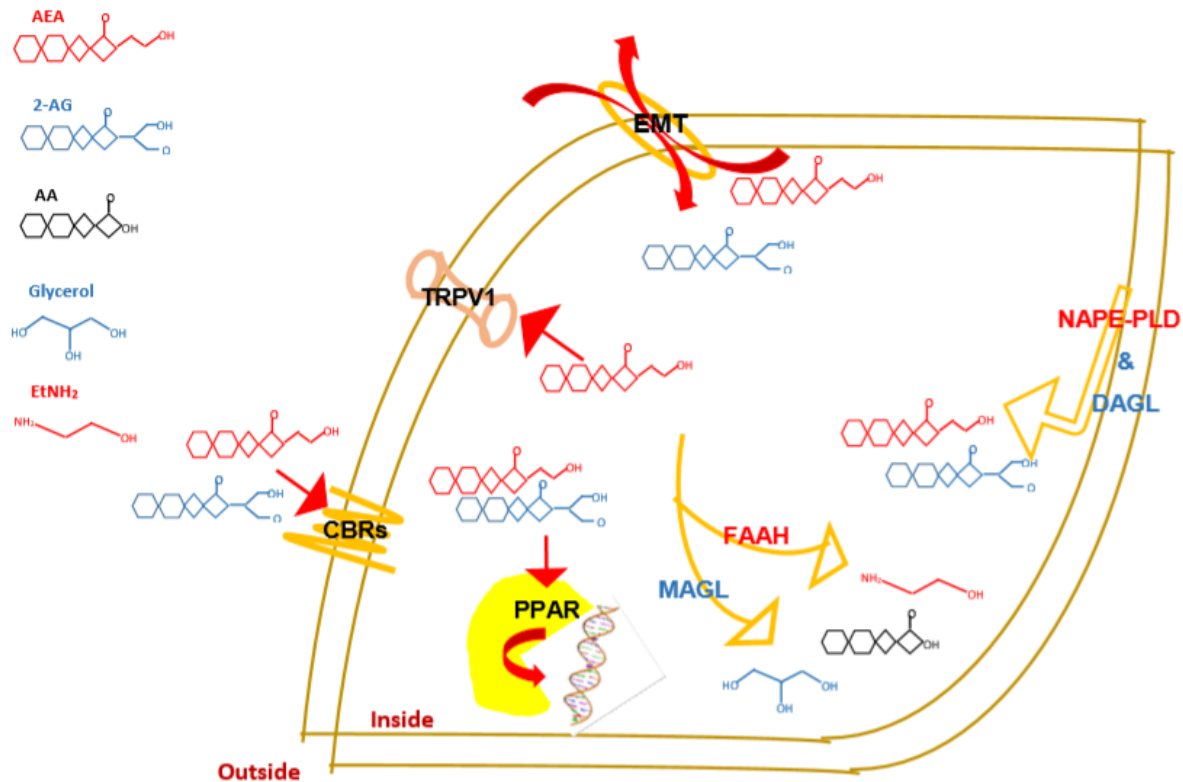
Los endocannabinoides son compuestos endógenos de naturaleza lipídica, que derivan de ácidos grasos poliinsaturados, como lo es el ácido araquidónico. Los principales endocannabinoides son N-araquidonil-etanolamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG); sin embargo, hay otros lípidos considerados endocannabinoides, como lo son el 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE o noladin éter), la N-araquidonil dopamina (NADA) y la oleamida (Figura 1).

### *N-araquidonil-etanolamida*

La AEA, mejor conocida como anandamida, fue aislada por vez primera del cerebro porcino, identificándolo como cannabinoide endógeno hasta el año de 1992. Tiene la peculiaridad de actuar a nivel de los receptores (CB1 y CB2) del Sistema Endocannabinoide (SEC) (6). La producción de anandamida no es exclusiva de las neuronas ni del sistema nervioso central (SNC), también se presenta en astrocitos y microglía (7).

### *2-araquidonilglicerol*

El 2-AG, identificado en 1995 en el intestino canino, se sintetiza partiendo del diacilglicerol (DAG) y ácido araquidónico. Su obtención es catalizada por DAG lipasas (DAGL- $\alpha$  y DAGL- $\beta$ )(7). El 2-AG se comporta como agonista de CB1 y CB2, con una avidez menor que AEA.



**Figura 1.- Principales elementos que constituyen al sistema de endocannabinoides.** La síntesis de N-araquidonoil-etanolamina (AEA) se debe a la actividad de una fosfolipasa D específica de NAPE (N-araquidonoil- fosfatidiletanolamina), mientras que una amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) es responsable de su degradación intracelular a etanolamina (EtNH<sub>2</sub>) y ácido araquidónico (AA). 2-arachidonoylglycerol (2-AG) se libera de los lípidos de la membrana a través de la actividad de la lipasa diacilglicerol (DAGL), y es hidrolizado por una monoacilglicerol lipasa citosólica (MAGL), que libera glicerol y AA. Un transportador de endocannabinoides membranaral (EMT) libera AEA y 2-AG al espacio extracelular. Tanto AEA como 2-AG activan varias rutas de transducción de señales actuando sobre los receptores, CB1, CB2, GPR55 y PPAR nuclear (1).

### 1.1.1.- Receptores para endocannabinoides

#### Receptor CB1

Este receptor, clonado por primera vez en cerebro de rata por Matsuda y colaboradores es el más abundante en cerebro de mamíferos (6). Se localiza principalmente en neuronas del cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico, pero también en órganos y tejidos periféricos como son el sistema inmunitario, glándulas adrenales, glándula pituitaria, corazón,

pulmón, así como partes del tracto gastrointestinal, urinario y reproductivo. Recientemente se han unido a la lista los adipocitos, hígado y células parietales del estómago (6). Estudios de inmunohistoquímica en rata muestran con detalle su distribución en el Sistema Nervioso Central (SNC), encontrando una mayor densidad de receptores en ganglios basales, hipocampo y cerebelo (8). Estas áreas del cerebro están relacionadas con la actividad motora, capacidad cognitiva, memoria y coordinación, respectivamente, de modo que algunos de los efectos farmacológicos ejercidos por cannabinoides están vinculados a la distribución del receptor CB1. En humanos, ésta distribución se mantiene, aunque se encuentra una expresión mayor del receptor en la corteza límbica que en regiones motoras y sensoriales, lo que sugiere que el CB1 desempeña un papel importante en el procesamiento de la información motivacional y cognitiva (9). Su expresión es mayoritariamente presináptica, en axones y terminales nerviosas, donde puede mediar la inhibición de la liberación de neurotransmisores, aunque también puede estar presente en las dendritas y soma de neuronas. Los niveles de expresión de CB1 en células gliales son inferiores, pero está presente en astrocitos, oligodendrocitos y progenitores neurales (7). La expresión de CB1 en microglía sólo se describe en estudios *in vitro*. El receptor CB1 está muy conservado entre especies, siendo la homología de secuencia entre humano y ratón del 91% y entre humano y rata del 90% (4). Se han identificado variantes de CB1 por procesamiento alternativo, con niveles bajos de expresión, CB1A en rata y humano, y más recientemente, CB1B sólo en humano. También se han detectado mutaciones y polimorfismos en el gen del receptor CB1 relacionados con el abuso de sustancias y la mayor susceptibilidad a padecer esquizofrenia y obesidad (8).

### *Receptor CB2*

Este segundo receptor se clonó en el año 1993 por Munro en muestras humanas, y posteriormente en ratón y rata (6). A diferencia del receptor CB1, se localiza principalmente en células del sistema inmune y hematopoyético. Los niveles más altos de ARNm del receptor CB2 se encuentran en Linfocitos B, células “asesinas naturales”, monocitos, neutrófilos, linfocitos T-CD8+ y linfocitos T CD4+ (9). Tras años de gran controversia, ahora se acepta que la distribución de CB2 no es estrictamente periférica y que también se encuentra en el SNC (8). En 1996, Skaper y colaboradores, por medio de técnicas de hibridación *in situ*, describieron expresión del ARNm de CB2 en cerebelo, concretamente en las células granulares y de Purkinje (7). Años más tarde, Ross y colaboradores detectaron expresión de CB2 *in vitro* en neuronas sensoriales; Van Sickle y colaboradores localizaron el receptor en neuronas del tallo cerebral, donde podría modular la emesis. También se ha identificado la presencia de CB2 *in vivo* e *in vitro* en progenitores neurales (10). El receptor CB2 en células gliales se expresa *in vitro* en astrocitos, oligodendrocitos y microglía. En cerebro sano, se identifica CB2 en la subpoblación de microglía que rodea los vasos sanguíneos, la llamada microglía perivascular (11). Sin embargo, en procesos inflamatorios del SNC, se induce la expresión de CB2 en microglía activada, donde su nivel de expresión es superior. La secuencia del receptor CB2 es más divergente entre especies. El grado de homología entre humano, rata y ratón es alto, exceptuando la región carboxi-terminal, que en rata es 50 y 63 aminoácidos más larga que en humano y ratón, respectivamente (11).



### 1.1.2.- Metabolismo de endocannabinoides

#### Síntesis de endocannabinoides

La principal ruta de síntesis de AEA es a partir de fosfolípidos de membrana, a través de una reacción en dos pasos, donde se produce la transferencia enzimática de ácido araquidónico de la posición sn-1 de fosfatidilcolina al grupo amino de la fosfatidiletanolamina, formando N-araquidonil-fosfatidiletanolamina (NAPE). Esta reacción es catalizada por una trans-acilasa dependiente de  $Ca^{2+}$ . El precursor NAPE es entonces hidrolizado a AEA por una fosfolipasa D (3,8). En estómago, el precursor N-acil-fosfatidiletanolamina también puede ser hidrolizado por la fosfolipasa A2 y el producto, N-acil-liso-fosfatidiletanolamina, es entonces metabolizado, formando varias N-aciletanolaminas, y entre ellas AEA (Figura 2). En macrófagos RAW246.7, la producción de AEA inducida por lipopolisacárido parece seguir también una ruta alternativa, donde NAPE es hidrolizada a fosfo-AEA, y ésta es posteriormente desfosforilada (8).

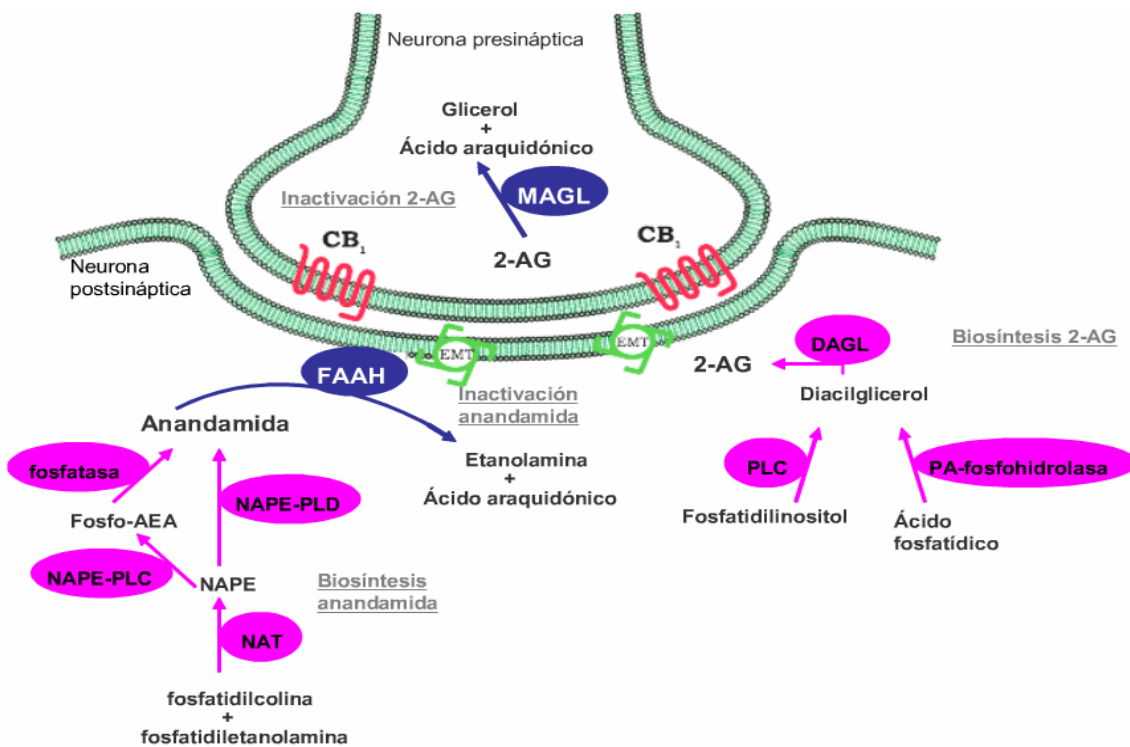


Figura 2.- Esquema de la síntesis y degradación de AEA y 2-AG en neuronas pre y postsinápticas. EMT: transportador de endocannabinoides; DAGL: diacilglicérido lipasa; FAAH: aminohidrolasa de ácidos grasos; MAGL: monoacilglicérido lipasa; NAT: N-aciltransferasa; NAPE: N-araquidonil fosfatidiletanolamina; PLC: fosfolipasa C.) (3).

El 2-araquidonil glicerol (2-AG), fue el segundo endocannabinoide identificado, esto en el año de 1995 en intestino canino y cerebro de rata. 2-AG se comporta como agonista de CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, aunque parece que con una potencia menor que AEA. Los niveles basales de 2-AG en cerebro

son mucho mayores que los de AEA, aunque sólo una fracción del total es la que probablemente esté involucrada en la señalización cannabinoide, puesto que 2-AG también interviene en el metabolismo lipídico (1). 2-AG se sintetiza a partir de la hidrólisis de diacilglicerol (DAG) por una DAG lipasa selectiva para la posición sn-1. Por su parte, DAG puede generarse a partir de la hidrólisis de, o bien fosfoinosítidos, catalizada por una fosfolipasa C selectiva para PI (PI-PLC), o bien ácido fosfatídico (PA), catalizada por una PA fosfohidrolasa. Dos isoenzimas DAG lipasa ( $\alpha$  y  $\beta$ ) han sido clonadas y localizadas en la membrana plasmática postsináptica en cerebro adulto (8,9).

Endógenamente, existen algunas otras sustancias que participan como ligandos endógenos para los receptores, tanto cannabinoideos como no cannabinoideos, como lo son: 1) 2-araquidonilglicerol éter (Noladin éter), Identificado en 2001 en cerebro porcino. Este endocannabinoide se comporta como agonista de CB1 y CB2, aunque la afinidad por CB1 es mucho mayor. 2) O-araquidonil etanolamina (Viroadamina), aislado por vez primera en el cerebro de rata, así como en tejidos periféricos, como piel, bazo, riñón y corazón. Se comporta como agonista parcial de CB1 y agonista completo de CB2. 3) N-araquidonil-dopamina (NADA), aislado en cerebro bovino y de rata. Es agonista de CB1 y también actúa como ligando del receptor TRPV1 (5,8).

#### *Degradación de endocannabinoideos*

Los endocannabinoideos, al igual que un neurotransmisor convencional, cuentan con una vía establecida para su degradación, consistiendo en 2 pasos. 1) retirada del medio – ligando y; 2) degradación enzimática intracelular, culminando en la hidrólisis de éstos endocannabinoideos (1,3).

#### *Degradación de AEA*

La enzima responsable de hidrolizar el enlace amida de AEA, originando ácido araquidónico y etanolamina, es la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Ésta es una proteína integral de membrana, de la familia de las amidasas, la cual ejerce su actividad primordialmente en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi, siendo capaz de hidrolizar varias N-aciletanolamidas y amidas primarias de ácidos grasos (6). Fue clonada por vez primera en rata y posteriormente en humano, ratón y cerdo, compartiendo todas ellas un 73% de homología de secuencia (3). La distribución de FAAH varía entre especies; por ejemplo, en rata; se distribuye principalmente en hígado, intestino delgado, cerebro, riñón, testículos, pulmón y bazo (6). En cambio, en el ser humano, aparece primordialmente en páncreas, cerebro, riñón y músculo esquelético. En el cerebro, FAAH se localiza en el soma y dendritas de las células piramidales; en cerebelo, corteza cerebral e hipocampo aparece en las células de Purkinje (1). FAAH también está presente en oligodendrocitos y astrocitos, siendo su expresión y actividad más elevadas en los astrocitos reactivos próximos a los depósitos de  $\beta$ -amiloides, característicos de la enfermedad de Alzheimer y Síndrome de Down (1,6). Recientemente, se ha identificado en humano y primates una segunda amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH-2), que comparte un 20% de homología de secuencia con FAAH. FAAH-2 también hidroliza amidas primarias de ácidos grasos y es sensible a las principales clases de inhibidores de FAAH, pero con diferente distribución tisular (8).

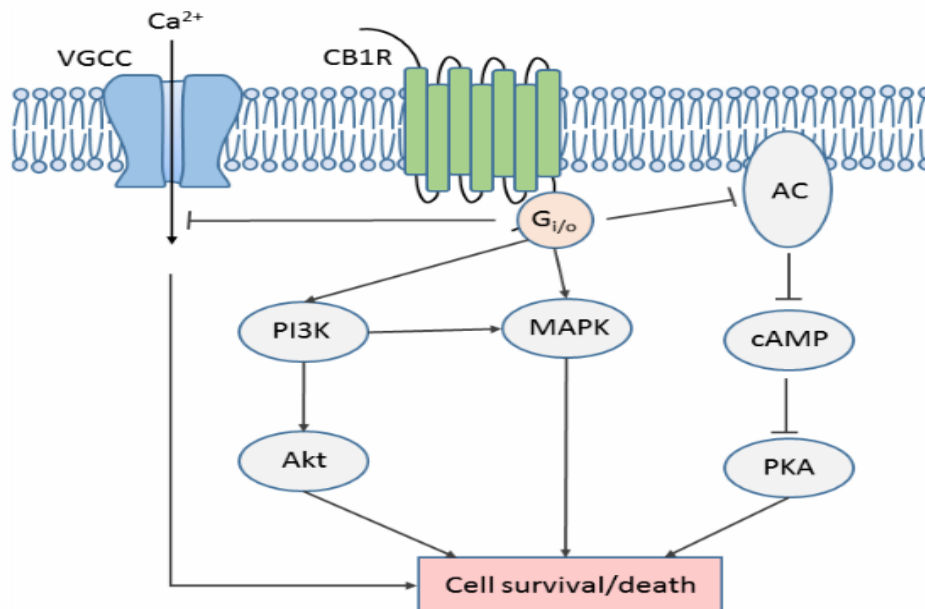
### Degradación de 2-AG

2-AG es hidrolizado por una monoacilglicérido lipasa (MAGL) que no hidroliza AEA, y que se localiza en neuronas presinápticas (8). Esta enzima se expresa también en riñón, testículos, tejido adiposo, glándula adrenal y cerebro. En cerebro, los niveles más altos de MAGL, al igual que FAAH, se encuentran en aquellas regiones donde CB1 también es abundante, tales como hipocampo, corteza cerebral, tálamo y cerebelo (6,8). La familia de inhibidores de MAGL contiene pocos miembros y la mayoría de ellos son poco selectivos. Los inhibidores de FAAH, como URB597 y OL-135, no producen una inhibición significativa de MAGL. Sin embargo, dos análogos de araquidonilglicerol, O-2203 y O-2204, son capaces de inhibir MAGL y FAAH, con una potencia similar y sin activar los receptores CB1 (7,9).

### Señalización por endocannabinoides.

Dentro del metabolismo celular de los endocannabinoides, es importante conocer la forma en la cual transducen señales y su degradación, todo ello para poder comprender en mejor forma su repercusión en la función orgánica.

En la mayoría de los tejidos, el receptor CB1 se acopla a proteínas Gi/o, aunque en determinadas circunstancias puede unirse a proteínas Gs. La activación de CB1 es capaz de modular los niveles de AMPc intracelular y, por tanto, regular la fosforilación de la proteína quinasa A, produciendo cambios en la actividad celular. Su acoplamiento a las isoformas I, V, VI u VIII de adenil ciclasa a través de proteínas Gi/o siempre resulta en la inhibición de la actividad ciclasa, repercutiendo en la disminución de los niveles de AMPc intracelular (Figura 3) (1,8).



**Figura 3.- Principales vías de señalización moduladas por CB1.** Típicamente, el CB1 está acoplado a Gi/o e inhibe la actividad de la adenilil ciclasa (AC), la formación de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y la actividad de la proteína quinasa A (PKA). Bajo ciertas circunstancias, el CB1 puede cambiar su acoplamiento de la proteína G de Gi/o a Gs o Gq. El CB1 es capaz de suprimir la afluencia de calcio a través del canal de calcio regulado por voltaje (VGCC). Varias

proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que incluyen ERK 1/2, p38 y JNK, son activadas por el CB1. La fosfatidilinositol3-quinasa (PI3K) y la ruta de la quinasa B (Akt), también se activan por CB1. Dependiendo del ligando y del medio ambiente celular, el resultado de la señalización mediada por CB1 podría ser la promoción de la supervivencia celular o la muerte celular. Las flechas indican estimulación; las flechas romas indican inhibición (3).

Los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular también son regulados vía CB1, ya que su activación y acoplamiento a proteínas Gi/o, activa la fosfolipasa C (PLC) y libera  $Ca^{2+}$  de los reservorios sensibles a inositol 1,4,5-trifosfato (IP3)(4). La ruta de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) es un mecanismo de señalización clave que regula funciones celulares como crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Los receptores CB1 han mostrado activar positivamente algunos miembros de la ruta, como p42/p44 MAPK (también conocida como ERK 1/2), c-JUN, quinasa N-terminal y p38 quinasa (8). Aunque el mecanismo de modulación de MAPK por CB1 no se conoce, se han propuesto dos rutas de transducción de señales. La primera, a través de la activación de fosfatidilinositol 3 kinasa/proteína quinasa B (PI3k/PKB) que media la fosforilación de tirosina y la activación de Raf; la segunda, a partir de la liberación de ceramidas, que como mensajeros lipídicos secundarios activan la cascada RAF–MAPK (8,12). El receptor CB2 también inhibe la adenilato ciclasa a través de su interacción con proteínas Gi/o, pero a diferencia de CB1, no está acoplado a Gs. Los cannabinoides pueden modular también la ruta MAPK vía CB2, a través de la activación de PI3k/PKB, que en este caso induce la translocación de Raf-1 a la membrana y la fosforilación de p42/p44 MAPK. La estimulación del receptor CB2 también incrementa los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de la activación de PLC y la consiguiente liberación de  $Ca^{2+}$  de los reservorios sensibles a IP3 (13).

### *1.1.3.- Funciones de los endocannabinoides en el sistema nervioso central*

El sistema endocannabinoide presenta una amplia distribución en nuestro organismo, por lo que esto condiciona una variada gama de funciones, entre ellas aprendizaje, memoria, locomoción, interpretación del miedo, comportamiento social, ansiedad, apetito, balance energético, neuroprotección, neuromodulación, remodelación ósea y modulación del sistema inmunológico. Esto establece su relación estrecha con tres sistemas esenciales de regulación fisiológica: el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmune (14).

#### *Memoria*

El potencial amnésico de la marihuana y los cannabinoides ha sido reconocido durante muchos años y se considera uno de los efectos adversos más perturbadores del consumo de marihuana. Se ha demostrado que los endocannabinoides (AEA y 2-AG) interfieren con la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo (15). Como la transmisión retrógrada tiene un impacto directo en la plasticidad neuronal y, por lo tanto, en los procesos de aprendizaje y memoria, el papel de los endocannabinoides como mensajeros retrógrados es sumamente relevante en el entendimiento de los efectos inducidos por endocannabinoides en los procesos mnemotécnicos (14). Los mecanismos de señalización retrógrada en los que participan los endocannabinoides, pueden afectar el proceso de memoria–aprendizaje de diferentes maneras. Por ejemplo: plasticidad a corto plazo (14). Tanto la despolarización que suprime la inhibición (DSI, de sus

siglas en inglés, depolarization-induced suppression of inhibition) y la despolarización que suprime la excitación (DSE, de sus siglas en inglés, depolarization-induced suppression of excitation) duran solo alrededor de 530s (15). Se cree que la DSI proporciona una ventana de oportunidad para el cambio sináptico, cuando la excitabilidad de la neurona post sináptica es alta, facilitando la potenciación a largo plazo de las entradas sinápticas glutaminérgicas (15). Nuestra comprensión actual de que los endocannabinoides intervienen en la DSI en el hipocampo, presumiblemente facilitando la memoria, implica que la marihuana, con su dosis alta de delta Delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) mucho más estable, inhibe tónicamente la DSI, alterando así los procesos de memoria (16). De acuerdo con esta expectativa, Mato y colaboradores demostraron que una sola inyección de THC interrumpió tanto DSI como DSE durante hasta 3 días (14). Sin embargo, las observaciones sobre ratones *knock-out* para el receptor CB1 son más complejas. Como señalaron Wilson y Nicoll, los efectos de la marihuana en la memoria pueden implicar circuitos más complejos de lo que se entiende actualmente (17). En cuanto a la plasticidad a largo plazo. Una serie de artículos recientes han demostrado convincentemente que los endocannabinoides también son mensajeros retrógrados de cambios plásticos a largo plazo en el cerebro. Esto se ha demostrado para el hipocampo (14), los ganglios basales (18) y el núcleo accumbens (11). Estas observaciones respaldan el papel de la marihuana y del sistema de receptores endocannabinoides cerebrales en las alteraciones a largo plazo y su regulación en funciones como la formación de hábito, el control motor, la adicción y la memoria espacial (14). A pesar de que los cannabinoides se han asociado con la amnesia (1,14,19), esto no implica necesariamente que los endocannabinoides causen olvido.

### *Locomoción*

Las concentraciones del receptor CB1 en el cerebro están entre las más altas en el cuerpo estriado (14). Los receptores se localizan en proyecciones estriatales y en interneuronas estriatales (14). Esto es compatible con la depresión profunda de la actividad motora inducida por endocannabinoides (20). La coordinación está asociada con el cerebelo. La capa molecular de esta estructura es muy rica en receptores CB1. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las otras regiones, los receptores cerebelosos CB1 se encuentran en las células glutamatérgicas de Purkinje, en lugar de las células GABAérgicas (14). Se encontró una buena superposición entre la presencia de FAAH y la presencia del receptor CB1 (3,14), lo que sugiere una asociación funcional entre la activación del receptor CB1 y la función cerebelosa. Pocos estudios detallados de comportamiento sobre el funcionamiento del sistema endocannabinoide cerebeloso han sido reportados. Sin embargo, una serie de documentos de Dar y colaboradores han demostrado que los agonistas de los receptores cannabinoides CB1 inyectados localmente inducen ataxia e incoordinación motora, que no se observó después de las inyecciones intracampobólicas de cannabinoides. Además, los deterioros inducidos por cannabinoides se potenciaron por etanol y se modularon mediante receptores de adenosina (5,21).

### *Apetito e ingestión de alimentos*

Es bien conocido que el THC y otros cannabinoides y endocannabinoides aumentan el apetito y la ingestión de alimentos (22) y que un antagonista de receptor CB1, al bloquear los receptores,

inhibe estos procesos. Los receptores CB1 y los endocannabinoides también se encuentran en el hipotálamo, conocido por su importante papel para las regulaciones del apetito y la ingestión de alimentos (1,14). Además del hipotálamo y las localizaciones periféricas (intestinales, gástricas), los endocannabinoides regulan el apetito y la ingestión de alimentos a través de núcleos del rombocéfalo y a través del núcleo accumbens (11,22).

Los cannabinoides están lejos de ser los únicos factores que intervienen en la regulación del apetito y el equilibrio de peso (22). Di Marzo y colaboradores demostraron que los endocannabinoides hipotalámicos se equilibran negativamente con la hormona leptina (inhibidora del apetito) (23). Se han detectado receptores para la colecistoquinina (CCK), además de los que afectan a las aferencias vagales intestinales y gástricas, en áreas límbicas y corticales (22,24). En conjunto, estas observaciones son sugestivas de una interacción entre CCK y endocannabinoides en la regulación de la ingestión de alimentos (24). Se sugiere que el apetito regulado por endocannabinoides en el organismo es solo un reflejo del papel crítico de los receptores CB1 en la capacidad del recién nacido para mamar (24). No se conoce la localización específica de estos receptores; sin embargo, se propone que, en el recién nacido, la ingestión de leche es regulada por los receptores CB1. Egertova y colaboradores encontraron la mayor expresión de FAAH en el núcleo del trigémino mesencefálico, que controla los reflejos de apertura y cierre de la mandíbula (22). Se ha demostrado que 2-AG es necesario para el crecimiento axonal (25). Por lo tanto, es tentador especular que el bloqueo del receptor CB1 en recién nacidos interfiere con el desarrollo axonal requerido para el desarrollo del mecanismo de succión (25).

### *Recompensa y adicción*

Ha sido difícil demostrar las propiedades gratificantes del THC en modelos animales; por lo tanto, los efectos bidireccionales se han demostrado en la prueba de placebo, que son compatibles con los efectos bifásicos relacionados con la dosis del THC (25). Varios informes han indicado que los cannabinoides interactúan con el sistema opiáceo en comportamientos relacionados con la recompensa y en modelos animales de adicción (24). Por ejemplo, el rimonabant bloqueó la preferencia de lugar inducida por morfina y la autoadministración en ratones, mientras que la morfina indujo cambios en la expresión del ARNm del receptor CB1 en el núcleo accumbens, estructura estrechamente involucrada en comportamientos relacionados con la recompensa y adicción (26). Por lo tanto, los cannabinoides claramente tienen potencial adictivo, teniendo un sustrato neuronal común con opiáceos para los procesos relacionados con la recompensa (26,27). Como se ha descrito, los receptores CB1 son altamente co-expresados con CCK en varias estructuras límbicas, incluyendo el hipocampo y la amígdala, mientras que los receptores CCK en el núcleo accumbens pueden desempeñar un papel en la recompensa y la adicción (26). Tomados en conjunto, es posible que el sistema receptor cerebral endocanabinoide juegue un papel importante en la regulación de la recompensa y la adicción, en cooperación con el opiáceo dopamina y los sistemas CCK (27). Los endocannabinoides median la depresión sináptica a largo plazo y la DSE en el núcleo accumbens, así como la inhibición en el área tegmental ventral (ATV), una de las estructuras centrales en recompensa y desarrollo de adicción a las drogas. Por otra parte, se ha encontrado estimulación fisiológica de la DSE inducida

por la corteza prefrontal, demostrando un mecanismo autorregulador de las neuronas dopaminérgicas que pueden estar asociadas con el sistema de recompensa-adicción. Por lo tanto, no debería sorprendernos que el sistema receptor cerebral endocannabinoide pueda desempeñar un papel en la adicción no solo a la marihuana sino también a otras drogas (28). En este contexto, es notable que las altas densidades y activación del receptor CB1 fueron encontradas en la corteza límbica, a diferencia de las concentraciones más bajas en las áreas corticales sensoriales primarias (29). Hoy día se considera a la ansiedad como el componente más crítico de la adicción. Igualmente, se espera que el papel de los endocannabinoides en la plasticidad del sistema de recompensa-adicción mesolímbico/mesocortical avance significativamente, permitiéndonos la comprensión de las adicciones a las drogas y así abrir nuevas puertas para su manejo (28).

### *Percepción del dolor*

Los efectos antinociceptivos de los cannabinoides exógenos y endógenos en animales y humanos están bien establecidos e incluyen la supresión del dolor agudo, así como del dolor crónico e inflamatorio. El primer endocannabinoide que se descubrió, la AEA, redujo la nocicepción centralmente mediada en la prueba de placa caliente, al igual que 2-AG en el ensayo de sacudida de la cola (1,30). Se ha encontrado una reducción inducida por cannabinoides en la nocicepción en todos los niveles del sistema nociceptivo: a nivel del dolor periférico (a través de receptores CB1 y CB2) así como en nivel axial, específicamente a nivel espinal y supraespinal (31).

Dentro del cerebro, los cannabinoides ejercen sus efectos antinociceptivos en varios niveles del circuito neuronal para el procesamiento del dolor, incluida la sustancia gris periacueductal, médula rostral ventromedial, tálamo, amígdala y colículo superior (2,31). Los endocannabinoides parecen tener un papel en el control del dolor tónico. Por lo tanto, el antagonista del receptor CB1 indujo hiperalgesia térmica en la médula espinal, mientras que su activación en la médula espinal aumentó la nocicepción (17). Los cannabinoides reducen la percepción del dolor a través de la influencia inhibitoria descendente desde el tronco cerebral, hasta la médula espinal. De hecho, los agonistas de CB1 aplicados a estas áreas producen hipoalgesia. Un trabajo más reciente ha demostrado que el agonista del receptor CB1, WIN55212-2, produjo sus efectos inhibidores al reducir la liberación de GABA en cortes del tallo cerebral (2,30,31). En la neocorteza y en varias regiones del sistema límbico, incluido el hipocampo, la corteza entorrinal y la amígdala, los receptores CB1 están altamente expresados conjuntamente con la CCK. Aquí, la activación del receptor CB1 suprime la liberación de CCK. Dado que CCK también inhibe la antinocicepción inducida por opiáceos, esto sugiere que los cannabinoides sinergizan con los opiáceos en el control del dolor, mediante la inhibición del sistema CCK (31).

### *1.2.- Ansiedad*

La palabra ansiedad puede referirse a una variedad de fenómenos relacionados: a una clase de desórdenes psiquiátricos, a patrones particulares de conducta en modelos animales y como una característica de afecto negativa. También puede asociarse específicamente a un estado

emocional orientado a futuro, el cual se presenta en todos los seres humanos, variando en su grado de expresión (32).

Biológicamente, podríamos definir a la ansiedad como la respuesta adaptativa de un sistema de alarma que prepara a un organismo a contender contra un peligro potencial. Bajo condiciones normales, los síntomas de la ansiedad son imperceptibles, pero cuando es intensa, como en una situación de apremio, el individuo experimenta una sensación de inquietud y aprehensión acompañada con un aumento en la vigilancia del entorno, de dificultad para concentrarse, de un aumento de la tensión muscular y de numerosos síntomas autonómicos entre los que destacan las palpitaciones, la sudoración, la falta de aliento o la presencia de molestias digestivas (33). En casos extremos, como ocurre en los individuos que sufren de la enfermedad de pánico, a los síntomas anteriores, que en ellos se encuentran muy acentuados, se añade una sensación de “irrealidad”, y de “estar separado de uno mismo”, así como un marcado temor a “volverse loco”, a desmayarse o incluso a morir. En ocasiones, los pacientes con ansiedad sufren además síntomas de agorafobia (fobia a los espacios abiertos), traduciéndose en temor a estar fuera de casa, a formarse en una línea, a mezclarse con la gente, o a viajar, entre otros (33). Si bien la ansiedad se confunde por su cercanía al miedo, se diferencia de éste en que, mientras el miedo es una perturbación cuya presencia se manifiesta ante estímulos presentes, la ansiedad se relaciona con la anticipación de peligros futuros, indefinibles e imprevisibles. Tanto la ansiedad como el miedo tienen manifestaciones parecidas, en ambos casos se muestran pensamientos de peligro, sensaciones de aprensión, reacciones fisiológicas y respuestas motoras; por eso, tienden a confundirse. Una de las características más sobresalientes de la ansiedad es que es anticipatoria, es decir, posee la capacidad de prever o señalar el peligro o amenaza para el propio individuo; sin embargo, si la ansiedad supera los parámetros normales en cuanto de intensidad, frecuencia o duración, o bien se relaciona con estímulos no amenazantes para el organismo, provoca manifestaciones patológicas en el individuo, tanto a nivel emocional como funcional, pasa a convertirse en un trastorno psiquiátrico, el cual debe de ser manejado clínicamente (34).

#### *1.2.1.- Neuroanatomía de la ansiedad*

Se expone la existencia de una anatomía de las emociones; es decir, regiones del cerebro con una función crucial en su expresión. La localización de las emociones estaría en el sistema límbico, una zona que comprende varias estructuras profundas del cerebro como la corteza cingulada, la amígdala, el hipotálamo, el hipocampo, corteza cerebral y otras estructuras, todas ellas con conexiones con el tallo cerebral y la médula oblonga, teniendo la peculiaridad de estar en correlación estrecha con el nervio vago (décimo par craneal), el cual inerva casi todos los órganos del tórax y del abdomen, incluyendo corazón e intestino, siendo esto de vital importancia, ya que la comprensión de su existencia y correlación nos permite entender las manifestaciones clínicas asociadas (14,34).

#### *1.2.2.- La corteza prefrontal en la ansiedad*

Es la parte anterior de los lóbulos frontales del cerebro y se ubica frente a las áreas motora y premotora. El término médico más utilizado para referirse a las funciones desempeñadas por la



corteza prefrontal es «función ejecutiva». Este término hace referencia a la capacidad para establecer distinciones entre pensamientos conflictivos, realizar juicios acerca del bien y del mal, predecir las consecuencias futuras de actividades actuales, trabajar conforme a metas determinadas de antemano, realizar predicciones de resultados, creación de expectativas, y control social (la capacidad para inhibir comportamientos impulsivos que, de no ser suprimidos, podrían desembocar en resultados socialmente inaceptables) (35). Muchos autores han señalado la existencia de una relación entre la corteza prefrontal (CPF) y las características de la personalidad de un individuo (34–37). Aunque se aborda el tema desde perspectivas muy diferentes, un creciente cuerpo de literatura converge en la idea de que existen dos sistemas fundamentales que subyacen al enfoque y a la emoción y motivación relacionadas con la abstinencia, o afectos positivos y negativos (32). Este sistema también genera emociones negativas relacionadas con la abstinencia, como el disgusto, miedo y ansiedad (38). Una variedad de evidencia indica que estos sistemas se implementan en circuitos parcialmente separables, y es a esta evidencia a la que ahora recurrimos. Nuestro enfoque se centrará en dos componentes clave de este circuito: la CPF y la ya mencionada amígdala (35,38).

LA CPF no es una zona homogénea de tejido, sino que se ha diferenciado sobre la base de consideraciones tanto citoarquitectónicas como funcionales. La corteza prefrontal se ha dividido en 3 regiones funcionalmente distintas, que se describen a continuación; dorsolateral, ventromedial y orbitofrontal (35). Además, se detectan diferencias funcionales entre los lados izquierdo y derecho dentro de cada uno de estos sectores. El argumento a favor de la importancia diferencial de los sectores izquierdo y derecho para el procesamiento emocional se hizo primero sistemáticamente en una serie de estudios en pacientes con daño cortical unilateral. Cada uno de estos estudios comparó el estado de ánimo de los pacientes con daño cerebral unilateral izquierdo o derecho y encontró una mayor incidencia de síntomas depresivos después del daño del lado izquierdo. La interpretación general que se ha hecho de estos estudios es que los síntomas depresivos aumentan después del daño de la CPF anterior del lado izquierdo, porque este territorio cerebral participa en un proceso que subyace a ciertas formas de afecto positivo y al dañarse, conduce a déficits en la capacidad de experimentar afecto positivo, una característica distintiva de la depresión (35,36).

### *1.3.- Endocannabinoides y ansiedad*

No hay datos experimentales directos sobre el papel de los endocannabinoides en la ansiedad en humanos. Hasta donde sabemos, ni AEA ni 2-AG se han administrado a seres humanos. Esta es una situación absurda, presumiblemente como resultado de limitaciones regulatorias. En contraste, cuando la insulina se descubrió en la década de 1920, se convirtió en una droga disponible en un año (32). Solo podemos suponer que, debido a que muchos de los sistemas fisiológicos están regulados a través de controles y balances por diversas moléculas endógenas, los endocannabinoides, que afectan la liberación de neurotransmisores, podrían ejercer efectos reguladores sobre la ansiedad, que es una reacción humana normal a una variedad de condiciones estresantes (39,40).

### *AEA y ansiedad*

Una vía indirecta para mejorar los niveles de endocannabinoides es bloquear su hidrólisis enzimática. El grupo de Piomelli y colaboradores informó una clase novedosa de inhibidores potentes, selectivos y sistémicamente activos basados en carbamato de FAAH (31). Los mejores inhibidores de esta serie (URB532 y URB597) tienen propiedades ansiolíticas en ratas en la prueba de laberinto elevado y suprimen las vocalizaciones inducidas por el aislamiento debido a niveles aumentados de AEA en el cerebro. Estos efectos podrían prevenirse mediante el bloqueo del receptor CB1 (41). Estos resultados confirman indirectamente que la AEA tiene propiedades contra la ansiedad. La teoría detrás de este enfoque se basa en el mecanismo de formación y liberación de AEA, que se sabe que tiene lugar cuando y donde sea necesario. Como se mencionó anteriormente, a diferencia de los neurotransmisores clásicos, la AEA no se almacena en vesículas sinápticas, sino que se extrae y se libera en el ciclo sináptico después de la activación neuronal (32). Presumiblemente, sus niveles y los de FAAH, serán los más altos en las áreas cerebrales involucradas en la regulación del estado de ánimo y las emociones. Siguiendo el mismo razonamiento experimental, Moise et al y colaboradores en el año de 2008 confirmaron que URB597 inhibía la actividad de FAAH y aumentaba los niveles de amidas de ácidos grasos adicionales (N-palmitoil etanolamina y N-oleoil etanolamina), pero no de anandamida en sí, en cerebro de hámster (41). Sin embargo, Cippitelli et al y colaboradores informaron una elevación de los niveles de anandamida en ratas con URB597, lo cual generó una disminución de ansiedad asociada con la abstinencia de alcohol (36). El bloqueo del receptor CB1 con rimonabant indujo un comportamiento similar al ansiogénico en el laberinto elevado; URB597 indujo efectos de tipo ansiolítico en este ensayo. URB597 no alteró la derrota social condicionada o el rendimiento en prueba de equilibrio (32,41,42).

### *Receptores CB1 y ansiedad*

El desarrollo de ratones *knock-out* deficientes en receptores CB1 ha proporcionado una excelente herramienta para evaluar las funciones fisiológicas del sistema endocannabinoide y en particular, su posible implicación en la regulación de la ansiedad. Los ratones CB1-*knock-out* mostraron un aumento en la respuesta agresiva medida en la prueba de intrusión residente y una conducta de tipo ansiosa en la caja oscura, así como el aumento de la ansiedad en la prueba del laberinto elevado en cruz (43). Por otro lado, Marsicano y colaboradores no encontraron una respuesta ansiogénica en el laberinto en cruz en sus ratones CB1-*knock-out* (44). Las discrepancias se pueden atribuir a las diferencias en el fondo genético de los ratones mutantes, y también a las diferencias en los niveles de ansiedad iniciales y al estrés dependiente del contexto (44). En particular, los ratones CB1-*knock-out* mostraron exclusivamente un comportamiento ansiogénico en condiciones de alto estrés: valorado con las pruebas de laberinto elevado en cruz y de interacción social en ambiente desconocido (45).

### *2-AG, CB2 y ansiedad*

La mejora de los niveles de 2-AG produce efectos similares. Sciolino y colaboradores han demostrado que la potenciación de la señalización endocannabinoide con JZL184, un inhibidor

de la enzima hidrolizante de 2 AG-monoacilglicerol lipasa (MGL), produce efectos ansiolíticos en condiciones de alta aversión ambiental en ratas (44). Recientemente, dos publicaciones paralelas indicaron que el receptor CB2 también está involucrado en la actividad anti ansiolítica endógena (19). García Gutiérrez y colaboradores informaron que los ratones que sobre expresaban el receptor CB2 en corteza cerebral mostraban comportamientos similares a la ansiedad en campo abierto, la caja oscura y las pruebas de laberinto elevado, lo que indica que una mayor expresión del receptor CB2 modifica la respuesta al estrés en estas pruebas (45). Estos estudios indican el papel crucial del receptor CB2 en la modulación de la ansiedad. Como la activación del receptor CB2 no lleva a una psicoactividad indeseable, estas observaciones pueden ser de importancia clínica significativa y, por lo tanto, el receptor CB2 representa un nuevo objetivo para modular las respuestas similares a la ansiedad. Se sugiere un mecanismo de protección general mediado por el receptor CB2 (7,19). El mecanismo molecular del efecto de los endocannabinoides sobre la ansiedad aún no se ha aclarado del todo, And'ó y colaboradores han confirmado una participación considerable de los receptores CB1 en el efecto de los cannabinoides y endocannabinoides en el flujo de GABA (7). Hofmannetal y colaboradores han descrito una nueva forma aún desconocida de modulación mediada por cannabinoides de la transmisión sináptica, hasta ahora sólo en el giro dentado, informando que la acción de la anandamida bajo ciertas condiciones no está mediada por los receptores CB1, receptores CB2, receptores ganglionares y todavía está presente en los animales *knock-out* de receptor CB1 (17). Sería de interés determinar si esta nueva vía (a través de un receptor aún no determinado) está involucrada en la ansiedad y la depresión.

#### *Endocannabinoides, eje HPA y ansiedad*

El sistema endocannabinoide juega un control de puerta con respecto a la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) hormonal. La señalización endocannabinoide tónica restringe la actividad del eje HPA y en última instancia, regula la respuesta al estrés y restablece la homeostasis (46). Específicamente, los glucocorticoides producidos en respuesta al estrés reclutan endocannabinoides para aumentar la excitabilidad de las neuronas principales en la región preliminar de la corteza prefrontal medial; las neuronas principales inician señales inhibitorias que terminan la activación del eje HP. Sin embargo, después del estrés crónico, la disminución de la señalización endocannabinoide está implicada en la sobrecarga de la señalización hormonal, que puede provocar ansiedad y depresión en los humanos (46,47).

#### *1.4.- Pruebas para valorar la ansiedad en modelos murinos*

Los modelos animales no humanos han sido ampliamente estudiados para explicar diversas patologías, en especial el trastorno de ansiedad, ya que cuentan con algunas ventajas, como tener control sobre el ambiente en que están los sujetos y de la historia conductual. Se puede realizar una gran cantidad de manipulaciones experimentales que permiten evaluar la eficacia terapéutica de diferentes tratamientos y de manera que se puedan validar los modelos (Tabla 1) (48). La ansiedad ha sido estudiada extensamente en modelos animales y existen más de treinta utilizados (48). Algunos recurren a respuestas condicionadas y otros utilizan respuestas más naturales de la especie, por lo cual son considerados modelos etológicos o de respuestas no

condicionadas (48,49). Los modelos de respuesta condicionada se basan en la capacidad de responder ante un estímulo con la respuesta específica a otro estímulo (49). Generalmente se presenta un estímulo aversivo, comúnmente un choque eléctrico leve aplicado al animal, quien debe emitir una respuesta determinada. Estos modelos permiten un control bastante preciso de los niveles de conducta basal por parte del experimentador, pero casi permanentemente requieren que los sujetos de experimentación sean entrenados y se incluyan en el diseño experimental varios grupos de sujetos control para descartar los efectos no específicos del tratamiento sobre aspectos como el aprendizaje, memoria, apetito y funciones motoras y perceptuales. Algunas limitaciones en cuanto a su uso se conocen de estos modelos. Al exponer los sujetos a estímulos no habituales, se debe hacer un entrenamiento previo. Además, muchas de las versiones del modelo de condicionamiento están condicionadas según el grupo que los usa, y en cada uno de ellos hay modificaciones en los parámetros de la prueba. Por tanto, no solo encontramos una gran cantidad de pruebas animales en la biografía, sino que además, éstas difieren por sus dimensiones múltiples y a veces mal comprendidas (45,49).

Existen dos tipos dentro de este grupo de modelos, los basados en el condicionamiento pavloviano o asociativo, que comprende la denominada respuesta emocional condicionada (REC) y la supresión condicionada de presionar palanca y los basados en el condicionamiento operante o instrumental, el cual implica un conflicto aproximación-evitación, denominados modelos de conflicto (49). Por otra parte, los modelos de respuesta no condicionada (Tabla 1) buscan medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos. Algunos evalúan el miedo ante situaciones novedosas, en donde el sujeto es expuesto a un espacio abierto, alto o luces brillantes. En estos modelos se evita hacer privación de agua o comida, así como la administración de choques eléctricos y no se requiere de periodos largos de entrenamiento. Se menciona que estos modelos poseen ciertas ventajas para su utilización: tienen cierta validez ecológica, al ser pruebas rápidas y sencillas; son económicos, al no implicar equipos costosos y no se requiere de largos procedimientos de formación que impliquen la privación de alimento/agua, y/o descargas eléctricas (45,48).

| Modelos de respuesta incondicionada             | Modelos de respuesta condicionada                      |
|---|--|
| Campo abierto                                   | Respuesta emocional condicionada                       |
| Tabla de agujeros                               | Supresión condicionada                                 |
| Caja de dos compartimientos , blanco - negro    | Evitación pasiva /activa                               |
| Laberinto elevado en cruz                       | Prueba de cuatro platos                                |
| Interacción social                              | Test de conflicto de Geller – Seifter y el de Vogel    |
| Supresión de la ingesta inducida por la novedad | Condicionamiento de vocalizaciones ultrasónicas        |
| Contraste Negativo                              | Estimulación eléctrica cerebral                        |
| Conducta defensiva de enterramiento             | Modelo de Theibot de retirada de la señal de seguridad |
| Holeboard                                       | Efecto de reforzamiento parcial sobre la extinción     |
|   | Potenciación de la respuesta de sobresalto             |

**Tabla 1.-** Compendio de Pruebas utilizadas para evaluar ansiedad (45).

### *Laberinto elevado en cruz*

Es una de las pruebas más utilizadas en investigación preclínica sobre ansiedad desde los modelos de respuesta no condicionada (50). Sus inicios están en las investigaciones de Montgomery, sobre conducta exploratoria en callejones abiertos y cerrados, que buscaron determinar si la estimulación novedosa evoca miedo y exploración. Las ratas Wistar, mostraron que, en callejones abiertos, la evocación de miedo es mayor. De igual forma, evidenciaron que los estímulos novedosos provocan comportamientos de evitación, aunque este disminuye con el tiempo (50). Posteriormente, Handley y Mithani, en el año de 1984, hicieron un laberinto elevado con forma de X, el cual tenía dos brazos abiertos y dos brazos opuestos con paredes y cerrados al final, que se mantenía elevado del piso, el cual actualmente se conoce como Laberinto elevado en cruz y en inglés, *elevated plus-maze* (EPM). Este aparato está compuesto por dos brazos abiertos, dos brazos cerrados y un área central, que se encuentra elevado por encima del suelo (50). El sujeto es colocado en el centro del aparato y se le permite la exploración por un periodo de tiempo determinado (48,50). Las primeras conductas utilizadas para los índices de ansiedad han sido de naturaleza espacio-temporal y son utilizadas como medida de actividad general, entre ellas el número de entradas en cada tipo de brazos, expresado en porcentaje o proporción de entradas en todos los brazos, y el tiempo dedicado a los brazos, expresados en porcentaje o relación de tiempo en el brazo total (50). Se consideran determinadores de ansiedad la menor entrada en los brazos abiertos, de manera que hay mayor ansiedad cuando hay menor exploración en estos brazos, debido al conflicto de permanecer en los brazos más protegidos, aunque con pocos estímulos a ser investigados (cerrados), que explorar los brazos con más cantidad de estímulos, pero potencialmente amenazadores (abiertos) (50).

En los últimos años se han tenido en cuenta diferentes medidas que se utilizan en la mayoría de los instrumentos de modelos de respuesta incondicionada, por lo cual también se puede tomar en un procedimiento de EPM. Las primeras de ellas hacen referencia a los repertorios defensivos en roedores, en donde se tiene en cuenta el congelamiento, defecación, auto-aseo y postura erguida. Con la utilización de los videos y sistemas técnicos en EPM, se han determinados otras conductas como estiramiento del cuerpo, sumersión de la cabeza, estiramiento con soporte a la pared y retornar al brazo cerrado. También se han incluido las distribuciones espaciales de ciertos actos y postura (como sumergir la cabeza), que parecían ser dependientes del contacto con las paredes del laberinto, llevando a diferenciar los “protegidos” (contacto con la pared de los brazos cerrados o de la plataforma central) y los “no protegidos” (sin contacto con la pared; es decir, brazos abiertos) (43,50). Con el tiempo se han incluido elementos adicionales del comportamiento, como olfateo e inspección con espalda plana, entre otras. La validación de este instrumento se ha hecho en diferentes especies, como ratas, ratones, cerdos de guinea, ratones silvestres y hámsteres sirios (43,45).

### *Caja oscura*

La prueba de transición luz/oscuridad fue desarrollada originalmente por Crawley y colaboradores. Hay dos diferencias entre su versión original y las actuales. Primero, la cámara de luz es más grande que la cámara oscura en la versión original, mientras que el tamaño de las dos cámaras es el mismo en versiones actuales. Segundo, en la versión original, la cámara de luz no tenía techo y las paredes de la cámara de luz eran transparentes, mientras que actualmente se está utilizando plástico blanco opaco para el techo y las paredes de la cámara de luz. Estas diferencias, es decir, el tamaño y la apertura de la cámara de luz, permiten una mejor valoración de la prueba (51). El aparato consiste en una cámara oscura y una cámara brillantemente iluminada. Una abertura restringida, de 3 cm de alto por 5 cm de ancho, conecta las dos cámaras. Los ratones pueden moverse libremente entre las dos cámaras. El número de entradas en la cámara brillante y la duración del tiempo que se pasa allí se utilizan como índices de ansiedad en el espacio brillante en ratones. Aunque la prueba de transición luz/oscuridad y el laberinto elevado en cruz se usan para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad, los resultados no siempre son consistentes. Por ejemplo, los ratones *knock-out* específicos para calcineurina en el cerebro anterior pasan una cantidad reducida de tiempo en la cámara de luz en la prueba de transición luz/oscuridad, pero una mayor cantidad de tiempo en los brazos abiertos en el laberinto elevado (51,52).

### *1.5.- Edulcorantes y alimentación*

Los edulcorantes son sustancias naturales o artificiales que otorgan la cualidad de “dulce” a un alimento o producto. Son una clase importante de los sustitutos del azúcar y debido a su composición pueden brindar dulzor, en ocasiones mayor al otorgado por la sacarosa o azúcar de mesa; debido a ésta propiedad, se requiere una menor cantidad de edulcorante para lograr el dulzor deseado y el aporte energético es a menudo insignificante (53). La administración de alimentos y fármacos (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés, FDA) de Estados

Unidos se encarga de regular el uso de los edulcorantes artificiales como aditivos alimentarios. La mayoría de los sustitutos del azúcar aprobados para uso alimentario son compuestos sintetizados artificialmente; sin embargo, se sabe de la existencia de algunos sustitutos naturales del azúcar (sorbitol y xilitol) (53).

Los edulcorantes bajos en calorías y su efecto en el control de peso han sido un tema de controversia, debido a que en algunos estudios se ha observado que el uso de estos productos dificulta la pérdida de peso al promover una mayor ingestión de alimentos; no obstante, en otros estudios se encontró que no implica aumento en el apetito. Es por ello que el efecto del consumo de edulcorantes sobre la conducta alimentaria y el equilibrio energético aún no es claro (54).

Los edulcorantes se clasifican básicamente como naturales y artificiales. Los edulcorantes naturales son extraídos a partir de productos naturales, sin ninguna modificación química. Entre ellos se encuentra la miel de abeja, miel de maple, glucósidos de esteviol y sacarosa. Por otro lado, los edulcorantes artificiales se derivan de una síntesis química de compuestos orgánicos que pueden o no ser encontrados en la naturaleza, tal es el caso del acesulfame, aspartame, neotame, sacarina y sucralosa (53). Se pueden también clasificar en calóricos o nutritivos, con un aporte promedio de 4 kcal por gramo (sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa y maltosa) y en nutritivos o no nutritivos, que aportan menos de 1 kilocaloría por gramo (acesulfame K, sucralosa, glucósidos de esteviol, sacarina, ciclamato, neotame, aspartame y taumatina) (53). A continuación, se presenta la clasificación acorde al aporte energético de algunos de estos compuestos, ya que permite una mejor comprensión en cuanto a sus repercusiones metabólicas.

#### *Edulcorantes nutritivos*

##### *Sacarosa*

La sacarosa es un disacárido obtenido de la caña, formado por los monosacáridos glucosa y fructosa, unidos por un enlace glicosídico entre el átomo de carbono 1 de la unidad de glucosa y el átomo de carbono 2 de la unidad de fructosa, con una fórmula molecular  $C_{12}H_{22}O_{11}$  y un peso molecular de 342.30 g/mol (53). Metabólicamente hablando, la sacarosa aporta 4 kilocalorías por gramo, al igual que otros azúcares, como la fructuosa y la glucosa. Sin embargo, algunos azúcares son más dulces que otros, por lo que no es necesario añadir mucho para conseguir el mismo nivel de dulzor (53).

##### *Fructosa*

Uno de los principales tipos de azúcares que se encuentran en frutas y derivado naturales. Una diferencia importante con la sacarosa, es que la fructosa tiende ser dos veces más dulce que la sacarosa. Esto significa que menos fructosa se puede utilizar para lograr el mismo nivel de dulzor. A diferencia del azúcar de mesa o sacarosa, la fructosa no causa aumento rápido en los niveles de glucosa en la sangre, lo que significa que tiene una carga glucémica baja. Sin embargo, su consumo en concentraciones elevadas se relaciona con la acumulación de ácido úrico en el

organismo (55). El índice glucémico (carga glucémica por gramo de hidratos de carbono) es una medida de cómo los carbohidratos afectan a las concentraciones de glucosa en sangre (55).

### *Edulcorantes no nutritivos*

Los edulcorantes no nutritivos aparecen como una respuesta a la demanda de amortiguar las condiciones negativas de salud asociadas al consumo excesivo de azúcares. Se sabe que son de 30 a 13,000 veces más dulces en gusto que su homólogo natural sacarosa y no aportan energía de forma directa. El consumo de dicha alternativa alimentaria ha aumentado significativamente desde 1999, pasando de 6.1% a 12.5% en niños y de 18.7% a 24.1% en adultos. Los edulcorantes artificiales emplean compuestos que poseen altas intensidades de dulzura, son usados en alimentos para limitar la ingestión de energía o prevenir caries dentales (54).

### *Glucósidos de esteviol*

Es una planta subtropical, comprende al menos 110 especies. Las diferentes especies de *Stevia* contienen varios compuestos potenciales edulcorantes, siendo *S. rebaudiana* la más dulce de todas. Una variedad de términos se ha utilizado para referirse al agente edulcorante extraído de esta planta, incluyendo glucósidos de esteviol, esteviósido, y glicósidos de esteviol (56). La *Stevia rebaudiana* como edulcorante se utiliza en muchas partes de América Central y América del Sur. Esta planta se ha utilizado en varias zonas del mundo, como Brasil y Paraguay, como una alternativa para el control natural para la diabetes y obesidad (56). Los glucósidos de esteviol son un ingrediente alimentario aprobado y se vende en los Estados Unidos como un "suplemento dietético", de acuerdo con lo dispuesto en la Ley de Salud y Educación de los Suplementos Dietéticos, que fue aprobada en 1994. Varios informes en animales y humanos indican que la seguridad de esta hierba no se ha determinado todavía por completo. Los glucósidos de esteviol tiene una toxicidad aguda muy baja y no hay reacciones alérgicas descritas (57).

#### *1.5.1.- Participación de los edulcorantes en la conducta alimentaria*

El efecto del consumo de edulcorantes sobre la conducta alimentaria y el equilibrio energético se ha evaluado en una variedad de modelos animales y también en sujetos humanos; sin embargo, el consenso del beneficio o perjuicio relacionado al consumo de estos productos aun no es claro (55). En modelos murinos, la suplementación con sacarina aumenta el apetito y el peso a expensas del tejido adiposo, en comparación con un grupo de bajo consumo de glucosa. Se reportó que la suplementación con aspartame puede beneficiar el aumento de peso, sin asociarse al consumo de alimentos (58). En contraste, los resultados en estudios humanos arrojan una serie de discrepancias. La suplementación con glucósidos de esteviol genera un mayor consumo energético durante el día, en comparación con el consumo de sacarosa (56). Sin embargo, en un estudio con grupos suplementados con sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol, no se encontraron diferencias en los niveles de saciedad y consumo energético. La mayoría de los estudios publicados sobre los edulcorantes artificiales son estudios a corto plazo, que duran desde unas pocas horas hasta 1-2 días (54). Estudios a largo plazo encontraron que la



ingestión de edulcorantes artificiales disminuye el peso corporal en comparación con el consumo de sacarosa. Un estudio que comparó los efectos del consumo de sacarosa y edulcorantes artificiales durante 10 semanas encontró que el grupo consumidor de sacarosa aumento la masa corporal y las cifras de tensión arterial, con diferencia significativa del grupo de edulcorantes artificiales, donde no se observaron estos efectos (59). Por otro lado, debido la epidemia de enfermedades cardiovasculares y el aumento de tasas de obesidad e hipertensión, diversos estudios suponen que la ingestión excesiva de fructosa juega un papel crítico en la epidemia en estas enfermedades (58). A partir de observaciones experimentales en modelos animales y clínicos en humanos, se ha considerado al hipotálamo como una estructura esencial en el control del balance energético en el SNC. Del mismo modo, otras regiones cerebrales, como la amígdala y corteza prefrontal, se han implicado en la generación de alteraciones en la alimentación y el almacenamiento de energía. Dichas regiones centrales reciben señales periféricas que informan sobre el estado energético corporal, las cuales pueden efectuar su acción a través de la vía neuronal o por vía humoral y que pueden actuar a nivel de diferentes sistemas, entre ellos el sistema endocanabinoide, como circuito de recompensa (24,26,59).

#### *1.6.- Correlación entre la regulación energética metabólica y el sistema endocanabinoide.*

A principios de la década de 1960, el THC se identificó como el principal ingrediente activo responsable de los efectos psicotrópicos de la marihuana (7). Aunque las propiedades inductoras del apetito del cannabis se conocen desde hace siglos, no fue hasta hace poco que se demostraron claramente las propiedades orexigénicas de su principal compuesto psicoactivo, THC. Cada vez más durante los últimos años, se ha acumulado un cuerpo sustancial de evidencia que implica al SEC en la regulación del apetito, el comportamiento alimentario y peso corporal (60). Además, se ha propuesto que el papel funcional principal de los endocannabinoides mediante acciones en receptores CB1 es reorientar el balance energético hacia el almacenamiento de energía, lo que en los humanos significa principalmente aumentar la producción y acumulación de lípidos (61). El SEC está estratégicamente posicionado para influir virtualmente en cada punto clave de la red regulatoria que controla la homeostasis energética. En el cerebro, el SEC, dentro de sus muchas funciones, controla la ingestión de alimentos principalmente a dos niveles funcionales, es decir, el hipotálamo y el sistema límbico (24,62). El SEC hipotalámico modula la alimentación disminuyendo las señales de saciedad y mejorando las señales orexigénicas. Además, a través de las interacciones con las vías mesolímbicas involucradas en los mecanismos de recompensa, los endocannabinoides aumentan la motivación de comer, posiblemente reforzando el incentivo o el valor hedónico de los alimentos (22). Para discriminar entre la ingestión de alimentos (ingestión de alimentos libres) y el refuerzo de los alimentos (motivación para los alimentos), se ha utilizado el programa de proporción progresiva de la metodología de refuerzo. Los resultados han revelado que THC aumenta el esfuerzo que un animal ejercerá para obtener alimentos, mientras que el antagonista de CB1 (rimonabant) reduce este esfuerzo (60). Estos estudios proporcionan una caracterización más clara de que el refuerzo de los alimentos puede ser un mecanismo de comportamiento clave alterado por los fármacos cannabinoides (60).

El SEC no solo modula la ingestión de alimentos sino también el gasto de energía. Los experimentos que usan el paradigma de alimentación de pares, en el que los animales experimentales y de control consumen la misma cantidad de alimento, normalmente utilizados para distinguir entre los efectos dependientes e independientes de la ingestión de alimentos, han demostrado que los ratones *knock-out* CB1 tienen un mayor gasto energético y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta a pesar de que su ingestión calórica general es la misma que la de los compañeros de camada naturales (24,63). Además, los ratones obesos inducidos por dieta tratados con rimonabant mostraron una reducción transitoria en la ingestión de alimentos, pero una reducción sostenida en el peso corporal, lo que sugiere un mayor gasto de energía (60).

Los estudios con ratones *knock-out* CB1 también han respaldado el papel del SEC en la regulación del metabolismo del apetito y los lípidos. Cuando se mantuvieron con la dieta estándar, los ratones *knock-out* CB1 fueron ligeramente hipofágicos y su peso corporal y adiposidad fueron inferiores a los de los ratones de tipo salvaje (4). Después de la introducción de una dieta alta en grasas, los animales *knock-out* CB1 no mostraron hipofagia, no se volvieron obesos y no desarrollaron la resistencia a la insulina que normalmente se produce en este tipo de dieta (4). Los estudios con ratones *knock-out* CB1 también ofrecieron evidencia temprana con respecto a los posibles efectos adversos de la señalización reducida del receptor CB1: los ratones que carecían de CB1 mostraron un comportamiento similar al ansiogénico, comportamiento depresivo, anhedonia, mayor agresión y tasas más altas de epilepsia, pérdida neuronal relacionada con la edad y mortalidad prematura (64). Además del papel del SEC en el cerebro, el SEC periférico también regula el balance energético, en particular por los mecanismos lipogénicos periféricos y la modulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos (24,64).

La evidencia sugiere que la activación de receptores CB1 en estos tejidos periféricos promueve la lipogénesis, el almacenamiento de lípidos, la secreción de insulina, la secreción de glucagón y la modulación de adiponectina (63). Estos hallazgos confirman un papel destacado de los receptores CB1 periféricos en la modulación del metabolismo. Tomados en conjunto, estos hallazgos indican que los receptores CB1 centrales y periféricos actúan de forma coordinada para regular la homeostasis energética. Un posible vínculo entre las señales centrales y periféricas puede centrarse en la leptina, cuya señalización depende de un SEC cerebral, aunque la insulina también constituye un vínculo importante entre los tejidos periféricos e hipotálamo (24,25,65).

### 1.7.- *Edulcorantes y ansiedad*

Actualmente se sabe que el consumo de dietas hipercalóricas generan aumentos en el nivel de ansiedad, esto a través del estudio de la llamada “dieta de cafetería”, pero considerando que se incluyen todos los grupos alimentarios con una carga específica en los carbohidratos. Estudios recientes realizados en modelos murinos indican que el consumo de edulcorantes con muestran diferencias significativas en los grupos de estudio, pero si se encontró aumento en patrones de exploración y miedo, con lo cual nos podría estar indicando el preámbulo del inicio de ansiedad, algo en que los autores concluyen es que es necesario seguir analizando éstas variables ya que la información con la que se cuenta en éste aspecto es muy poca y en específico con las dosis y los

efectos en diferentes aspectos de la “conducta” de los elemento en estudio, ya que se ha encontrado que ratas wistar administradas con Sucralosa en elevadas dosis, presentan desarrollo de tumores en vejiga por destacar alguno de los hallazgos (47,66).

## 2.- Planteamiento del Problema

La ansiedad es una respuesta adaptativa de un sistema de alarma que prepara a un organismo a contender contra un peligro potencial. Bajo condiciones normales, los síntomas de la ansiedad son imperceptibles, pero cuando es intensa, como en una situación de apremio, el individuo experimenta una sensación de inquietud y aprehensión que se acompaña de un aumento en la vigilancia del entorno, de dificultad para concentrarse, de un aumento de la tensión muscular y de numerosos síntomas autonómicos, entre los que destacan las palpitaciones, la sudoración, la falta de aliento o la presencia de molestias digestivas. En ocasiones, los pacientes con ansiedad de este tipo sufren además síntomas de agorafobia, como el temor a estar solo fuera de casa, a formarse en una “cola”, a mezclarse con la gente o incluso a viajar en automóvil.

Acorde a la OMS, entre 1990 y 2013, el número de personas con ansiedad ha aumentado en un 50%, de 416 millones a 615 millones. Cerca de un 10% de la población mundial es afectada, y los trastornos mentales representan un 30% de la carga mundial de enfermedad no mortales. Estos datos han incentivado la búsqueda de nuevas terapias, con el objetivo de permitir distintos abordajes y mejores manejos, abarcando desde aspectos moleculares hasta factores “contextuales”, entre ellos, modificaciones a la dieta. Por ejemplo, se ha encontrado que el consumo de la llamada “Dieta de cafetería” (refiriéndose a dietas hipercalóricas) se correlaciona con la ansiedad, aunque no se han determinado a fondo los mecanismos relacionados con éste efecto. Por otro lado, una de las propuestas ampliamente conocidas y distribuidas para promover modificaciones dietarias potencialmente sustentables son los edulcorantes no nutritivos, los cuales se han presentado al mercado como una alternativa a la azúcar de mesa, brindando sabor, sin la preocupación calórica que a ésta le atañe. A pesar de ser considerados como seguros para consumo humano, existe evidencia de que pueden interferir en procesos metabólicos en organismos vivos, que se relacionan con alteraciones del metabolismo energético *in vivo*.

El sistema endocanabinoide (SEC) ha cobrado gran importancia debido a su relación estrecha con la homeostasis y funcionamiento del metabolismo energético, a través de sus efectos en diversos tejidos, entre ellos el sistema nervioso central y en específico, en la corteza prefrontal (CPF), en la que se da una conexión y relación importante con el sistema límbico, siendo capaz de inhibir transitoriamente la actividad cortical y viceversa, ya que ante una situación de miedo intenso, se puede ver impedido el razonamiento habitual, siendo una de las áreas más importantes en el procesamiento de la emoción y la ansiedad. Diversos estudios han demostrado que las modificaciones nutricionales (por ejemplo, las dietas hipercalóricas) aumentan la expresión de receptores de cannabinoides y pueden afectar el funcionamiento del sistema, aunque su relación con el uso de edulcorantes no nutritivos no ha sido explorada aún.

Dado que los edulcorantes no nutritivos pueden modificar la disponibilidad energética en el organismo y que el sistema endocanabinoide se relaciona directamente con el metabolismo energético, podría existir la posibilidad de que un cambio en dicho sistema, derivado del consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos, afectando el funcionamiento cortical y el

comportamiento de un organismo en respuesta a modificaciones de la dieta, por lo que surge la siguiente pregunta de investigación:

**Pregunta investigación:**

¿Existe relación entre el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos (glucósidos de esteviol), en la expresión del receptor CB1 en tejido encefálico y el comportamiento de ansiedad en ratones?

### 3.- Hipótesis

*Hipótesis Alterna:*

El consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos altera la expresión del receptor CB1 en tejido encefálico de ratones, afectando su nivel de ansiedad.

*Hipótesis Nula:*

El consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos no altera la expresión del receptor CB1 en tejido encefálico de ratones, y no afecta su nivel de ansiedad.

## 4.- Justificación

El uso de edulcorantes no nutritivos y su difusión como sustancias inocuas ha aumentado conforme a las necesidades de la población, debido a las carencias políticas adecuadas en salud y a la demanda poblacional de una respuesta ante las enfermedades metabólicas y crónicas degenerativas a las cuales nos enfrentamos actualmente, lo que los ha convertido en una “alternativa saludable”, incorporándolos a la dieta diaria e incluso sustituyendo a los azúcares convencionales. Sin embargo, estudios recientes relacionan el uso de estos compuestos con alteraciones metabólicas importantes, como el desarrollo de resistencia a la insulina o la acumulación inadecuada de grasa corporal, por lo que su uso debe ser estudiado más ampliamente.

Asimismo, entre las enfermedades actuales, las enfermedades de la mente están proliferando de forma importante, debido entre muchos factores al estilo de vida en el cual nos encontramos inmersos, un nivel constante de presión y alta exigencia, lo cual ha condicionado y se han reflejado en la elevación de los altos niveles de ansiedad, que tienen repercusión tanto a nivel biológico como social, mermando claramente la calidad de vida del individuo.

El papel de la dieta en el tratamiento de patologías psiquiátricas es un área que no se ha investigado a fondo, a pesar de la evidencia que demuestra su potencial en la modulación del comportamiento y emociones, tanto en modelos animales como en humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que las dietas hipercalóricas favorecen el desarrollo de ansiedad. Sin embargo, el posible efecto del consumo frecuente de aditivos alimentarios, como los edulcorantes no nutritivos, sobre el comportamiento emocional no ha sido explorado, a pesar de que estos compuestos son ampliamente empleados en todo el mundo.

Por otra parte, el sistema de endocannabinoides ha venido a posicionarse como una de las dianas de tratamiento y un gran nicho para el desarrollo de diferentes alternativas terapéuticas en diversas patologías, como lo es el cáncer y el sobrepeso. Actualmente, se sabe que este sistema participa en funciones cognitivas y de regulación del comportamiento, además de que su funcionamiento puede ser regulado por medio de modificaciones nutricionales, como el uso de dietas hipercalóricas. Sin embargo, el efecto de los edulcorantes no nutritivos sobre el funcionamiento de este sistema es desconocido, por lo que resulta enriquecedor encontrar la posible relación entre el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos, la expresión de receptor CB1 del SEC y ansiedad, ya que esto puede tener implicaciones importantes para la salud de la población que emplea estos compuestos de forma regular.

## 5.- Objetivos

### *General*

Determinar si el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos altera la expresión de receptor CB-1 en tejido encefálico y el nivel de ansiedad en ratones.

### *Específicos*

- Determinar si la suplementación diaria con edulcorantes no nutritivos para uso humano induce cambios en la expresión del receptor CB-1 en tejido encefálico de los ratones BALB/C, mediante cortes histológicos de cerebro por microscopia de fluorescencia.
- Evaluar el nivel de ansiedad en los ratones suplementados por medio de las pruebas de laberinto elevado en cruz y caja oscura.
- Identificar si existe una relación entre la expresión de los receptores CB-1 en tejido encefálico y el nivel de ansiedad observado en los ratones bajo estudio.



## 6.- Operacionalización de Variables

| <u>VARIABLE</u>  | <u>DEFINICIÓN CONCEPTUAL</u>   | <u>DEFINICIÓN OPERACIONAL</u>   | <u>TIPO DE VARIABLE</u>        | <u>ESCALA DE MEDICIÓN</u>  | <u>ANÁLISIS</u>                   |
|--|--|---|--------------------------------|--|-----------------------------------|
| <u>Consumo de agua y alimento</u>                        | Cantidad de agua y alimento ingerida por el animal a lo largo de 24 horas.   | Promedio de la cantidad de alimento y agua consumido por los sujetos de estudio, registrada diariamente. Determinada por medio de la diferencia en la masa de alimento y volumen de bebida inicialmente suplementada y los remanentes al cabo de 24 horas                     | Cuantitativa Continua.         | Masa de alimento en Gramos<br>Volumen de agua en Mililitros          | Prueba no paramétrica de Friedman |
| <u>Consumo de Edulcorante</u>                            | Consumo de sustancias, naturales o artificiales, que dotan de sabor "dulce" a un alimento o producto.  | Cantidad de solución con edulcorante consumida a libre demanda, diariamente, durante un periodo de 6 semanas.<br><br>Soluciones empleadas:<br><br>-100 mL de Sacarosa al 10%. Falta el no nutritivo<br><br>-100 mL de agua.<br><br>-100 mL de glucósido de esteviol al 0.02%. | Cuantitativa Continua.         | Volumen de edulcorante consumidos diariamente, en mililitros         | Prueba no paramétrica de Friedman |
| <u>Ansiedad</u>  | Respuesta de anticipación involuntaria del organismo frente a estímulos que pueden ser externos o internos, tales como pensamientos, ideas, imágenes, etc. las cuales son percibidas por el individuo como amenazantes y/o peligrosos y que se acompañan de síntomas somáticos de tensión. | Determinación del estado de ansiedad del animal por medio de la prueba de laberinto elevado en cruz y caja oscura, que son pruebas comúnmente utilizadas para evaluar los niveles de ansiedad en roedores   | Cuantitativa Discreta/Continua | Permanencia en minutos y número de entradas a cada segmento.         | Prueba no paramétrica de Friedman |
| <u>Expresión del Receptores CB1 en tejido encefálico</u> | Principal receptor del sistema endocanabinoide, participe en la regulación del metabolismo energético, apetito, dolor sueño y ansiedad. Está presente sistema nervioso central, páncreas, hígado, musculo, hueso, tejido adiposo, gastrointestinal y vascular.                             | Determinación de la intensidad de fluorescencia para el marcador CB1 en tejido encefálico, analizada por inmunofluorescencia.   | Cuantitativa continua          | Valores arbitrarios para la intensidad media de fluorescencia (IMF). | Prueba no paramétrica de Friedman |

## 7.- METODOLOGÍA

### *Tipo de estudio:*

Experimental, prospectivo, comparativo, longitudinal.

### *Universo de Trabajo:*

Ratones de la cepa BALB/c, hembras, de 8 semanas de edad.

### *Tamaño de la muestra:*

Se formaron 3 grupos de 4 ratones cada uno, de 8 semanas de vida para grupo suplementado (sacarosa, glucósidos de esteviol, respectivamente) y un grupo control (sin suplementación).

### *Criterios de inclusión:*

Ratones hembras de la cepa BALB/c, con 8 semanas de edad y con un peso mínimo de 18 gramos.

### *Criterios de eliminación:*

Ratones que enfermaron o murieron durante el estudio. Ratones que no tuvieron el peso mínimo necesario, ratones que tuvieron respuestas inadecuadas al tratamiento o que de alguna forma fueran incapaces de realizar las pruebas necesarias.

### *Procedimientos*

-Etapa 1.- Nacimiento, adaptación y destete de los ratones (8 semanas)

Los ratones de la cepa BALB/C se criaron en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo condiciones de temperatura regulada próxima a los 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Se siguieron las especificaciones de cuidado, manipulación y producción de animales de laboratorio establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO- 1999. El tiempo de destete fue a las tres semanas de edad. Los ratones contaron con agua purificada a libre demanda durante las primeras ocho semanas de vida. La dieta fue completa en contenido de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales, con alimento *rodent diet* de Purina.

-Etapa 2.- Establecimiento de grupos experimentales

Una vez completado el tiempo necesario en cuanto a desarrollo y crecimiento, se procedió a la creación de grupos, dividiéndolo en 3, constando de 4 ratones hembra, respectivamente en cada grupo (tabla 3).

-Etapa 3.- Suplementación con edulcorantes (6 semanas)

Durante un lapso de 6 semanas, los ratones contaron con alimento y agua purificada a libre demanda. La dieta fue completa en contenido de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (*rodent diet* de Purina); los cuales bebieron en el agua consumida a diario el

edulcorante asignado, durante 6 semanas, con excepción del grupo control. Se evaluó diariamente el consumo de agua y alimento ingerido por los ratones.

| Grupo  | Número de ratones |
|--|-------------------|
| Grupo control (100 mL de agua purificada)  | 4 hembras.        |
| Grupo sacarosa (10%) (10 gr de azúcar en 100 mL de agua purificada)                            | 4 hembras         |
| Grupo glucósidos de esteviol (0.025%) (presentación comercial 1g en 100 mL de agua purificada) | 4 hembras         |

*Tabla 3. Grupos experimentales y suplementación con edulcorantes*

-Etapa 4.- Valoración de la ansiedad por medio de la prueba laberinto elevado en cruz y de caja oscura. (6 semanas)

Se aplicaron las pruebas del laberinto elevado en cruz y de caja oscura, para identificar el comportamiento relacionado con ansiedad.

#### A) Prueba de laberinto elevado en cruz

- Es una de las pruebas más utilizadas en investigación preclínica sobre ansiedad desde los modelos de respuesta incondicionada. Sus inicios, están en las investigaciones de Montgomery, sobre conducta exploratorio en callejones abiertos y cerrados. Se consideran como indicadores de ansiedad la menor entrada en los brazos abiertos, de manera que hay mayor ansiedad cuando hay menor tiempo de exploración en estos brazos, debido al conflicto de permanecer en los brazos más protegidos, aunque con pocos estímulos a ser investigados (cerrados) que explorar los brazos con más cantidad de estímulos, pero potencialmente amenazadores (abiertos) (43).

#### B) Prueba de la caja oscura

- El aparato consiste en una cámara oscura y una cámara brillantemente iluminada. Una abertura restringida, de 3 cm de alto por 5 cm de ancho, conecta las dos cámaras. Los ratones pueden moverse libremente entre las dos cámaras. El número de entradas en la cámara brillante y la duración del tiempo que se pasa allí se utilizan como índices de ansiedad en el espacio brillante en ratones. (52)

Se realizó la prueba el de laberinto elevado en cruz y caja oscura, en la semana 1, semana 4, semana 6 y en la semana 8 del experimento.

- *Caja oscura:*

- El aparato utilizado para la prueba de transición luz / oscuridad consistió en una jaula (21x42x25 cm) dividida en dos secciones de igual tamaño por una partición con puerta (Ohara & Co., Tokio).
- Los ratones se alojaron de tres a cuatro por jaula en una habitación con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 7:00 am) con acceso libre a la comida y el agua. Las pruebas de comportamiento se realizaron entre las 9:00 a.m. y las 6:00 p.m. Todas las jaulas que contienen ratones se transfirieron a la sala de pruebas 30 minutos antes de que comenzara el primer ensayo.
- Una cámara está iluminada de manera brillante, mientras que la otra cámara es oscura. Los ratones se colocaron en el lado oscuro y la puerta se abrió mecánicamente 3 segundos después de colocado el ratón. La puerta se utilizó para que los ratones no entraran en la cámara de luz inmediatamente después de la liberación con su motivación para escapar del experimentador, ya que la latencia para entrar en la cámara de luz puede servir como un índice de comportamiento similar a la ansiedad.
- Se permitió a los ratones moverse libremente entre las dos cámaras con la puerta abierta durante 10 min.
- El número total de transiciones, el tiempo empleado en cada cámara y la latencia para ingresar a la cámara de luz fueron registrados por la cámara de estudio.
- Después de cada prueba, todas las cámaras se limpiaron para evitar un sesgo basado en señales olfativas.

- *Laberinto elevado en cruz:*

- El aparato utilizado para la prueba del laberinto elevado en cruz, comprendió dos brazos abiertos (25 x 5 x 0,5 cm) uno frente al otro y perpendiculares a dos brazos cerrados (25 x 5 x 16 cm) con una plataforma central (5 x 5 x 0,5 cm). Los brazos abiertos no tenían pared, mientras que los brazos cerrados tenían una pared alta (16 cm) para encerrar el brazo. Todo el aparato está a 50 cm por encima del piso (Ohara & Co., Tokio) y se colocaron en un tanque circular vacío (100 cm de diámetro, 35 cm de altura; utilizado normalmente para la tarea del laberinto de agua de Morris) para proteger a los ratones que cayeran o intentaran escapar durante el experimento. El aparato fue hecho de materiales plásticos. La plataforma y las paredes fueron blancas.
- Los ratones se alojaron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (las luces se encienden a las 7:00 AM), como se describió anteriormente. Las pruebas de comportamiento se realizan entre las 9:00 AM y las 6:00 PM. Todos los ratones experimentales se transfirieron a la sala de pruebas 30 minutos antes de comenzar la primera prueba, para acostumbrarse a la condición de la sala de pruebas.

- La sala de pruebas estaba aislada y el nivel de iluminación fue constante. Un ratón se colocó en el área central del laberinto con su cabeza dirigida hacia un brazo cerrado. La prueba de laberinto elevado se registró mediante una cámara de video. El número de entradas (una entrada se define como la presencia completa del cuerpo del ratón en el brazo) en cada brazo y se registró el tiempo permanecido en los brazos abiertos y estas mediciones sirvieron como un índice de comportamiento similar a la ansiedad.
- Los ratones pudieron moverse libremente por el laberinto durante 10 min. Cada ratón en estudio se sometió a la prueba.
- Se cuantificó la permanencia en los brazos abiertos y estas mediciones sirvieron como un índice de comportamiento similar a la ansiedad.

#### -Etapa 5.- Cuantificación de consumo de bebida, alimento y peso corporal

El bebedero de los ratones fue pesado día a día para obtener el diferencial de consumo diario, tomando como referencia la cantidad dejada y la obtenida al día siguiente, se siguió el mismo proceso para la cuantificación de bebida y alimento; en cuanto al peso corporal, todos los ratones fueron pesados al iniciar el periodo de experimento, cada semana en el mismo rango horario y al concluir el periodo experimental.

#### -Etapa 6.- Disección de tejido cerebral

Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico (50  $\mu$ L/25 g). Se revisaron reflejos antes de iniciar la disección con el objetivo de obtener el tejido a estudiar. Se expuso el sujeto de estudio en la tabla de disección, se fijó, con pinzas se tomó segmento infraumbilical, se hizo un corte transverso de aproximadamente 2mm, iniciando corte de piel y tejido celular subcutáneo, por la línea media hasta segmento supra-esternal, lugar donde bifurcamos de forma bilateral el corte, tomando como referencia el arco subclavio; de la misma forma en región infra umbilical, bifurcamos el corte, tomando como referencia dirección iliaca externa, se fijó y disecó colgajo cutáneo, procedimos al corte del peritoneo y aponeurosis utilizando la misma técnica, se fijó tejido segmentado en entorno, exponiendo órganos y facilitando la visualización. Segmentamos la vena cava inferior a nivel infra umbilical, procedimos a perfundir con 30 mL de tampón fosfatado salino (PBS) a través de punción ventricular y posterior infusión del PBS, ello con objetivo de para eliminar el exceso de eritrocitos en tejido cerebral. Una vez realizado este procedimiento, con ayuda de unas tijeras se disecó el cráneo para proseguir con la obtención del tejido encefálico, realizando corte transverso y bilateral, de posterior a anterior tomando como referencia la región petrosa del temporal, una vez realizado, retiramos cubierta redundante y tras una presión firme con instrumentación obtendremos el cerebro.

#### -Etapa 7.- Obtención de cortes histológicos

Una vez obtenido el tejido cerebral del ratón, se colocó en el medio de congelación “*optimal cutting temperature*” (OCT). A continuación, el tejido fue congelado a -70°C para conseguir la solidificación del OCT, una vez solidificado, procedimos a la obtención de los cortes histológicos, esto con ayuda del criostato, a temperatura de corte entre -19 a -21 grados centígrados, fijando

muestra con OCT en superficie de corte, esperando hasta su solidificación, continuando con la realización de cortes con un grosor de 5  $\mu\text{m}$ , fijándolos sobre porta objetos, colocando 2 muestras histológicas por porta objetos.

-Etapa 8.- Determinación de la expresión de receptores CB1

Para la determinación de la expresión de los receptores para endocannabinoides en tejido encefálico, se empleó un análisis de intensidad media de fluorescencia por microscopía, para detección de proteínas en tejido (inmunohistoquímica).

- Método de laboratorio para el que se usan anticuerpos a fin de determinar si hay ciertos antígenos (marcadores) en una muestra de tejido. Por lo general, los anticuerpos van unidos a una enzima o un tinte fluorescente. Cuando los anticuerpos se unen al antígeno en la muestra de tejido, se activa la enzima o el tinte y se observa el antígeno al microscopio (49).

Preparación de laminilla para valorar intensidad de fluorescencia (anexo 1 y tabla 4).

- 1.- Se fijaron las laminillas con acetona en un tubo falcon de 50 mL con acetona, durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Se dejaron secar las laminillas y se hizo un borde con lápiz de cera alrededor de la muestra (en forma circular, tomando la muestra como centro).
- 3.- Se agregó buffer de bloqueo (100  $\mu\text{L}$  por muestra) y se colocó la laminilla en cámara húmeda en agitación (sobre el agitador a 56 rpm) a temperatura ambiente.
- 4.- Se hicieron 3 Lavados con buffer de lavado, retirando buffer de lavado con micro pipeta antes de iniciar el siguiente y dejando en agitador durante 5 minutos.
- 5.- Se preparó el anticuerpo primario. Tubo eppendorff con 100  $\mu\text{L}$  de PBS-T20 al cual se le agregan 0.3  $\mu\text{L}$  de anticuerpo. Anticuerpo primario CB-1R (tabla 4).
- 6.- Se agitó el tubo eppendorff con anticuerpo en el vórtex hasta homogeneizar e inmediatamente se colocó en la muestra.
- 7.- Se colocó la muestra dentro de cámara húmeda (cubierta con aluminio) en agitación dentro de refrigerador a 4° C durante toda la noche.
- 8.- Al día siguiente, se sacó el agitador del refrigerador y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 9.- Se hicieron 3 Lavados con buffer de lavado, retirando buffer de lavado con micro pipeta antes de iniciar el siguiente y dejando en agitador durante 5 minutos.
- 10.- Se colocó medio de montaje con DAPI, 50  $\mu\text{L}$ .
- 11.- Se cubrió la laminilla con cubreobjetos (previamente limpiarlo con etanol al 70%)
- 12.- Se leyó al microscopio.

Se colocó laminilla en la platina, enfocamos con objetivo de 20x, se abrió obturador y visualizamos canales de fluorescencia. Se nombró cada canal de fluorescencia en la computadora e iniciamos a tomar fotos de las regiones de interés. Realizamos el mismo procedimiento con el objetivo 60x, previamente colocando una gota de aceite de inmersión en el lente para una

adecuada lectura. El software que permite la utilización del microscopio, controla la captura de imágenes multidimensional a la perfección, con respaldo para captura, visualización, control de periféricos y administración y análisis de datos de hasta seis dimensiones (X, Y, Z, Lambda (longitud de onda), T, puntos múltiples). Además, ofrece características sofisticadas de procesamiento de imágenes, como un módulo de deconvolución extremadamente potente, una exclusiva capacidad de base de datos con un solo clic y función de profundidad de campo extendida.

Se analizaron 10 células por campo en 10 fotografías para cada animal de experimentación, en un microscopio de fluorescencia Nikon 6000 bajo un objetivo de 20X y 60x, por medio del software GraphPad Prism. Se evaluó la población celular con señal positiva para el receptor CB1, y a partir de ello se determinó la intensidad media de fluorescencia.

| Anticuerpo | Fluorocromo         | Tipo  | Marca |
|------------|---------------------|---|-------|
| CB1        | N/A                 | Anticuerpo policlonal de conejo                   | Abcam |
| Anti – IgG | Alexa Fluor®<br>647 | Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo | Abcam |

**Tabla 4.** Anticuerpos empleados

#### -Etapa 9.- Análisis de Resultados

Se realizaron pruebas estadísticas no paramétrica de Friedman, para la comparación de grupos, para fines de gráficas se utilizó desviación estándar; los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significantes.

## **8.- Implicaciones éticas**

Este proyecto de investigación se realizó acorde a los lineamientos del comité de Ética en la Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Estado de México, basándonos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.



## 9.- Resultados

*Consumo de agua en mililitros, alimento en gramos y cambios en el peso corporal gramos.*

Con el fin de determinar si la suplementación con edulcorantes comerciales tiene efectos sobre el comportamiento alimentario y la ganancia de peso de los animales experimentales, se determinaron los cambios en el consumo diario de solución con edulcorantes, alimento y se determinaron semanalmente los cambios en el peso corporal de los mismos.

En cuanto al consumo de agua, los resultados muestran que el grupo suplementado con sacarosa y glucósidos de esteviol incrementaron el consumo de bebida a partir de la primera semana de tratamiento, mostrando diferencias significativas con el grupo sin suplementación a lo largo del periodo de estudio (control vs. sacarosa:  $1.861 \text{ mL} \pm 0.2254$  vs.  $3.45 \text{ mL} \pm 0.6103$ ,  $p=0.0485$ . control vs glucósidos de esteviol:  $1.861 \text{ mL} \pm 0.2254$  vs.  $4.032 \text{ mL} \pm 0.193$ ,  $p=0.0040$ .), evidenciándose aún más en las últimas dos semanas de estudio (semana 5 y 6) (Figura 1A). En contraste, los resultados para el consumo de alimento muestran que el grupo sacarosa disminuyó su consumo de alimento en comparación con el grupo control (control vs sacarosa:  $21.48 \text{ g} \pm 0.5737$  vs.  $25.65 \text{ g} \pm 0.8544$ ,  $p=0.0140$ . control vs glucósidos de esteviol:  $21.48 \text{ g} \pm 0.5737$  vs.  $23.3 \text{ g} \pm 0.2582$ ,  $p=0.4719$ .) (Figura 1B). No obstante, a pesar de la disminución en el consumo de alimento en el grupo suplementado con sacarosa, los resultados muestran que este grupo tuvo una mayor ganancia en peso en comparación con el grupo control ( $21.48 \text{ g} \pm 0.5737$  vs.  $25.65 \text{ g} \pm 0.8544$ ;  $p=0.0140$ ) y el grupo de glucósidos de esteviol ( $25.65 \text{ g} \pm 0.8544$  vs.  $23.3 \text{ g} \pm 0.2582$ ;  $p=0.4719$ ), manteniendo ésta tendencia a lo largo del periodo de estudio. En cambio, el grupo control y el grupo glucósidos de esteviol mostraron un comportamiento muy similar durante el periodo de estudio (Figura 1C).

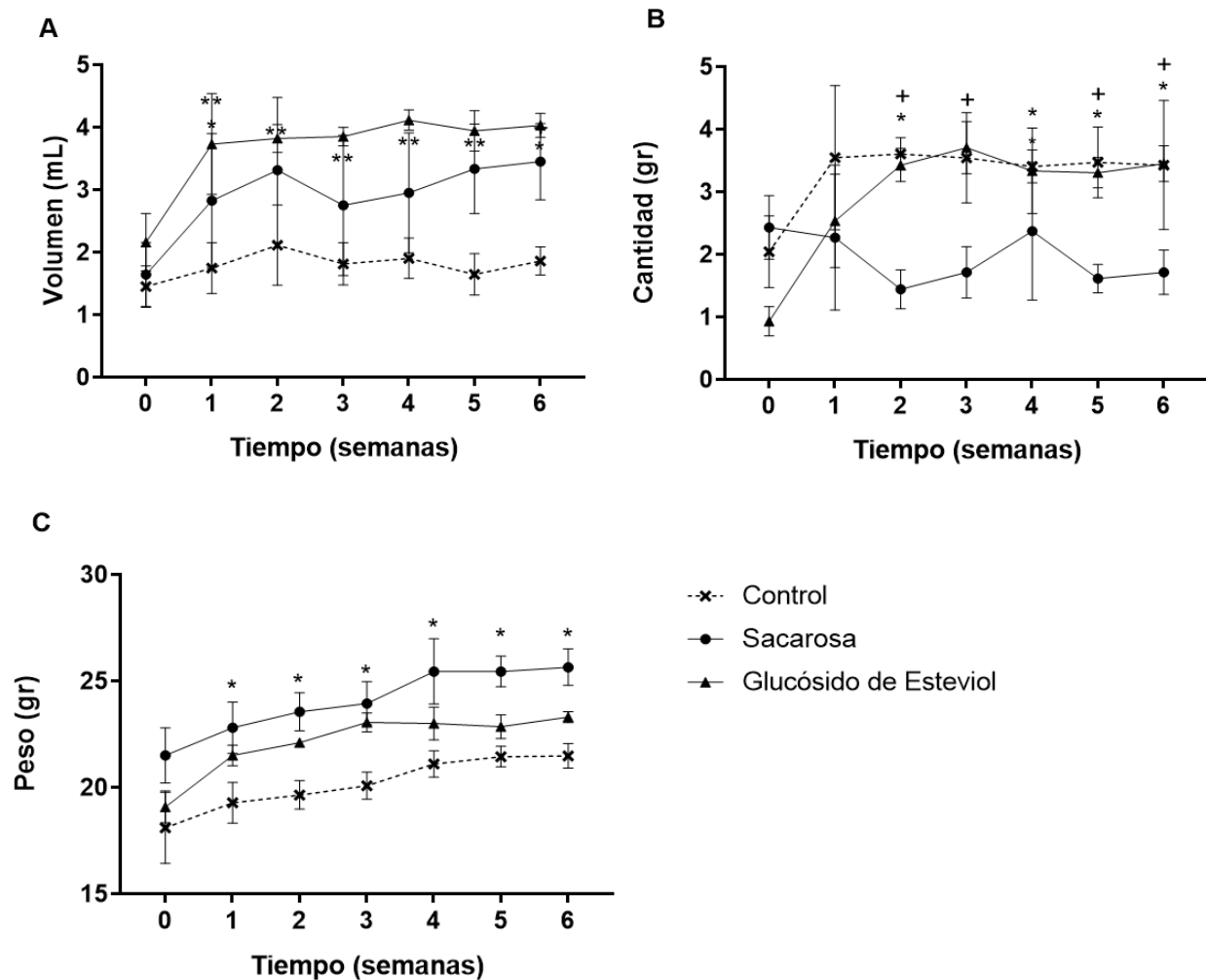


Figura 1. Consumo de agua, alimento y ganancia de peso en grupos suplementados. A. Representación del promedio semanal del registro diario de consumo de agua en los grupos experimentales. B. Resultados del registro diario de consumo de alimento en los grupos experimentales. C. Resultados del registro semanal de la ganancia de peso en los grupos experimentales. Los datos se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar. \*  $p < 0.05$ .  $n = 4$  ratones por grupo.

### Análisis del comportamiento de ansiedad.

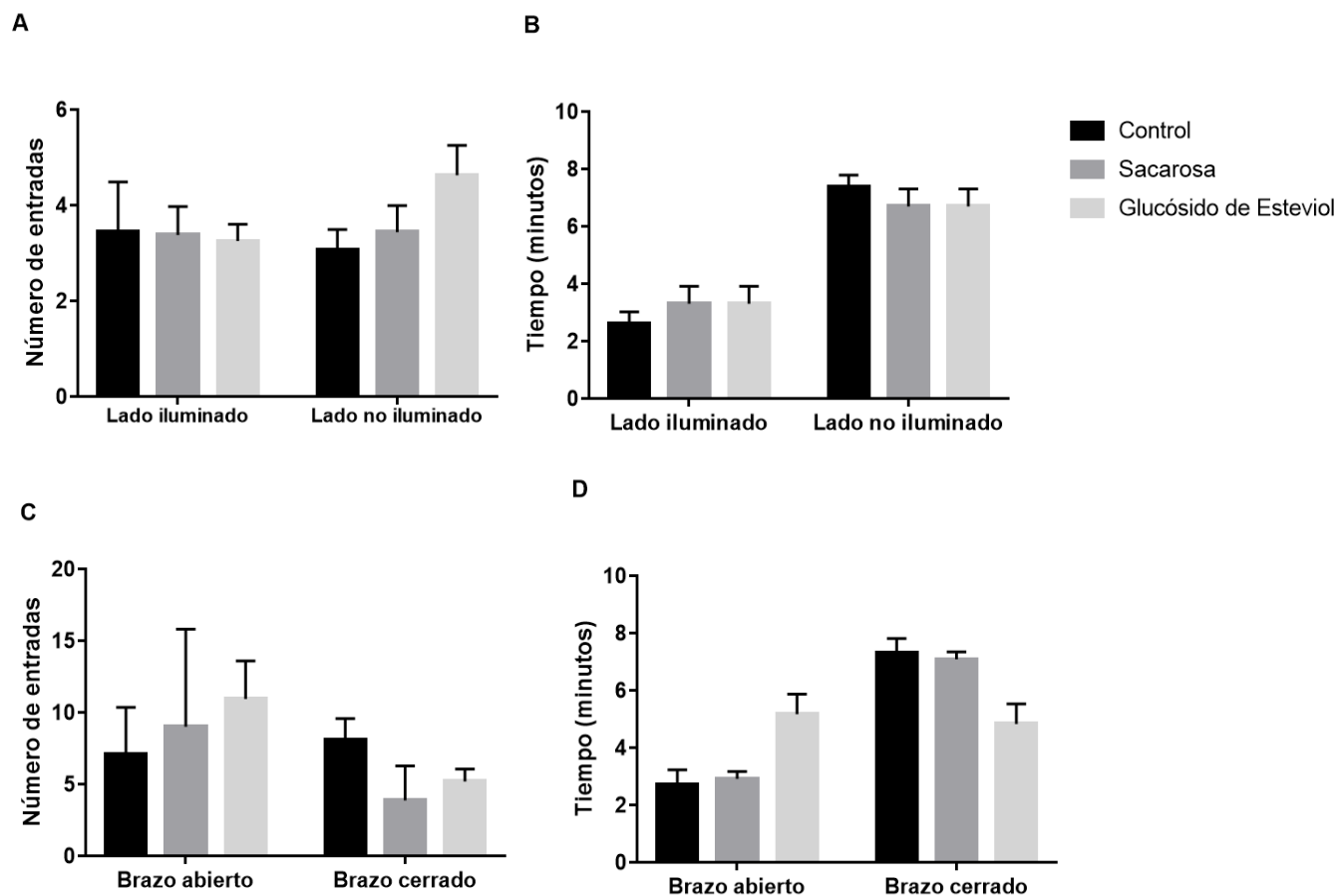
Para determinar la presencia de cambios en el comportamiento de ansiedad en los animales bajo estudio, se realizaron 2 pruebas que se usan comúnmente para este tipo de estudios en modelos de mamíferos: caja oscura y laberinto elevado en cruz.

En el caso de la prueba de caja oscura, el aparato consiste en una cámara oscura y una cámara brillantemente iluminada. Una abertura restringida, de 3 cm de alto por 5 cm de ancho, conecta las dos cámaras. Los ratones pueden moverse libremente entre las dos cámaras. El número de entradas en la cámara brillante y la duración del tiempo que se pasa allí se utilizan como índices

de ansiedad en el espacio brillante en ratones. En la prueba, los resultados de comportamiento no muestran diferencias significativas entre los grupos control y sacarosa en cuanto al número de entradas (e) en los lados iluminado (control vs. sacarosa:  $3.438 \pm 1.048$  vs.  $3.375 \pm 0.5951$ ,  $p=0.8665$ . Control vs. glucósidos de esteviol:  $3.438 \pm 1.048$  vs.  $3.25 \pm 0.3536$ ,  $p=0.8665$ . Sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $3.375 \pm 0.5951$  vs.  $3.25 \pm 0.3536$ ,  $p=0,9999$ ) y no iluminado (control vs. sacarosa:  $3.063 \pm 0.427$  vs.  $3.438 \pm 0.5543$ ,  $p=0,9999$ . Control vs. glucósidos de esteviol:  $3.063 \pm 0.427$  vs.  $4.625 \pm 0.6292$ ,  $p=0.1017$ . Sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $3.438 \pm 0.5543$  vs.  $4.625 \pm 0.6292$ ,  $p=0.1017$ ) (Figura 2A). En el análisis del tiempo de permanencia en minutos de los animales en cada espacio del área de prueba, los resultados no mostraron diferencias significativas, aunque se observa una tendencia a permanecer más tiempo en el área no iluminada (control vs. sacarosa:  $7.384 \text{ min} \pm 0.4017$  vs.  $6.696 \text{ min} \pm 0.6071$ ,  $p=0.1555$ . Control vs. glucósidos de esteviol:  $7.384 \text{ min} \pm 0.4017$  vs.  $7.172 \text{ min} \pm 0.2644$ ,  $p=0.9999$ . Sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $6.696 \text{ min} \pm 0.6071$  vs.  $7.172 \text{ min} \pm 0.2644$ ,  $p=0.6478$ ), en comparación en el lado iluminado (control vs. sacarosa:  $2.616 \text{ min} \pm 0.4017$  vs.  $3.304 \text{ min} \pm 0.6071$ ,  $p=0.1555$ . Control vs. glucósidos de esteviol:  $2.616 \text{ min} \pm 0.4017$  vs.  $2.828 \text{ min} \pm 0.2644$ ,  $p=0.9999$ . Sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $3.304 \pm 0.6071$  vs.  $2.828 \pm 0.2644$ ,  $p=0.6478$ ) en los animales de los grupos de estudio. Estadísticamente, no hubo diferencia significativa para los grupos en este parámetro (Figura 2B).

En el caso de la prueba de laberinto elevado en cruz, el aparato utilizado, comprende dos brazos abiertos y dos brazos cerrados con una plataforma central, todo el aparato está a 50 cm por encima del piso. Los ratones pueden moverse libremente por el laberinto durante 10 min. Se cuantifica el tiempo en minutos pasado en los brazos abiertos y estas mediciones sirven como un índice de comportamiento similar a la ansiedad. Los resultados para el número de entradas en cada brazo abierto (control vs. sacarosa:  $7.063 \text{ min} \pm 3.287$  vs.  $9 \text{ min} \pm 3.873$ ,  $p=0.8665$ . Control vs. glucósidos de esteviol:  $7.063 \text{ min} \pm 3.287$  vs.  $10.94 \text{ min} \pm 2.657$ ,  $p=0.1017$ .

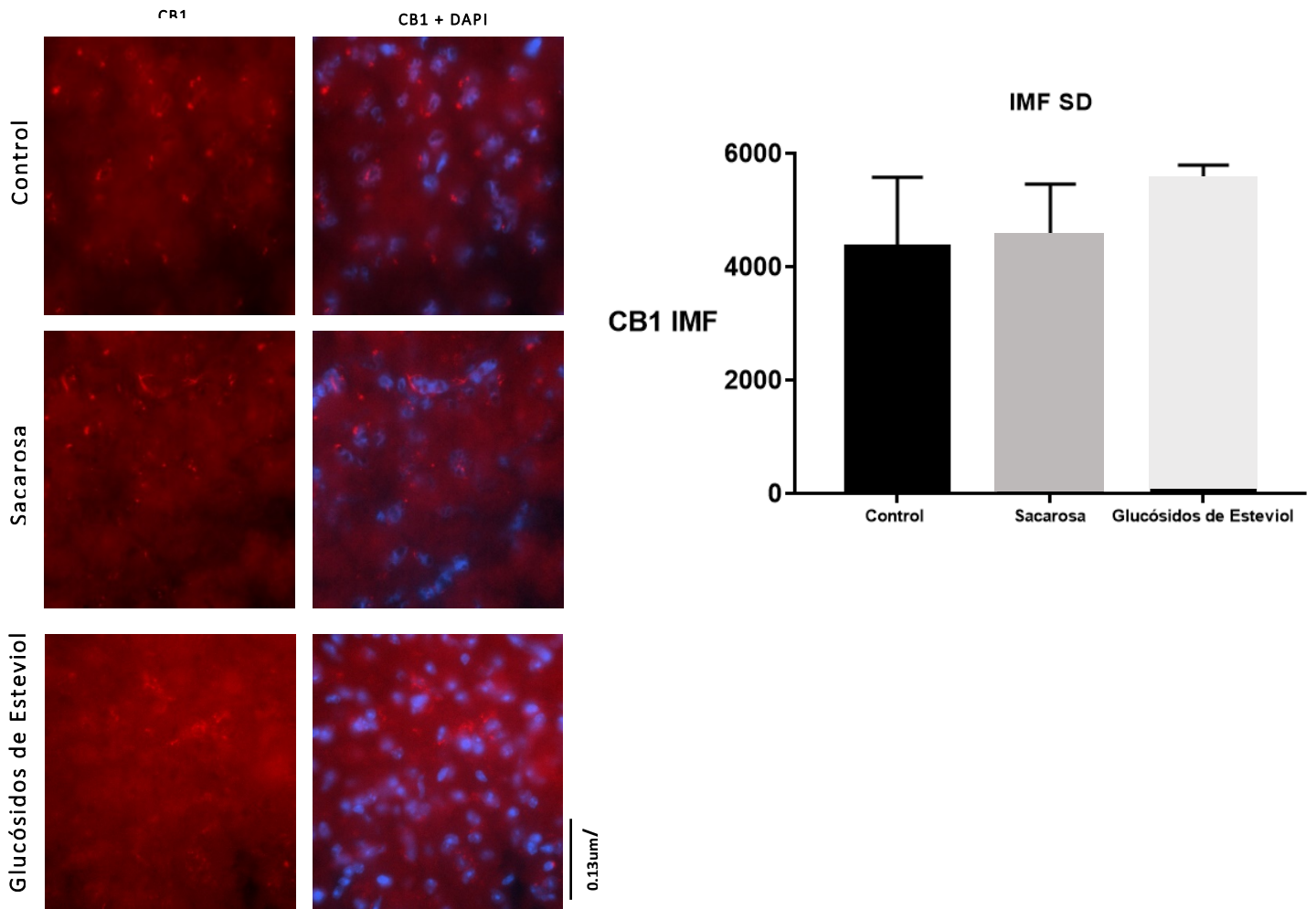
Sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $9.0 \text{ min} \pm 3.873$  vs.  $10.94 \text{ min} \pm 2.657$ ,  $p=0.8665$ ) y brazo cerrado (control vs. sacarosa:  $8.063 \text{ min} \pm 1.505$  vs.  $6.813 \pm 2.41$ ,  $p=0.9999$ . Control vs. glucósidos de esteviol:  $8.063 \text{ min} \pm 1.505$  vs.  $5.188 \text{ min} \pm 0.875$ ,  $p=0.2313$ . Sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $6.813 \text{ min} \pm 2.41$  vs.  $5.188 \text{ min} \pm 0.875$ ,  $p=0.4719$ ) del laberinto entre los grupos no muestran diferencias significativas; sin embargo, se encontró diferencias significativas en el número de entradas al brazo abierto en el grupo glucósidos de esteviol ( $10.94 \pm 2.657$  vs.  $5.188 \pm 0.875$ ;  $p=0.0286$ ). En la figura 2C se puede apreciar una tendencia del grupo sacarosa a entrar más en el brazo abierto ( $9.0 \pm 3.873$  vs.  $6.813 \pm 2.41$ ;  $p=0.3714$ ). En cuanto al tiempo de permanencia en cada brazo del laberinto, los resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales (control vs. sacarosa:  $7.293 \text{ min} \pm 0.5211$  vs.  $7.087 \text{ min} \pm 0.2588$ ;  $p=0.9999$ ; control vs. glucósidos de esteviol:  $7.293 \text{ min} \pm 0.5211$  vs.  $4.831 \text{ min} \pm 0.7014$ ;  $p=0.0400$ ; sacarosa vs. glucósidos de esteviol ( $7.087 \text{ min} \pm 0.2588$  vs.  $4.831 \text{ min} \pm 0.7014$ ;  $p=0.2313$ ). Al igual que en la prueba de la caja oscura, se observó una preferencia significativa de los animales experimentales de los grupos a permanecer en el brazo cerrado (Figura 2D). Tras el análisis correspondiente y con base en los resultados obtenidos, se resume que el tratamiento con sacarosa o glucósidos de esteviol no ocasionan un aumento en el nivel de ansiedad en comparación con la dieta control.



**Figura 2. Análisis del comportamiento de ansiedad en grupos suplementados.** A y B. Comportamiento de los ratones en la prueba de la caja oscura, mostrando número de entradas en cada área y tiempo de permanencia en las mismas, respectivamente. C y D. Comportamiento de los ratones en la prueba del laberinto elevado, mostrando número de entradas en cada área y tiempo de permanencia en las mismas, respectivamente. Los datos se muestran como medias  $\pm$  desviación estándar. n=4 ratones por grupo.

### Expresión del receptor CB-1 en tejido encefálico

Finalmente, se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) para la expresión del receptor CB1 en cada grupo, la cual no mostró diferencia significativa entre los grupos experimentales (control vs. sacarosa:  $4342 \pm 1236$  vs.  $4544 \pm 911.9$ ;  $p=0.9999$ ; control vs. glucósidos de esteviol:  $4342 \pm 1236$  vs.  $5516 \pm 275.4$ ;  $p=0.8665$ ; sacarosa vs. glucósidos de esteviol:  $4544 \pm 911.9$  vs.  $5516 \pm 275.4$ ;  $p=0.8665$ ).



**Figura 3. Expresión de receptor CB1 en tejido encefálico de ratones suplementados.** A. Análisis por inmunofluorescencia para detectar la expresión del receptor CB1 en tejido encefálico. Se observan núcleos celulares de tejido neuronal (en azul) y la expresión del receptor CB1 (en rojo), tanto en grupo control como para los grupos experimentales, esto con escala de 0.13µm/px. B. Valores de intensidad media de fluorescencia (IMF) para el receptor CB1. Los resultados muestran el valor promedio en 10 células por campo en 10 campos, para cada muestra. n=4 ratones hembra por grupo.

## 10.- Discusión

Actualmente, una de las grandes problemáticas en salud a nivel mundial son las enfermedades crónicas degenerativas, en específico las asociadas a la ingestión de alimentos inadecuados o en exceso. Diabetes y obesidad se han convertido en el común denominador en la práctica de día a día de los médicos, incitando a la búsqueda de nuevas terapéuticas e investigaciones más profundas para un mejor abordaje. Tal es el caso del sistema de endocannabinoides, que hasta hace algunas décadas se desconocía y actualmente se sabe que ésta en todo el organismo. Esta amplia distribución le confiere una gran gama de funciones, entre ellas, se incluye la manera en la que el consumo de alimento lo estimula; en específico, su relación con el consumo de glucosa y la forma en que esto a través de una retroalimentación repercute en el comportamiento (1).

Actualmente se sabe que el consumo de alimentos “palatables” o “sabrosos”, en éste caso “dulces”, se asocia al aumento de señales orexigénicas, lo cual se traduce en una señal neurohumoral, generando una mayor ingestión de alimentos y conduciendo a una mayor reserva energética en el organismo, traduciéndose en una ganancia ponderal. En el caso de este proyecto, algunas de las variables contempladas fueron las ganancias ponderales, así como el consumo de alimento y bebida de los elementos de estudio. Se encontró un aumento en el consumo de bebida en el grupo sacarosa y el grupo glucósidos de esteviol en comparación con el grupo control durante todo el periodo de estudio, siendo un resultado esperado, sustentado en el estímulo orexigénico al cual se asocia el consumo de glucosa(14). Sin embargo, en el caso del consumo de alimento, observamos que el grupo sacarosa mostro un menor consumo en comparación con el grupo control, no obstante, el grupo glucósidos de esteviol mostró un comportamiento similar al de grupo control durante todo el periodo de estudio. En primera instancia esto podría parecer contra intuitivo, dado que, en teoría, el grupo suplementado con sacarosa está recibiendo un aporte mayor de glucosa en su dieta, por lo que se esperaría que produjera del estímulo orexigénico que se viera reflejado en una mayor ingestión de alimentos. No obstante, al tomar en cuenta el balance energético, se explica el resultado obtenido debido a que, al suplir la demanda de azúcar en la bebida, el consumo de alimentos puede disminuir, dado que el organismo detecta el exceso de energía ingerido y se induce una disminución en el apetito, manteniendo de ésta forma el balance energético del organismo (1,14,24). Sin embargo, esto no explica en su totalidad lo encontrado en grupo glucósidos de esteviol, que como observamos fue el grupo que mayor ingesta de bebida presento, en el consumo de alimento, mostro un comportamiento similar al de grupo control, pese a que en bebida que el que más ingirió, donde esperaría encontrar un contra balance en el consumo de alimento, pero no fue así.

En cuanto a la ganancia de peso, podemos apreciar la tendencia de ganancia ponderal presentada en el grupo suplementado con sacarosa y glucósidos de esteviol en comparación con el grupo control, la cual se mantiene durante todo el tiempo de estudio. Éste resultado era el esperado, debido a que grupo sacarosa tuvo un aporte calórico adicional que podría reflejarse como un aumento en la adiposidad como mecanismo de reserva energética, traduciéndose de ésta forma en un aumento de peso o ganancia ponderal, lo que llama la atención es que grupo glucósidos de esteviol a pesar de haber presentado un mayor consumo de alimento y bebida en comparación con grupo sacarosa, esto no se vio reflejado en un mayor

aumento de peso. Con base en estos resultados, se puede inferir que, en efecto, la presencia de sacarosa se asocia a un incremento del apetito, en este caso observándose una predilección por la bebida azucarada que se muestra como aumento en el consumo de agua y que se asocia a un aumento de peso de los animales suplementados con el edulcorante, de igual manera, inferimos que el consumo de glucósidos de esteviol se asocia con un mantenimiento del peso corporal, mostrando comportamientos casi similares a los de grupo control; siendo una conclusión esperada para estas variables.

En cuanto al objetivo principal de este proyecto, el análisis del comportamiento de ansiedad empleando las pruebas de la caja oscura y laberinto elevado en cruz, mostró que el patrón de comportamiento de los animales en ambos grupos experimentales, no presenta diferencias significativas, lo cual indica que no hubo aumento de ansiedad en los ratones suplementados con edulcorantes. En ambas pruebas se pudo apreciar que los animales tuvieron mayor número de entradas en las áreas no iluminadas y brazos cerrados en comparación con las áreas iluminadas y abiertas, sin necesidad de demostrar un estado patológico de ansiedad, presentando patrones similares de exploración y permanencia. La inferencia de los resultados en éstas dos pruebas es que los grupos muestran cierta ansiedad durante la manipulación experimental, ya que prefieren pasar el tiempo en áreas que pudieran ser consideradas más seguras para ellos, aun cuando muestran la disposición para explorar su entorno dentro de límites normales. Se cuenta con estudios previos en los cuales se demuestra que el consumo de “dieta de cafetería”, se asocia con cambios en comportamiento y en el patrón de exploración, no solamente afectando al elemento de estudio sino también su descendencia (24,27,54,59). Sin embargo, en éste estudio no se encontró cambio en el patrón de exploración, esto asociado al hecho a que, en dietas de cafetería, se les suplementa con alimentos palatales y ricos en otros grupos alimenticios, no solamente con edulcorante bebido. No obstante, los resultados obtenidos en este proyecto son únicamente una indicación preliminar, ya que debido al tamaño de la muestra no se pueden generalizar éstos patrones.

Finalmente, el análisis de la relación entre la suplementación con edulcorante y la expresión del receptor CB1 en el cerebro de los animales experimentales tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos. Los patrones de expresión de la molécula fueron similares entre los grupos experimentales, lo cual fue demostrado igualmente por medio de la determinación de los valores de intensidad media de fluorescencia para el receptor CB1, con base en la información presentada se indica que la suplementación tanto con sacarosa y/o glucósidos de esteviol no afecta de forma significativa la expresión de receptor CB1 en el cerebro de los ratones, de ésta forma no se cumplió la hipótesis propuesta en éste proyecto.

## **11.- Conclusiones y recomendaciones**

Con base en los resultados obtenidos en este protocolo de investigación, podemos afirmar que no se encontró aumento en el nivel de ansiedad ni en la expresión del receptor CB1 en corteza prefrontal y se afirmó el hecho de que los estímulos palatables aumentan el consumo de edulcorante y se asocian a ganancias ponderales.

Se recomienda ampliar la cantidad de sujetos de estudio para poder brindar mayor significancia a los resultados, siendo conveniente hacer la comparación con otros edulcorantes comerciales.

En cuando a las pruebas de ansiedad, sería conveniente contar con un ambiente totalmente aislado, esto con el objetivo de disminuir en lo posible el sesgo que algún estímulo externo pudiera generar. De igual forma, la implementación de un software analítico para evaluar los patrones de exploración y movimiento sería muy útil para incrementar la significancia de los resultados.



## 12.- Perspectivas futuras

El presente estudio permitió obtener resultados parciales en cuanto a la relación entre la suplementación con edulcorantes y alteraciones en el comportamiento y la expresión de receptores del sistema endocanabinoide en el cerebro de ratones, con la desventaja de incluir un espectro pequeño de población en estudio. Pese a ello, podemos inferir que el consumo de sacarosa y/o glucósidos de esteviol comercial no aumentan los niveles de ansiedad ni la expresión de receptor CB1 en corteza prefrontal; sin embargo, si genera regulación orexigénica, reflejándose en el aumento de consumo de bebida azucarada y ganancia ponderal, principalmente con suplementación de sacarosa.

No obstante, se necesita realizar esta investigación con un mayor número de individuos por grupo para demostrar el grado de significancia estadística de los resultados encontrados. Para ello se necesita ampliar el número de individuos a un mínimo de 6 por grupo. Sumado a esto, sería de gran importancia en el futuro investigar mayores patrones moleculares involucrados en la respuesta de ansiedad, como por ejemplo cuantificación de cortisol.

## 13.- Bibliografía

1. Battista N, Di Tommaso M, Bari M, Maccarrone M. The endocannabinoid system: an overview. *Front Behav Neurosci* 2012; 1-9. DOI: 10.3389/fnbeh.2012.00009.
2. Fine PG, Rosenfeld MJ. The Endocannabinoid System, Cannabinoids, and Pain. *Rambam Maimonides Med J* 2013; 1–15. DOI:10.5041/RMMJ.10129.
3. Benito Sastre C. Estudio Neuropatológico Y Funcional Del Sistema Endocannabinoide Glial En Procesos Neuroinflamatorios. Tesis Univ Complut Madrid. 2010;1–55. DOI: ISBN: 978-84-693-1123-3.
4. Grotenhermen F. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*. 2006;1: 1–5. DOI: 10.2174/157015907780866884.
5. Zou S, Kumar U. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int J Mol Sci*. 2018; 1-23. DOI: 10.3390/ijms19030833.
6. Gómez-Ruiz M, Hernández M, De Miguel R, Ramos JA. An overview on the biochemistry of the cannabinoid system. *Mol Neurobiol*. 2007; 3–14. DOI: 10.1007/s12035-007-0015-0.
7. Mechoulam R, Parker L. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu.Rev.Psychol*. 2013; 4-30. DOI: 10.1146/annurev-psych-113011-143739.
8. Lee MA. The discovery of the Endocannabinoid System. O’Shaughnessy’s Online. 2012;2. DOI: wp-content/uploads/2012/07/eCBSsystemLee.pdf
9. J. Kander. Enhancing Your Endocannabinoid-System Final. *J Chem Inf Model*. 2013;1689–99. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.
10. Grotenhermen F. Cannabinoids and the Endocannabinoid System. *Cannabinoids*. 2006; 10–4. DOI: 10.5041/RMMJ.10129.
11. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev*. 2006; 73–100. DOI: 10.1210/er.2005-0009.
12. Guzmán M, Galve-Roperh I. Endocannabinoides: un nuevo sistema de comunicación en el cerebro. *Av en Neurocienc Neurotransmisores y Patol Nerv*. 2009;177–94. DOI: index.php/mono/article/viewFile/911/879.
13. Pertwee RG. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: Pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2012;367. DOI: 10.1098/rstb.2011.0381.
14. Pazos MR, Núñez E, Benito C, Tolón RM, Romero J. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005; 239–47. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.01.030.
15. Scheller A, Kirchhoff F. Endocannabinoids and Heterogeneity of Glial Cells in Brain Function. *Front Integr Neurosci [Internet]*. 2016;1–6. DOI: 10.3389/fnint.2016.00024.

16. Mechoulam R, Parker L. The Endocannabinoid System and the Brain. 2012; 23-47. DOI: 10.1146/annurev-psych-113011-143739.
17. Pacher P. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006;389–462. DOI: 10.1124/pr.58.3.2.
18. Acharya N, Penukonda S, Shcheglova T, Hagymasi AT, Basu S, Srivastava PK. Endocannabinoid system acts as a regulator of immune homeostasis in the gut. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;5005–10. DOI: 10.1073/pnas.1612177114.
19. Simon V, Cota D. Mechanisms in endocrinology: Endocannabinoids and metabolism: Past, present and future. *Eur J Endocrinol.* 2017;309–24. DOI: 10.1530/EJE-16-1044.
20. Muller T, Demizieux L, Troy-Fioramonti S, Gresti J, Pais de Barros J-P, Berger H, et al. Overactivation of the endocannabinoid system alters the antilipolytic action of insulin in mouse adipose tissue. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2017;26–36. DOI: 10.1152/ajpendo.00374.2016.
21. Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and cancer: Therapeutic implication. *Br J Pharmacol.* 2011;1447–63. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01327.x.
22. DiPatrizio N V., Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(31):12904–8.
23. Niki M, Jyotaki M, Yoshida R, Yasumatsu K, Shigemura N, DiPatrizio N V., et al. Modulation of sweet taste sensitivities by endogenous leptin and endocannabinoids in mice. *J Physiol.* 2015;2527–45. DOI: 10.1113/JP270295.
24. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc* 2008;158–68. DOI: 10.1016/j.numecd.2007.06.004.
25. Cristino L, Palomba L, Di Marzo V. New horizons on the role of cannabinoid CB1 receptors in palatable food intake, obesity and related dysmetabolism. 2014;26–30. DOI: 10.1038/ijosup.2014.8.
26. Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol.* 2008;369–83. DOI: 10.1146/annurev-psych-113011-143739.
27. Vlachou S, Panagis G. Regulation of brain reward by the endocannabinoid system: a critical review of behavioral studies in animals. *Curr Pharm* 2014;2072–88. DOI: 10.2174/13816128113199990433.
28. Viveros MP, Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M. Endocannabinoid system and synaptic plasticity: Implications for emotional responses. *Neural Plast.* 2007; 1-12. DOI: 10.1155/2007/52908.
29. Massa F, Mancini G, Schmidt H, Steindel F, Mackie K, Angioni C, et al. Alterations in the Hippocampal Endocannabinoid System in Diet-Induced Obese Mice. *J Neurosci.* 2010;6273–81. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2648-09.2010.
30. Moreira FA, Grieb M, Lutz B. Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression. *Clin Endocrinol Metab.* 2009;133–44.

DOI: 10.1016/j.beem.2008.09.003.

31. Ulugöl A. The endocannabinoid system as a potential therapeutic target for pain modulation. *Balkan Med J.* 2014;115–20. DOI: 10.5152/balkanmedj.2014.13103.
32. Ruehle S, Rey AA, Remmers F, Lutz B. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol.* 2012;23–39. DOI: 10.1177/0269881111408958.
33. Lafenêtre P, Chaouloff F, Marsicano G. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res.* 2007;367–81. DOI: 10.1016/j.phrs.2007.09.006.
34. Viveros MP, Marco EM, File SE. Endocannabinoid system and stress and anxiety responses. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;332–39. DOI: 10.1016/j.pbb.2005.01.029.
35. Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Viganó D, Marras E, et al. Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 2008; 1–10. DOI: 10.1093/cercor/bhm161.
36. Fogaça M V., Aguiar DC, Moreira FA, Guimarães FS. The endocannabinoid and endovanilloid systems interact in the rat prelimbic medial prefrontal cortex to control anxiety-like behavior. *Neuropharmacology.* 2012;202–10. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.03.007.
37. Sharkey KA, Wiley JW. The Role of the Endocannabinoid System in the Brain–Gut Axis. *Gastroenterology.* 2016;252–66. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.04.015.
38. Tirapu-Ustárroz J, García-Molina a, Luna Lario P, Verdejo García a, Ríos Lago M. Funciones ejecutivas y regulación de la conducta. *Neuropsicol la corteza prefrontal y las funciones ejecutivas.* 2012;89–120. DOI: 978-84-92931-13-2.
39. Schmidt CK, Khalid S, Loukas M, Tubbs RS. Neuroanatomy of Anxiety: A Brief Review. *Cureus.* 2018;1–8. DOI: 10.7759/cureus.2055.
40. Moon C-M, Jeong G-W. Functional neuroanatomy on the working memory under emotional distraction in patients with generalized anxiety disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2015;609–19. DOI: 10.1111/pcn.12295.
41. Hill MN, Gorzalka BB. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2009;451–58. DOI: 1996-3181/HT-2.
42. Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao a, Del Arco I, et al. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. *J Neurosci.* 2002;9612–617. DOI: 2401\0270-6474.
43. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated Plus Maze for Mice. *J Vis Exp.* 2008;1–4. DOI: 10.3791/1088.
44. Silva RH, Kameda SR, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Niigaki ST, Abílio VC, et al. Anxiogenic effect of sleep deprivation in the elevated plus-maze test in mice. *Psychopharmacology.* 2004;115–22. DOI: 10.1007/s00213-004-1873-z.
45. Gomez C, Saldívar-González AJ, Rodríguez R. Modelos animales para el estudio de la ansiedad:

- Una Aproximacion Crítica. *Salud Ment.* 2002;14–24. DOI: pdf/sm2501/sm250114.
46. Herman JP. Stress Response: Neural and Feedback Regulation of the HPA Axis. *Encycl Neurosci.* 2010;505–10. DOI: 10.1016/B978-008045046-9.00097-8.
  47. Wright T, Langley-Evans SC, Voigt JP. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol Behav.* 2011;164–72. DOI: 10.1016/j.physbeh.2011.01.008.
  48. Polanco LA, Vargas-Irwin C, Góngora ME. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicol.* 2012;141–48. DOI: pdf/sumps/v18n2/v18n2a11.
  49. Mora Gallegos A, Salas Castillo S. Modelos animales de miedo y ansiedad: descripciones neuro-conductuales. *Actual en Psicol.* 2014;1-12. DOI: 10.15517/ap.v28i117.14595.
  50. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;322–28. DOI: 10.1038/nprot.2007.44.
  51. Takao K, Miyakawa T. Light/dark Transition Test for Mice. *J Vis Exp.* 2006;1–3. DOI: 10.3791/104.
  52. Ohl F. Testing for anxiety. *Clin Neurosci Res.* 2003;233–38. DOI: 10.1016/S1566-2772(03)00084-7.
  53. Romo-romo A, Almeda-valdés P, Gómez-pérez GXBFJ. Prevalencia del consumo de edulcorantes no nutritivos en una población de pacientes con diabetes en México. *Gac Med Mex.* 2017;7–9. DOI: GMM/153/2017/061-074.
  54. Quitral V, González MA, Carrera C, Gallo G, Moyano P, Salinas J. Efecto de edulcorantes no calóricos en la aceptabilidad sensorial de un producto horneado. *Rev Chil Nutr.* 2017;137–43. DOI: 10.4067/S0717-75182017000200004.
  55. Gil-Campos M, San José González MA, Díaz Martín JJ. Uso de azúcares y edulcorantes en la alimentación del niño. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. *An Pediatr.* 2015;1-7. DOI: 10.1016/j.anpedi.2015.02.013.
  56. Duran, S; Rodriguez, M. del P.; Cordón, K.; Record J. Glucósidos de esteviol ( stevia rebaudiana ), edulcorante natural y no calórico Stevia ( stevia rebaudiana ), non-caloric natural sweetener. *Rev Chil Nutr.* 2012;203–06. DOI: 10.4067/S0717-75182012000400015.
  57. Hinojosa-gonzález JJ, Tun-navarrete A, Canul-lópez A, Ruiz-mercado C, Rocha-uribe JA, Betancur-ancona D. Extracción de glucósidos edulcorantes de Stevia rebaudiana bertonii por métodos de fluidos supercríticos . Extraction of Stevia rebaudiana bertonii sweetener glycosides by supercritical fluid methods. 2017;202–09. DOI: 10.19230/jonnpr.
  58. Durán A S, Cordón A K, Rodríguez N M del P. Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Rev Chil Nutr.* 2013;309–14. DOI: 10.4067/S0717-75182013000300014.
  59. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF. Obesity. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;1-18. DOI: 10.1038/nrdp.2017.34.
  60. López-Jaramillo P, Pradilla LP, Bracho Y, Silva F. El sistema endocanabinoide y su relación con la obesidad abdominal y el síndrome metabólico: implicaciones terapéuticas. *Rev Col Cardiol.* 2005;113–21. DOI: 0120-5633.

61. Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005;633–42. DOI: 10.1038/nrdp.2017.34.
62. Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. *Obesity (Silver Spring).* 2006; 1-8. DOI: 10.1038/oby.2006.275.
63. Busquets-Garcia A, Gomis-González M, Srivastava RK, Cutando L, Ortega-Alvaro A, Rühle S. Peripheral and central CB1 cannabinoid receptors control stress-induced impairment of memory consolidation. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;9904–909. DOI: 10.1073/pnas.1525066113.
64. Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacol Biochem Behav.* 2010;375–82. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.03.012.
65. Engeli S, Lehmann A-C, Kaminski J, Haas V, Janke J, Zoerner AA, et al. Influence of dietary fat intake on the endocannabinoid system in lean and obese subjects. *Obesity.* 2014;70–76. DOI: 10.1002/oby.20728.
66. Bagi SJ, Daniel EE, Rabiou KM, Ezekiel I, Sulaiman SO. Effect of Oral Administration of Some Selected Sweeteners on Anxiety in Wistar Rat Model. 2017;28–34. DOI: 10.5923/j.neuroscience.20170602.02.